

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 846 175**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 21/02 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.09.2016 PCT/JP2016/076102**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.03.2017 WO17043466**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.09.2016 E 16844327 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.11.2020 EP 3381941**

54 Título: **Anticuerpo anti-EphA4**

30 Prioridad:

08.09.2015 JP 2015177081

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

28.07.2021

73 Titular/es:

**EISAI R&D MANAGEMENT CO., LTD. (100.0%)
6-10, Koishikawa 4-chome Bunkyo-ku
Tokyo 112-8088, JP**

72 Inventor/es:

**TAGUCHI, RYOTA;
IMAI, TOSHIO;
INOUE, EIJI;
YAMADA, AKIO;
NAKATANI, AKI;
HIRAYAMA, TOSHIFUMI;
ONO, YUICHI y
ITO, SHUNSUKE**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 846 175 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

Anticuerpo anti-EphA4

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un anticuerpo que se une a EphA4.

5 Antecedentes de la invención

EphA4 es un miembro de la familia de receptores tirosina quinasa. La efrina tipo A y tipo B se conocen como ligandos de EphA4. Tras la unión de EphA4 a su ligando efrina, se inducen señales de desadhesión. EphA4 se expresa en neuronas motoras y regula la guía axonal correcta a través de la efrina expresada en regiones no proyectivas de las neuronas motoras en la médula espinal durante una etapa de formación de la red neuronal.

- 10 Estudios previos sugieren que la inhibición funcional de EphA4 es un procedimiento terapéutico eficaz para enfermedades neurodegenerativas tales como la esclerosis lateral amiotrófica (en lo sucesivo, también denominada "ELA") y la enfermedad de Alzheimer, y lesión de la médula espinal.

- 15 Se ha descrito que el gen EphA4 ajusta el fenotipo de la ELA (bibliografía de patente 1 y bibliografía no de patente 1). Se ha descubierto que el defecto genético de EphA4 o el antagonismo por EphA4-Fc o similar promueve el alargamiento axonal o la recuperación funcional en el momento de la lesión de la médula espinal en ratones o ratas (bibliografía no de patente 2; y bibliografía no de patente 3).

El péptido KYL y el compuesto 1 se conocen como inhibidores de señalización de EphA4 existentes (bibliografía de patente 1; bibliografía no de patente 1; y bibliografía no de patente 2).

- 20 Baron de Barsey ("Queen Elisabeth Medical Foundation Report 2014", 30 de marzo de 2015) describe nanocuerpos anti-EphA4 específicos.

El documento WO 2016/019280 describe anticuerpos monoclonales anti-EphA4 completamente humanos con distintas características de unión.

Sin embargo, no ha habido ningún informe sobre un anticuerpo que tenga actividad neutralizante.

Técnica anterior

- 25 Bibliografía de patente 1: WO2012/156351 A1

Bibliografía no de patente 1: Van Hoecke et al., *Nature Medicine*, vol. 18: 1418-1422, 2012

Bibliografía no de patente 2: Goldschmit et al., *PLoS one*, vol. 6: e24636, 2011

Bibliografía no de patente 3: Spanevello et al., *Journal of Neurotrauma*, vol. 30: 1023-1034, 2013

Resumen de la invención

- 30 Un objeto de la presente invención es proporcionar un anticuerpo anti-EphA4 o un fragmento de unión a EphA4 del mismo que es capaz de unirse a EphA4 e inhibir la unión entre EphA4 y su ligando, y una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo como principio activo.

- 35 Los autores de la presente invención han llevado a cabo estudios diligentes para lograr el objetivo y por consiguiente completaron la presente invención obteniendo un anticuerpo anti-EphA4 capaz de unirse a EphA4 e inhibir la unión entre EphA4 y su ligando.

Específicamente, en una realización, la presente invención se refiere a las siguientes invenciones.

(1) Un anticuerpo anti-EphA4 o un fragmento de unión a EphA4 del mismo, que comprende

(a) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 27;

(b) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 29;

- 40 (c) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 30;

(d) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 31;

(e) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 32; y

(f) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 33.

- (2) El anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con (1), en donde el anticuerpo o el fragmento de unión a EphA4 del mismo es humanizado.
- (3) El anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con (1) o (2), en donde el anticuerpo o el fragmento de unión a EphA4 del mismo se une específicamente a EphA4 e inhibe la unión entre EphA4 y la efrina.
- (4) El anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (3), en donde el anticuerpo o el fragmento de unión a EphA4 del mismo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, y la región constante de la cadena pesada y la región constante de la cadena ligera cada una comprende una secuencia derivada de anticuerpo humano.
- (5) El anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con (4), en donde la región constante de la cadena pesada deriva de IgG humana.
- (6) El anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con (5), en donde la IgG humana es IgG₁ humana o IgG₂ humana.
- (7) El anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con uno cualquiera de (4) a (6), en donde la región constante de la cadena ligera deriva de Igκ humana.
- (8) El anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (7), en donde el fragmento de unión a EphA4 se selecciona del grupo que consiste en Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv.
- (9) El anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con (8), en donde el fragmento de unión a EphA4 es F(ab')₂.
- (10) Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-EphA4 o un fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (9).
- (11) La composición farmacéutica de acuerdo con (10) que además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- (12) La composición farmacéutica de acuerdo con (10) o (11), en donde la composición farmacéutica es para usar en el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA).
- En otra realización, la presente invención también se refiere a las siguientes invenciones.
- (1') Un anticuerpo anti-EphA4 o un fragmento de unión a EphA4 del mismo, que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde una región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 66, 68 o 70, y una región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 78, 80, 82 u 84.
- (2') Un anticuerpo anti-EphA4 o un fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con (1'), en donde una región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 66, y una región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 78.
- (3') Un anticuerpo anti-EphA4 o un fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con (1') en donde

una región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 68, y

una región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 78.

(4') Un anticuerpo anti-EphA4 o un fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con (1') en donde

5 una región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 70, y

una región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 78.

(5') Un anticuerpo anti-EphA4 o un fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con (1') en donde

10 una región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 66, y

una región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 80.

(6') Un anticuerpo anti-EphA4 o un fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con (1'), en donde

una región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 68, y

15 una región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 80.

(7') Un anticuerpo anti-EphA4 o un fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con (1'), en donde

una región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 70, y

una región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 80.

20 (8') Un anticuerpo anti-EphA4 o un fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con (1') en donde

una región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 66, y

una región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 82.

(9') Un anticuerpo anti-EphA4 o un fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con (1') en donde

25 una región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 68, y

una región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 82.

(10') Un anticuerpo anti-EphA4 o un fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con (1'), en donde

30 una región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 70, y

una región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 82.

(11') Un anticuerpo anti-EphA4 o un fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con (1') en donde

una región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 66, y

35 una región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 84.

(12') Un anticuerpo anti-EphA4 o un fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con (1') en donde

una región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 68, y

una región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 84.

40 (13') Un anticuerpo anti-EphA4 o un fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con (1'), en donde

una región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 70, y

una región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 84.

5 (14') Un anticuerpo anti-EphA4 o un fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con uno cualquiera de (1') a (13'), en donde

el anticuerpo o el fragmento de unión a EphA4 del mismo se une específicamente a EphA4 e inhibe la unión entre EphA4 y la epinefrina.

(15') Un anticuerpo anti-EphA4 o un fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con uno cualquiera de (1') a (14'), en donde

10 la región constante de la cadena pesada y la región constante de la cadena ligera cada una comprende una secuencia derivada de anticuerpo humano.

(16') El anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con (15'), en donde

la región constante de la cadena pesada deriva de IgG humana.

(17') El anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con (16'), en donde

15 la IgG humana es IgG humana que consiste en IgG₂ humana o una combinación de IgG₁ humana e IgG₂ humana.

(18') El anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con (17'), en donde

la IgG humana es IgG₂ humana.

(19') El anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con (18'), en donde

20 la IgG₂ humana tiene una mutación C131S, C219S, V234A y/o G237A con la numeración Eu, y no tiene un resto de lisina en el carboxi terminal.

(20') El anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con (19'), en donde

la IgG₂ humana comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 62.

(21') El anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con (17'), en donde

la IgG humana es IgG humana que consiste en una combinación de IgG₁ humana y IgG₂ humana.

25 (22') El anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con (21'), en donde

en la IgG humana que consiste en una combinación de IgG₁ humana y IgG₂ humana, una región CH1 y una región bisagra son de IgG₁ humana, y una región CH2 y una región CH3 son de IgG₂ humana.

(23') El anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con (22'), en donde

30 la IgG humana que consiste en una combinación de IgG₁ humana e IgG₂ humana tiene una mutación V234A y/o una mutación G237A en la numeración Eu, y no tiene un resto de lisina en el carboxi terminal.

(24') El anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con (23'), en donde

la IgG humana que consiste en una combinación de IgG₁ humana e IgG₂ humana comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 60.

35 (25') El anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con uno cualquiera de (15') a (24'), en donde

la región constante de la cadena ligera deriva de Igk humana.

(26') El anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con uno cualquiera de (1') a (25'), en donde

el fragmento de unión a EphA4 se selecciona del grupo que consiste en Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv.

40 (27') El anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con (26'), en donde

el fragmento de unión a EphA4 es F(ab')₂.

(28') Una composición farmacéutica que comprende

un anticuerpo anti-EphA4 o un fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con uno cualquiera de (1') a (27').

(29') La composición farmacéutica de acuerdo con (28') que además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 (30') La composición farmacéutica de acuerdo con (28') o (29'), en donde

la composición farmacéutica es para usar en el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA).

Uno o cualquier combinación de uno o más de los aspectos de la presente invención mencionados antes también está incluido en el alcance de la presente invención.

10 La presente invención proporciona un anticuerpo anti-EphA4 o un fragmento de unión a EphA4 del mismo que es capaz de unirse a EphA4 e inhibir la unión entre EphA4 y su ligando, y una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo como un principio activo.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra la afinidad de unión de un anticuerpo monoclonal anti-EphA4 (anticuerpo A) por EphA4 humano y EphA4 de ratón.

15 La Fig. 2 muestra la inhibición de la unión de EphA4 de ratón a la efrina A1 de ratón y efrina B2 de ratón por el anticuerpo monoclonal anti-EphA4 (anticuerpo A), péptido KYL y compuesto 1.

La Fig. 3 muestra la inhibición de EphA4 humano a efrina A5 humana y efrina B3 humana por el anticuerpo monoclonal anti-EphA4 (anticuerpo A), y péptido KYL.

La Fig. 4A muestra la afinidad de unión del anticuerpo A-IgG (anticuerpo A) y anticuerpo A-Fab para EphA4 de ratón

20 La Fig. 4B muestra la afinidad de unión del anticuerpo A-IgG (anticuerpo A) y anticuerpo A-F(ab')₂ para EphA4 de ratón.

La Fig. 4C muestra la afinidad de unión del anticuerpo A-IgG (anticuerpo A) y anticuerpo A-Fab para EphA4 humano.

La Fig. 4D muestra la afinidad de unión del anticuerpo A-IgG (anticuerpo A) y anticuerpo A-F(ab')₂ para EphA4 humano.

25 La Fig. 5 muestra la inhibición de la unión entre EphA4 de ratón y efrina B2 de ratón por el anticuerpo A-IgG (anticuerpo A), anticuerpo A-F(ab')₂, anticuerpo A-Fab, y péptido KYL.

La Fig. 6 muestra la especificidad de unión del anticuerpo A por el receptor Eph humano (Fig. 6A) y receptor Eph de ratón (Fig. 6B).

La fig. 7 muestra la actividad de unión del anticuerpo A frente a EphA4 de ratón, rata, mono y humano.

30 La fig. 8 muestra que el anticuerpo A suprime, de manera dependiente de la concentración, la autofosforilación de EphA4 inducida por la efrina A1 en neuronas del hipocampo. El pY en la Fig. 8 presenta EphA4 fosforilado.

La fig. 9 muestra que el anticuerpo A suprime, de una manera dependiente de la concentración, el colapso de conos de crecimiento inducido por la efrina A1 en las neuronas del hipocampo.

La fig. 10 muestra que el anticuerpo A suprime la autofosforilación de EphA4 inducida por la efrina A1 en el cerebro de ratón de recién nacido. El pY en la Fig. 10 presenta EphA4 fosforilado.

35 La fig. 11 muestra una vista esquemática de un sistema de evaluación llevado a cabo en el ejemplo 13.

La fig. 12 muestra que el anticuerpo A protege las neuronas motoras en modelos de ELA in vitro utilizando células ES de ratón.

La fig. 13 muestra una vista esquemática de un sistema de evaluación llevado a cabo en el ejemplo 14.

40 La fig. 14 muestra que el anticuerpo A protege las neuronas motoras en modelos de ELA in vitro usando células iPS humanas.

La fig. 15 muestra los aminoácidos del dominio de unión al ligando de EphA4 (EphA4-LBD) en el eje de abscisas y la región estructural de Fab en el eje de ordenadas. Los bits negros representan los puntos de intersección de combinaciones que tienen una interacción. Una pluralidad de bits que se presentan para un aminoácido corresponde a los tipos de interacción (enlace de hidrógeno, contacto de superficie, etc.). Un aminoácido que tiene un número mayor de bits significa que el aminoácido se une a Fab con diversas interacciones.

La fig. 16 muestra la estructura de superficie del dominio de unión a ligando de EphA4 (EphA4-LBD). En la Fig. 16, las regiones de color oscuro corresponden a las regiones de unión a Fab. En esta figura, los nombres y los números de los restos de aminoácidos contenidos en las regiones de unión se muestran en las posiciones correspondientes, y las CDR de la cadena H y la cadena L de Fab que se van a unir se indican por modelos de cinta.

5 Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un anticuerpo anti-EphA4 que se une a EphA4.

El anticuerpo anti-EphA4 usado en la presente invención es un anticuerpo que puede reconocer y unirse a EphA4. Como se menciona a continuación, el anticuerpo puede ser un anticuerpo intacto o puede ser un fragmento de unión al antígeno del mismo o un anticuerpo sintético (p. ej., un anticuerpo recombinante, un anticuerpo quimérico y un anticuerpo humanizado) siempre que tenga afinidad de unión por EphA4. En la presente invención, se puede entender que EphA4 se refiere a EphA4 derivado de ser humano, ratón, rata o mono. El EphA4 derivado de ser humano, ratón, rata o mono se puede obtener de una base de datos pública en la que se registra información de secuencia, tal como el GenBank proporcionada por el Centro Nacional de Información Biotecnológica (EE.UU.). Alternativamente, se diseñan cebadores basándose en la información de la secuencia de nucleótidos en EphA4 de una especie animal estrechamente relacionada con el mismo, y la información de la secuencia en el gen EphA4 se puede obtener por clonación a partir de ARN extraído de la especie animal deseada. Por ejemplo, la información de la secuencia de nucleótidos en EphA4 humano, de ratón, rata o mono está registrada con los números de acceso de GenBank NM_004438.4, NM_007936.3, NM_001162411.1 y NM_001260870, respectivamente, en la base de datos.

En un aspecto de la presente invención, EphA4 comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 o una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos por la sustitución, adición y/o eliminación de uno o más aminoácidos, o la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 3 o una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos por sustitución, adición y/o eliminación de uno o más aminoácidos. En la presente invención, la expresión "o más" usado para EphA4 no está limitado siempre que la secuencia resultante mantenga características funcionales equivalentes a la secuencia original. La expresión "o más" es de 2 a 100, por ejemplo, de 2 a 90, 2 a 80, 2 a 70, 2 a 60, 2 a 50, 2 a 40, 2 a 30, 2 a 20, 2 a 10, o 2 a 5 o está dentro del 10%, por ejemplo, dentro del 9%, dentro del 8%, dentro del 7%, dentro del 6% o dentro del 5% del número de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos.

En un aspecto de la presente invención, el anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo es un anticuerpo que se une específicamente a EphA4. La expresión "unión específica" es una expresión bien conocida por los expertos en la técnica, y también es bien conocido un método para determinar la unión específica de un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo a un antígeno o un epítipo. En una realización de la presente invención, se entiende que la "unión específica" significa que el anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo es capaz de unirse a EphA4 a través de reacción inmunológica más rápidamente y/o durante un tiempo más prolongado con mayor afinidad de unión y mayor actividad de unión en comparación con su unión a otras moléculas diana. En este contexto, no se excluye la unión específica a otras dianas de un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a una diana. En otra realización de la presente invención, la "unión específica" se puede indicar por un anticuerpo que tiene KD de al menos aproximadamente 10^{-7} M, al menos aproximadamente 10^{-8} M, al menos aproximadamente 10^{-9} M, al menos aproximadamente 10^{-10} M, al menos aproximadamente 10^{-11} M, o al menos aproximadamente 10^{-12} M o más para EphA4. En una realización alternativa adicional de la presente invención, se entiende que la "unión específica" es que se une a EphA4 a través de reacción inmunológica, pero no se une sustancialmente a otras subclases y subtipos de receptores de Eph.

En un aspecto de la presente invención, el anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de la presente invención es un anticuerpo que se une a la región extracelular de EphA4. El anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de la presente invención es como se define en las reivindicaciones y puede ser, por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2. o una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos por sustitución, adición y/o eliminación de uno o más aminoácidos, o comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 4 o una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos por sustitución, adición y/o eliminación de uno o más aminoácidos, y se une a cualquier sitio en la región extracelular de EphA4. En la presente invención, la expresión "o más" usada para la región extracelular de EphA4 es, pero no se limita a, de 2 a 50, por ejemplo, de 2 a 45, 2 a 40, 2 a 35, 2 a 30, 2 a 25, 2 a 20, 2 a 15, 2 a 10 o 2 a 5, o dentro del 10%, por ejemplo, dentro del 9%, dentro del 8%, dentro del 7%, dentro del 6% o dentro del 5% del número de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos.

En un aspecto de la presente invención, el anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo se puede unir específicamente a EphA4 e inhibir la unión entre EphA4 y efrina.

En una realización de la presente invención, el anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo se puede unir específicamente a al menos uno de EphA4 humano, EphA4 de ratón, EphA4 de rata y EphA4 de mono e inhibir la unión de los mismos a sus ligandos. En una realización preferida de la presente invención, el anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo se puede unir específicamente a dos o más de EphA4 humano,

EphA4 de ratón, EphA4 de rata y EphA4 de mono e inhibir la unión de los mismos a sus ligandos. En otra realización preferida de la presente invención, el anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo se puede unir específicamente a todos de EphA4 humano, EphA4 de ratón, EphA4 de rata y EphA4 de mono e inhibir la unión de los mismos a sus ligandos.

Se puede usar un método generalmente conocido por los expertos en la técnica como un método para medir las propiedades de unión al antígeno (p. ej., afinidad de unión y reactividad cruzada entre especies) del anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno del mismo. Por ejemplo, la afinidad de unión se puede medir mediante el uso del biosensor Biacore (R), biosensor KinExA, ensayo de centelleo de proximidad, ELISA, inmunoensayo ORIGEN (IGEN International), citometría de flujo, extinción de fluorescencia, transferencia de fluorescencia, presentación en levadura y/o inmunotinción, aunque el método no se limita a estos. La actividad neutralizante del anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo frente a la unión entre EphA4 y su ligando se puede medir mediante el uso del biosensor Biacore (R), ELISA y/o citometría de flujo, aunque el método no se limita a estos.

El anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de la presente invención puede ser cualquiera de un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal y un fragmento de unión a EphA4 del mismo siempre que se una a EphA4, preferiblemente, que se una específicamente a EphA4.

En la presente invención, el anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de la presente invención puede ser de cualquier clase tal como IgG, IgA o IgM (o subclase de las mismas) y no está limitado por una clase particular. Las inmunoglobulinas se clasifican en diferentes clases dependiendo de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo de sus regiones constantes de la cadena pesada (también llamada cadena H). Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, algunas de las cuales se pueden dividir en subclases (isotipos) de, por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂. Las regiones constantes de la cadena pesada que corresponden a diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan respectivamente α , δ , ϵ , γ y μ . Los tipos de la cadena ligera (también denominada cadena L) de los anticuerpos son las cadenas λ y κ .

El anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de la presente invención puede ser un anticuerpo IgG y puede ser, por ejemplo, un anticuerpo IgG₁ o un anticuerpo IgG₂. Además, el anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de la presente invención puede ser un monómero, un dímero o un multímero en algunos casos.

En un aspecto de la presente invención, el anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de la presente invención puede ser una combinación de anticuerpos IgG derivados de diferentes subclases, tal como anticuerpo IgG que consiste en una combinación de anticuerpo IgG₁ y anticuerpo IgG₂.

En la presente memoria descriptiva, el fragmento de unión al antígeno del anticuerpo no está particularmente limitado siempre que el fragmento de unión al antígeno sea un fragmento funcional y estructural del anticuerpo y mantenga la actividad de unión frente al antígeno al que se puede unir el anticuerpo. Los ejemplos del fragmento de unión al antígeno del anticuerpo incluyen, pero no se limitan a Fab, Fab', F(ab')₂, Fv y Fv monocaténario (scFv), sus variantes, proteínas de fusión que comprenden un resto de anticuerpo y otras estructuras modificadas de moléculas de inmunoglobulina que comprenden un sitio de reconocimiento de antígenos. En un aspecto, el fragmento de unión del anticuerpo de la presente invención es F(ab')₂.

El fragmento de unión al antígeno del anticuerpo se puede obtener, por ejemplo, por digestión de la proteína del anticuerpo completo con una proteasa tal como papaína o pepsina, o se puede producir directamente mediante células hospedantes recombinantes (p. ej., eucariotas tales como células de levadura, células vegetales, células de insectos o células de mamíferos, o procariotas tales como *E. coli*). Por ejemplo, los fragmentos Fab'-SH se pueden recuperar directamente de *E. coli* y unir químicamente para formar un fragmento F(ab')₂. Alternativamente, F(ab')₂ se puede formar usando la cremallera de leucina GCN4, que promueve el ensamblaje de moléculas F(ab')₂. En el caso de producir scFv por una técnica de síntesis química, se puede usar un sintetizador automático. En el caso de producir scFv por una técnica de recombinación de genes, se puede transferir un plásmido adecuado que contiene un polinucleótido que codifica scFv a células hospedantes adecuadas (p. ej., eucariotas tales como células de levadura, células vegetales, células de insectos o células de mamíferos, o procariotas tales como *E. coli*). El polinucleótido que codifica el scFv de interés se puede preparar por una operación bien conocida tal como la ligación de polinucleótidos. El scFv resultante se puede aislar usando una técnica convencional de purificación de proteínas conocida en la técnica.

En la presente invención, la región variable del anticuerpo puede significar una región variable de una cadena ligera de anticuerpo y/o una región variable de una cadena pesada de anticuerpo, y la región constante del anticuerpo puede significar una región constante de una cadena ligera de anticuerpo y/o una región constante de una cadena pesada de anticuerpo. La región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera están compuestas cada una de cuatro regiones armazón (FR) conectadas por tres CDR también conocidas como regiones hipervariables. Las CDR en cada cadena se mantienen muy próximas por las FR y contribuyen, junto con las CDR en la otra cadena, a la formación del sitio de unión al antígeno del anticuerpo. Los ejemplos de técnicas para determinar las CDR incluyen, pero no se limitan a: (1) un enfoque basado en la variabilidad de secuencia entre especies (p. ej., Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda MD); y (2) un enfoque basado en el estudio cristalográfico de un complejo antígeno-anticuerpo (Al-lazikani et al., 1997 *J. Molec. Biol.*

273: 927-948). Estos enfoques u otros enfoques se pueden usar en combinación. La región constante de la cadena pesada se compone de tres dominios, es decir, CH1, CH2 y CH3, y una región bisagra, y están situados desde el extremo amino (extremo N) al extremo carboxi (extremo C) en el orden de CH1, una región de bisagra, CH2 y CH3. La región constante de la cadena ligera está compuesta por un dominio CL.

En la presente invención, el anticuerpo monoclonal puede significar un anticuerpo que se obtiene de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos. Específicamente, los anticuerpos individuales contenidos en la población son idénticos excepto por los mutantes naturales que podrían estar presentes hasta cierto punto. El anticuerpo monoclonal se dirige a un solo sitio del antígeno y es muy específico. Además, a diferencia de un anticuerpo policlonal típico que se dirige a diferentes antígenos o diferentes epítopos, cada anticuerpo monoclonal se dirige a un solo epítipo en un antígeno. El modificador "monoclonal" indica las características del anticuerpo que se obtiene de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, y no debe interpretarse de manera restrictiva como que requiere la producción del anticuerpo por un método particular.

El anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de la presente invención puede ser un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano, un anticuerpo de mamífero no humano (p. ej., mono, ratón, rata, conejo, bovino, caballo o cabra), o un fragmento de unión a EphA4 del mismo. El anticuerpo quimérico es, por ejemplo, un anticuerpo que comprende las regiones variables de un anticuerpo no humano (p. ej., de ratón o rata) unidas a las regiones constantes de un anticuerpo humano, y puede referirse, por ejemplo, a un anticuerpo que tiene regiones variables derivadas de anticuerpo no humano y regiones constantes derivadas de anticuerpo humano. El anticuerpo humanizado es, por ejemplo, un anticuerpo que comprende las regiones hipervariables (también denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR)) de un anticuerpo no humano introducidas en un anticuerpo humano y puede referirse, por ejemplo, a un anticuerpo que tiene CDR derivadas de un anticuerpo no humano y las otras regiones del anticuerpo derivadas de un anticuerpo humano. Sin embargo, en la presente invención, no se requiere necesariamente que la distinción entre el anticuerpo quimérico y el anticuerpo humanizado sea clara, y el anticuerpo puede estar en una forma que se pueda considerar tanto como el anticuerpo quimérico como el anticuerpo humanizado. Un aspecto preferido del anticuerpo humanizado de acuerdo con la presente invención es un anticuerpo que tiene CDR derivadas de anticuerpo de roedor y las otras regiones del anticuerpo derivadas de un anticuerpo humano, en particular preferiblemente un anticuerpo que tiene CDR derivadas de anticuerpos de ratón y las otras regiones del anticuerpo derivadas de un anticuerpo humano. La humanización se puede realizar usando un método de injerto de CDR (Kontermann y Dubel, *Antibody Engineering*, Springer Lab Manual (2001); y Tsurushita et al., *Methods* 36: 69-83 (2005)) y también se puede realizar por un método conocido en la técnica (véase, p. ej., Jones et al., *Nature* 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332: 323-327 (1988); y Verhoeven et al., *Science* 239: 1534-1536 (1988)) que implica reemplazar secuencias de CDR por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. El anticuerpo humanizado es típicamente un anticuerpo humano, algunos restos de CDR y, opcionalmente, algunos restos de FR se reemplazan con restos derivados de sitios análogos de un anticuerpo no humano.

Para reducir la antigenicidad, puede ser importante seleccionar el uso de regiones variables humanas tanto en la cadena ligera como en la cadena pesada en la preparación del anticuerpo humanizado. De acuerdo con un método de "mejor ajuste", de la biblioteca completa de secuencias de FR humanas conocidas se criban las secuencias de regiones variables de un anticuerpo de roedor. A continuación, las secuencias humanas más similares a las secuencias de roedores se aceptan como FR humanas del anticuerpo humanizado. Véase, por ejemplo, Sims et al., *J. Immunol.* 151: 2296-2308 (1993) y Chothia et al., *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987). En otro método, se usan armazones particulares derivados de secuencias comunes de todos los anticuerpos humanos para subgrupos particulares de la cadena ligera o cadena pesada. Se pueden usar los mismos armazones para algunos anticuerpos humanizados diferentes. Véase, por ejemplo, Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 4285-4289 (1992) y Presta et al., *J. Immunol.* 151: 2623-2632 (1993).

Además, generalmente es deseable que el anticuerpo humanizado mantenga una alta afinidad de unión por el antígeno y otras propiedades biológicas preferidas. Con el fin de lograr este objetivo, de acuerdo con un método, el anticuerpo humanizado se prepara por la etapa de analizar secuencias parentales y varios productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y secuencias humanizadas. En general, se puede usar un modelo de inmunoglobulina tridimensional y es conocido por los expertos en la técnica. Se puede usar un programa informático que ilustra e indica posibles conformaciones tridimensionales de secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. Estas indicaciones se pueden estudiar para analizar las posibles funciones de los restos en las funciones de las secuencias de inmunoglobulinas candidatas, es decir, para analizar los restos que influyen en la capacidad de las inmunoglobulinas candidatas para unirse al antígeno. Por este método, se pueden seleccionar los restos de FR de una secuencia receptora y una secuencia de importación y combinarse para lograr así características de anticuerpo deseables tales como afinidad de unión mejorada por uno o más antígenos diana (p. ej., EphA4 o un fragmento del mismo).

No hace falta decir que el anticuerpo de la presente descripción también incluye un anticuerpo derivado del anticuerpo quimérico o el anticuerpo humanizado ilustrado antes por modificación genética adecuada (p. ej., la modificación del anticuerpo o la sustitución, adición y/o eliminación parcial de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo) de modo que el anticuerpo mantenga sus funciones (o se imparta una función al anticuerpo o se mejore una función del anticuerpo). Más específicamente, un anticuerpo que carece de lisina (Lys) situada en el extremo carboxi (extremo C) de la cadena pesada por un método artificial tal como la modificación genética con el fin de reducir la heterogeneidad

de los anticuerpos producidos por células productoras de anticuerpos también se incluye en el alcance de la presente invención. Además, un anticuerpo que tiene secuencias de aminoácidos modificadas en la región constante para modificar una función efectora del anticuerpo, tal como un anticuerpo en el que la valina (Val) en la posición 234 del anticuerpo IgG₂ humano con la numeración Eu se ha sustituido por alanina (Ala), y la glicina (Gly) en la posición 237 se ha sustituido por alanina (Ala) para así reducir la actividad de la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o de la fagocitosis mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCP) también se incluye en el alcance de la presente invención. Además, un anticuerpo biespecífico (Kontermann (2012), *mAbs* 4, 182-97) que tiene, junto con una región de unión al anticuerpo que tiene secuencias de CDR del anticuerpo de la presente invención, una región de unión al antígeno que se une a otro antígeno también está incluido en el alcance de la presente invención.

El anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de la presente descripción se puede modificar, si se desea. La modificación del anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de la presente descripción puede ser una modificación que cambie (a) la estructura tridimensional de una secuencia de aminoácidos en una región de modificación, tal como la conformación de hoja o hélice; (b) la carga eléctrica o el estado hidrófobo de la molécula en un sitio diana; o (c) los efectos de una modificación en el mantenimiento del volumen de la cadena lateral, o puede ser una modificación por la cual estos cambios no se observan claramente.

La modificación del anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de la presente descripción se puede lograr, por ejemplo, por la sustitución, eliminación y/o adición de un resto o restos de aminoácidos constituyentes.

En la presente memoria descriptiva, el aminoácido se usa en su sentido más amplio e incluye no solo aminoácidos naturales, por ejemplo, serina (Ser), asparagina (Asn), valina (Val), leucina (Leu), isoleucina (Ile), alanina (Ala), tirosina (Tyr), glicina (Gly), lisina (Lys), arginina (Arg), histidina (His), ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu), glutamina (Gln), treonina (Thr), cisteína (Cys), metionina (Met), fenilalanina (Phe), triptófano (Trp) y prolina (Pro), sino aminoácidos no naturales tales como variantes y derivados de aminoácidos. Los expertos en la técnica comprenden naturalmente, teniendo en cuenta esta amplia definición, que los ejemplos del aminoácido en la presente memoria descriptiva incluyen: L-aminoácidos; D-aminoácidos; aminoácidos químicamente modificados tales como variantes de aminoácidos y derivados de aminoácidos; aminoácidos, tales como norleucina, β -alanina y ornitina, que no sirven como materiales que constituyen proteínas in vivo; y compuestos sintetizados químicamente que tienen las características de los aminoácidos generalmente conocidos por los expertos en la técnica. Ejemplos de aminoácidos no naturales incluyen α -metilaminoácidos (α -metilalanina, etc.), D-aminoácidos (ácido D-aspártico, ácido D-glutámico, etc.), aminoácidos similares a la histidina (2-amino-histidina, β -hidroxi-histidina, homohistidina, α -fluorometil-histidina, α -metil-histidina, etc.), aminoácidos que tienen metileno adicional en sus cadenas laterales ("homo" aminoácidos), y aminoácidos en los que un grupo funcional ácido carboxílico en la cadena lateral se reemplaza con un grupo ácido sulfónico (ácido cisteico, etc.).

Los restos de aminoácidos de origen natural se pueden clasificar en, por ejemplo, los siguientes grupos en función de las características generales de la cadena lateral:

(1) restos hidrófobos: Met, Ala, Val, Leu e Ile;

(2) restos hidrófilos neutros: Cys, Ser y Thr;

(3) restos ácidos: Asp y Glu;

(4) restos básicos: Asn, Gln, His, Lys y Arg;

(5) restos que influyen en la orientación de la cadena: Gly y Pro; y

(6) restos aromáticos: Trp, Tyr y Phe.

La sustitución no conservadora de una secuencia de aminoácidos que constituye el anticuerpo o su fragmento de unión al antígeno se puede realizar reemplazando un aminoácido que pertenece a uno de estos grupos por un aminoácido que pertenece a cualquiera de los otros grupos. Se puede realizar una sustitución más conservadora reemplazando un aminoácido que pertenece a uno de estos grupos por otro aminoácido que pertenece al mismo grupo que él. Asimismo, la eliminación o la sustitución en una secuencia de aminoácidos se puede realizar de manera adecuada.

La modificación de aminoácido o aminoácidos que constituyen el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno del mismo puede ser, por ejemplo, una modificación postraduccional tal como glicosilación con un azúcar, acetilación o fosforilación. El anticuerpo se puede glicosilar en una posición conservada en su región constante. La glicosilación del anticuerpo normalmente es del tipo unida a N o unida a O. La glicosilación unida a N significa la unión de un resto de carbohidrato a la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias de tripéptidos asparagina-X-serina, asparagina-X-treonina y asparagina-X-cisteína (en donde X es cualquier aminoácido distinto de prolina) son secuencias de reconocimiento para añadir enzimáticamente un resto de carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. Cualquiera de estas secuencias de tripéptidos está presente en el anticuerpo o en el fragmento de unión

al antígeno del mismo, de modo que está presente un sitio de glicosilación potencial. La glicosilación unida a O puede ser la unión de N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxiaminoácido (p. ej., serina o treonina), o puede ser la unión de las mismas a 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina en algunos casos. Los expertos en la técnica pueden seleccionar adecuadamente las condiciones de glicosilación (en el caso de realizar la glicosilación mediante el uso de un enfoque biológico, por ejemplo, células hospedantes y el tipo y pH de un medio celular) según el propósito.

El anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de la presente invención se puede modificar adicionalmente usando otros métodos de modificación solos o en combinación basándose en el sentido común técnico generalmente conocido por los expertos en la técnica.

El anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de la presente invención se puede producir por un método bien conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, un hibridoma que produce el anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de la presente invención, se puede usar para producir un anticuerpo, o un gen que codifica el anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de la presente invención, se puede integrar en un vector de expresión, que después se puede transferir a células de *E. coli*, células COS de mono, células de ovario de hámster chino (CHO) o similares para producir un anticuerpo. El gen que codifica el anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de la presente invención, preferiblemente tiene ADN que codifica una secuencia señal y más preferiblemente tiene ADN que codifica una secuencia señal en cada uno de los extremos 5' del ADN que codifica la región variable de la cadena pesada y ADN que codifica la región variable de la cadena ligera. La secuencia señal son los restos de aminoácidos situados en el extremo N de una proteína, que son necesarios para que una proteína secretora o una proteína de membrana integral pase a través de la bicapa lipídica después de ser sintetizada en el ribosoma. La secuencia señal de acuerdo con la presente descripción no está particularmente limitada siempre que la secuencia tenga esta función. Ejemplos de la secuencia señal que puede estar contenida en el anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de la presente invención, incluyen secuencias señal derivadas de un ser humano, un ratón, una rata, un conejo, un burro, una cabra, un caballo, un pollo, un perro, un gato, una levadura y similares. Un aspecto específico de la secuencia señal incluye un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 55 como la secuencia señal para la cadena pesada, y un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 58 como la secuencia señal para la cadena ligera. La secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 10, la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 55, la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 12 o la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 58 pueden tener la sustitución, adición y/o eliminación de uno o más (p. ej., 2, 3, 4 o 5) aminoácidos siempre que la secuencia resultante sea funcionalmente equivalente a la misma.

El anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de la presente invención se puede aislar o purificar de acuerdo con un método generalmente conocido por los expertos en la técnica. En este contexto, el término "aislado" o "purificado" significa estar aislado o purificado artificialmente de un estado natural. Cuando una molécula o composición de origen natural se altera o elimina de su entorno original, o ambos, la molécula o la composición se "aisla" o "se purifica". Los ejemplos del método de aislamiento o purificación incluyen enfoques electroforéticos, biológicos moleculares, inmunológicos y cromatográficos e incluyen específicamente, pero no se limitan a, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, cromatografía de HPLC de fase inversa y electroforesis de enfoque isoelectrico.

En la presente invención, el anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo tiene las siguientes CDR:

(a) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 27;

(b) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 29;

(c) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 30;

(d) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 31;

(e) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 32; y

(f) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 33.

En una realización de la presente invención, el anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo es un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico, preferiblemente un anticuerpo humanizado.

En un aspecto preferido alternativo de la presente descripción, el anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo tiene las siguientes CDR:

(a) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 26;

(b) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 28;

(c) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 30;

(d) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 31;

(e) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 32; y

(f) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 33.

En la presente invención, el anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo tiene las siguientes CDR:

(a) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 27;

(b) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 29;

(c) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 30;

(d) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 31;

(e) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 32; y

(f) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 33.

En un aspecto preferido alternativo de la presente descripción, el anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, una región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 11 o una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia por la sustitución, adición y/o eliminación de uno o más aminoácidos, y una región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 13 o una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia por la sustitución, adición y/o eliminación de uno o más aminoácidos.

En un aspecto preferido alternativo de la presente descripción, el anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde una región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 66, 68, 70, 72, 74 o 76, o una derivada de la secuencia por la sustitución, adición y/o eliminación de uno o más aminoácidos derivada de dicha secuencia por sustitución, adición y/o eliminación de uno o más aminoácidos, y una región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 78, 80, 82 u 84, o una secuencia de aminoácidos derivada de dicha secuencia por la sustitución, adición y/o eliminación de uno o más aminoácidos.

En este contexto, la expresión "o más" usada para la región variable de la cadena pesada o la región variable de la cadena ligera en el anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de la presente descripción, no está limitada siempre que se mantenga la afinidad por EphA4 e inhiba la unión entre EphA4 y la efrina. La expresión "o más" es de 2 a 15, más preferiblemente de 2 a 10, por ejemplo, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 o 2 o está dentro del 10%, por ejemplo, dentro del 9%, dentro del 8%, dentro del 7%, dentro del 6%, dentro del 5%, dentro del 4%, dentro del 3%, dentro del 2%, o dentro del 1% del número de aminoácido en la secuencia de aminoácidos.

En una realización preferida alternativa de la presente descripción, el anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo comprende una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera, la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 11, y la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 13.

En una realización preferida alternativa de la presente descripción, el anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo comprende una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera, en donde dicha región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 66, 68, 70, 72, 74 o 76, y dicha región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 78, 80, 82 u 84.

En una realización preferida alternativa de la presente descripción, el anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo comprende una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera, en donde

dicha región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 66, y dicha región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 78, o

dicha región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 68, y dicha región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 78, o

dicha región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 70, y dicha región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 78, o

En una realización preferida alternativa de la presente descripción, un anticuerpo anti-EphA4 o un fragmento de unión a EphA4 del mismo comprende una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera, en donde

5 dicha región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 66, y dicha región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 84, o

dicha región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 68, y dicha región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 84, o

10 dicha región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 70, y dicha región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 84, o

15 dicha región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 72, y dicha región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 84, o

dicha región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 74, y dicha región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 84, o

20 dicha región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 76, y dicha región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 84.

25 En una realización específica de la presente invención, un anticuerpo anti-EphA4 o un fragmento de unión a EphA4 del mismo tiene una región constante de IgG₂ humana. Preferiblemente, dicha región constante de IgG₂ humana tiene al menos una mutación de aminoácido seleccionada de C131S, C219S, V234A y G237A (numeración EU). En una realización, dicha región constante de IgG₂ humana tiene una combinación de mutaciones de aminoácidos C131S y C219S. En una realización, dicha región constante de IgG₂ humana tiene una combinación de mutaciones de aminoácidos V234A y G237A. En otra realización, dicha región constante de IgG₂ humana tiene todas las mutaciones de aminoácidos de C131S, C219S, V234A y G237A. En una realización alternativa adicional, dicha región constante de IgG₂ humana no tiene un resto de lisina en el extremo C.

30 En una realización preferida de la presente invención, la región constante de IgG₂ humana comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 62.

35 En una realización específica de la presente invención, un anticuerpo anti-EphA4 o un fragmento de unión a EphA4 del mismo tiene una región constante de IgG humana que consiste en una combinación de IgG₁ humana e IgG₂ humana. Preferiblemente, en dicha región constante de IgG humana, CH1 y una región bisagra son de IgG₁ humana, y CH2 y CH3 son de IgG₂ humana. En una realización, dicha región constante de IgG humana tiene la mutación de aminoácidos V234A o G237A (numeración Eu). En otro aspecto, dicha región constante de IgG humana tiene las mutaciones de aminoácidos V234A y G237A. En un aspecto alternativo adicional, dicha región constante de IgG humana no tiene un resto de lisina en el extremo C.

40 En una realización preferida de la presente invención, la región constante de IgG humana que consiste en una combinación de IgG₁ humana e IgG₂ humana comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 60.

En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de la presente invención.

45 La composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de la presente invención puede comprender además un vehículo, excipiente y/o estabilizante farmacéuticamente aceptable en forma de una preparación acuosa o seca. Los ejemplos del vehículo, excipiente y/o estabilizante aceptables incluyen: solución salina fisiológica; soluciones tampón de fosfato, citrato u otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular; proteínas (p. ej., albúmina sérica, gelatina e inmunoglobulinas); polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos, incluyendo glucosa, manosa y dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcar tales como manitol y sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; y tensioactivos no iónicos tales como TWEEN (marca registrada), PLURONICS (marca registrada) y PEG.

55 La composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de la presente invención puede estar incluida, por ejemplo, en una microcápsula, un sistema de suministro de fármaco coloidal (p. ej., un liposoma, una microesfera de albúmina, una microemulsión, una nanopartícula o nanocápsula) o

una microemulsión. Cuando se desea la administración de liberación sostenida del anticuerpo para una preparación que tiene propiedades de liberación adecuadas para cualquier enfermedad que necesite la administración del anticuerpo, se puede pretender que el anticuerpo esté microencapsulado. Ejemplos de la matriz de liberación sostenida incluyen políster, hidrogeles (p. ej., poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) y poli(alcohol vinílico)), poli(ácidos lácticos), copolímeros de ácido L-glutámico y L-glutamato de γ -etilo, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradable (microesferas para inyección constituidas por un copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) tales como LUPRON DEPOT (marca registrada) y poli(ácido D-(-)-3-hidroxibutírico).

En un aspecto, el anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de la presente invención puede inhibir la unión entre EphA4 y su ligando. Por lo tanto, la composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de la presente invención puede ser útil en el tratamiento de la ELA. Específicamente, un aspecto alternativo de la presente descripción abarca un método para tratar la ELA, que comprende la etapa de administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de la presente invención a un sujeto. Un aspecto alternativo de la presente descripción abarca el uso del anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de la presente invención para producir un fármaco terapéutico para la ELA. Un aspecto alternativo de la presente invención abarca el anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo para su uso en un método para tratar la ELA.

El anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de la presente invención se puede usar solo o en combinación con un fármaco o composición adicional en el método de tratamiento. Por ejemplo, el anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de la presente invención se puede administrar al mismo tiempo o en momentos diferentes con un fármaco adicional. Dicha terapia de combinación incluye la administración combinada (dos o más fármacos están contenidos en la misma preparación o preparaciones separadas) y la administración separada (p. ej., concurrente o continua). En el caso de administrar por separado dos o más fármacos, el anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de la presente invención se puede administrar antes o después del método de tratamiento concomitante.

El sujeto para administrar la composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de la presente invención no está limitado, y la composición farmacéutica de la presente invención se puede usar para, por ejemplo, un ser humano o un mamífero no humano (un mono, un ratón, una rata, un conejo, ganado, un caballo, una cabra, etc.).

El método para administrar la composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de la presente invención al sujeto (vía de administración, dosis, número de dosis por día, momento de administración, etc.) no es limitado y puede ser determinado adecuadamente por los expertos en la técnica (p. ej., un médico) de acuerdo con el estado de salud del sujeto, la gravedad de la enfermedad, el tipo de fármaco que se va a usar en combinación con el mismo, etc.

Los expertos en la técnica deben comprender que la presente invención se puede llevar a cabo por uno cualquiera de o una combinación adecuada de dos o más de todos los aspectos descritos en la presente memoria descriptiva, a menos que surja una contradicción técnica. Además, los expertos en la técnica deben entender que la presente invención se puede llevar a cabo preferiblemente por una combinación adecuada de todos los aspectos preferibles o ventajosos descritos en la presente memoria descriptiva, a menos que surja una contradicción técnica.

La bibliografía citada en la presente memoria descriptiva se proporciona simplemente con el propósito de describir técnicas relacionadas antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. No debe entenderse que los autores de la presente invención admitan no tener ningún derecho antes de dicha descripción debido a las invenciones anteriores o cualquier otra razón. Todas las declaraciones de esta bibliografía se basan en información que ha estado disponible por los autores de la presente invención, y no se admite que el contenido de estas declaraciones sea exacto.

Los términos de la presente memoria descriptiva se usan para ilustrar realizaciones particulares y no pretenden limitar la invención.

El término "comprender" usado en la presente memoria descriptiva significa que los elementos descritos (miembros, etapas, factores, números, etc.) están presentes y la presencia de los otros elementos (miembros, etapas, factores, números, etc.) no está excluida de estos, a menos que el contexto evidentemente requiera una interpretación diferente. La expresión "consiste en" abarca aspectos descritos por las expresiones "consiste en" y/o "consisten esencialmente en".

La expresión "actividad neutralizante" usado en la presente memoria descriptiva significa la actividad de inhibir la unión entre EphA4 y su ligando y/o la actividad de inhibir la transducción de señales o la respuesta de expresión molecular o cambio funcional de las células inducido por la unión entre EphA4 y su ligando en el cuerpo vivo de un ser humano.

Todos los términos (incluyendo términos técnicos y términos científicos) usados en el presente documento tienen los mismos significados que los entendidos en un sentido amplio por los expertos en la técnica a la que pertenece la presente invención, a menos que se defina lo contrario. Los términos usados en el presente documento deben interpretarse como que tienen significados de acuerdo con los significados en la presente memoria descriptiva y los

campos técnicos relacionados y no deben interpretarse en un sentido idealizado o excesivamente formal, a menos que se defina lo contrario.

Términos tales como "primero" o "segundo" se usan para expresar varios factores. Sin embargo, se entiende que estos factores no están limitados por estos términos en sí mismos. Estos términos se usan simplemente para diferenciar un factor de los otros factores. Por ejemplo, el primer factor se puede describir como el segundo factor, y viceversa, sin apartarse del alcance de la presente invención.

En la presente memoria descriptiva, debe entenderse que los valores numéricos usados para indicar el contenido de componentes, intervalos numéricos, etc., están modificados por el término "aproximadamente" a menos que se especifique lo contrario. Por ejemplo, "4°C" se interpreta con el significado de "aproximadamente 4°C" a menos que se especifique lo contrario. Los expertos en la técnica pueden comprender naturalmente su alcance de forma racional de acuerdo con el sentido común técnico y el contexto de la presente memoria descriptiva.

Debe entenderse que cada aspecto indicado en una forma singular usado en la presente memoria descriptiva y reivindicaciones puede estar en una forma plural, y viceversa, a menos que el contexto requiera evidentemente una interpretación diferente y a menos que surja una contradicción técnica.

En lo sucesivo, la presente invención se describirá con más detalle con referencia a los ejemplos. Sin embargo, la presente invención se puede realizar mediante varios aspectos y no se pretende que esté limitada por los ejemplos descritos en el presente documento.

Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de anticuerpo monoclonal anti-EphA4 de ratón

Preparación de anticuerpo monoclonal de ratón anti-EphA4 de ratón

Con el fin de preparar un anticuerpo monoclonal que se une a EphA4 de ratón (número de acceso de GenBank NP_031962.2, SEQ ID NO: 1), se preparó una proteína de una región extracelular de EphA4 de ratón (posiciones 20 a 547) (SEQ ID NO: 2) fusionada con fosfatasa alcalina secretada (SEAP) y marcador de histidina (en lo sucesivo, denominada "proteína de región extracelular de EphA4 de ratón-SEAP-His", SEQ ID NO: 43) mediante las siguientes etapas.

Primero, una secuencia de ADN que codifica la secuencia señal (SEQ ID NO: 42) y la región extracelular (SEQ ID NO: 2) de EphA4 de ratón se amplificó por RT-PCR usando ARN total derivado de cerebro de ratón y se clonó en el sitio Sall/NotI de un vector pENTR1A (Invitrogen/Life Technologies) que tiene una secuencia de ADN que codifica SEAP y el marcador de histidina. A continuación, la secuencia de ADN que codifica la secuencia señal y la región extracelular de EphA4 de ratón, SEAP y marcador de histidina se transfirió a un vector pcDNA3.1_rfcB por reacción LR usando el Gateway System (Invitrogen/Life Technologies) para construir un vector de expresión de pcDNA3.1 - región extracelular de EphA4 de ratón-SEAP-His. Se transfectaron células HEK293EBNA (Invitrogen/Life Technologies) con el vector de expresión de pcDNA3.1-región extracelular de EphA4 de ratón-SEAP-His construido usando TransIT-LT1 (TAKARA). Después de incubación (5% de CO₂, 37°C) durante 6 días, se recuperó el líquido sobrenadante del cultivo. A partir del líquido sobrenadante del cultivo recuperado, la proteína de región extracelular de EphA4 de ratón-SEAP-His (SEQ ID NO: 43) se purificó usando la columna Protino (MACHEREY-NAGEL).

Se mezclaron 20 µg de la proteína de región extracelular de EphA4 de ratón-SEAP-His con la misma cantidad de adyuvante TiterMax Gold (TiterMax USA) o adyuvante GERBU (GERBU Biotechnik), y la mezcla se inyectó por vía subcutánea en la planta de la pata de un ratón Balb/c. Después, los días 3, 7 y 10, se administró la proteína de región extracelular de EphA4 de ratón-SEAP-His de la misma forma que antes. En esta operación, el adyuvante TiterMax Gold (TiterMax EE.UU.) se usó solo para el día 10, y el adyuvante GERBU (GERBU Biotechnik) se usó para los días 3, 7 y 10. El día 13, el ratón se sacrificó y se recuperó el ganglio linfático periférico para preparar las células de ganglio linfático. Las células de ganglio linfático preparadas y células de mieloma P3U1 (amablemente proporcionadas por la Universidad de Kyoto) se fusionaron en una proporción de 5:1 en presencia de GenomONE-CF (Ishihara Sangyo Kaisha). Las células fusionadas se cultivaron en una placa de plástico de 96 pocillos. Después de la incubación (5% de CO₂, 37°C) durante 7 días, se recuperó el líquido sobrenadante del cultivo.

El líquido sobrenadante del cultivo obtenido se usó para recoger un pocillo que tenía reactividad con EphA4 de ratón, rata y humano y actividad inhibidora frente a la unión entre EphA4 de ratón y la efrina A1 de ratón.

La reactividad con EphA4 de ratón, rata y humano se evaluó por ELISA usando una proteína de la región extracelular de EphA4 de ratón, la región extracelular (posiciones 20 a 547) de EphA4 de rata (número de acceso de GenBank NP_001155883.1), o la región extracelular (posiciones 20 a 547) (SEQ ID NO: 4) de EphA4 humano (número de acceso de GenBank NP_004429.1, SEQ ID NO: 3) fusionada con una región Fc de IgG1 humana y marcador de histidina (en lo sucesivo, denominada "proteína de región extracelular de EphA4 de ratón-Fc-His", "proteína de región extracelular de EphA4 de rata-Fc-His" o "proteína de región extracelular de EphA4 humana-Fc-His", respectivamente).

La proteína de región extracelular de EphA4 de ratón, rata o humano-Fc-His se preparó por las siguientes etapas. Primero, se construyó un vector de expresión de pcDNA3.1-región extracelular de EphA4 de ratón, rata o humano-Fc-His. Primero, se amplificó una secuencia de ADN que codifica la secuencia señal y la región extracelular de EphA4 de ratón, rata o humano por RT-PCR usando ARN total derivado de cerebro de ratón, rata o humano y se clonó en el sitio Sall/NotI de un vector pENTR1A (Invitrogen/Life Technologies) que tiene una secuencia de ADN que codifica Fc y el marcador de histidina. A continuación, la secuencia de ADN que codifica la secuencia señal y la región extracelular de EphA4 de ratón, rata o humano, Fc y marcador de histidina se transfirió a un vector pcDNA3.1_rfcB a través de la reacción LR usando el Gateway System (Invitrogen/Life Technologies) para construir un vector de expresión de pcDNA3.1-región extracelular de EphA4 de ratón, rata o humano-Fc-His. Se transfectaron células HEK293EBNA (Invitrogen/Life Technologies) con cada uno de los vectores de expresión construidos usando TransIT-LT1 (TAKARA). Después de incubación (5% de CO₂, 37°C) durante 6 días, se recuperó el líquido sobrenadante de cada cultivo.

Se llevó a cabo un ELISA usando la proteína de región extracelular de EphA4 de ratón, rata o humano-Fc-His de acuerdo con las siguientes etapas. Cada pocillo de una placa de 96 pocillos (Nunc) se recubrió con un anticuerpo anti-IgG humana (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Después de incubación durante la noche a 4°C, cada pocillo se bloqueó con 1 x BlockAce (Sumitomo Dainippon Pharma) a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar tres veces con Tween 20/PBS al 0,02% (Nacalai Tesque), se añadió a cada pocillo el líquido sobrenadante de cultivo que contenía la proteína de región extracelular de EphA4 de ratón, rata o humano-Fc-His (concentración final: 1 nM) y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar tres veces, se añadió a cada pocillo el líquido sobrenadante de cultivo de las células fusionadas. Después de la incubación a temperatura ambiente durante 1 hora y el posterior lavado tres veces, se añadió al mismo un anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con peroxidasa de rábano picante (Jackson ImmunoResearch Laboratories) y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar tres veces, se añadió una solución de TMBZ (3,3',5,5'-tetrametilbencidina, Sigma-Aldrich) a cada pocillo y se incubó a temperatura ambiente durante 5 a 20 minutos. Se añadió a cada pocillo una cantidad igual de una solución de parada de la reacción (H₂SO₄ 2 N, Wako Pure Chemical Industries). La absorbancia a 450 nm se leyó usando un lector de microplacas (PerkinElmer).

La actividad inhibidora frente a la unión entre EphA4 de ratón y la efrina A1 de ratón se evaluó de acuerdo con las siguientes etapas. Cada pocillo de una placa de 96 pocillos (Nunc) se recubrió con un anticuerpo anti-fosfatasa alcalina (Seradyn). Después de la incubación durante la noche a 4°C, cada pocillo se bloqueó con 1 x BlockAce (Sumitomo Dainippon Pharma) a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar con Tween 20/PBS al 0,02% (Nacalai Tesque) tres veces, se añadió la proteína región extracelular de EphA4 de ratón-SEAP-His (concentración final: 10 nM) a cada pocillo y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar tres veces, se añadieron a cada pocillo la quimera Efrina A1-Fc (R&D Systems, concentración final: 20 nM) y el líquido sobrenadante de cultivo de las células fusionadas. Después de incubación a temperatura ambiente durante 1 hora y el posterior lavado tres veces, se le añadió un anticuerpo anti-IgG humana marcado con peroxidasa de rábano picante (Jackson ImmunoResearch Laboratories) y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar tres veces, se añadió una solución de TMBZ (3,3',5,5'-tetrametilbencidina, Sigma-Aldrich) a cada pocillo y se incubó a temperatura ambiente durante 5 a 20 minutos. Se añadió a cada pocillo una cantidad igual de una solución de parada de la reacción (H₂SO₄ 2 N, Wako Pure Chemical Industries). La absorbancia a 450 nm se leyó usando un lector de microplacas (PerkinElmer).

Del pocillo recogido a través de estas etapas, se clonó un hibridoma por el método de dilución limitante. Finalmente, se obtuvo un clon de hibridoma que expresa un anticuerpo de ratón anti-EphA4 que tiene actividad de reacción frente a EphA4 de ratón, rata y humano y que tiene actividad inhibidora frente a la unión entre EphA4 de ratón y la efrina A1 de ratón.

El clon de hibridoma obtenido se cultivó y el anticuerpo anti-EphA4 (anticuerpo A) se purificó del líquido sobrenadante de cultivo usando proteína A (GE Healthcare). El isotipo del anticuerpo A se determinó usando un kit de isotipado de anticuerpos monoclonales (Serotec) y era IgG1 para la cadena pesada y κ para la cadena ligera.

45 Análisis de secuencia del anticuerpo A

Las secuencias de ADN que codifican las secuencias señal de la cadena pesada y de la cadena ligera y las regiones variables del anticuerpo A se amplificaron por 5'-RACE (amplificación rápida de extremos 5' de ADNc). Se preparó ARN total a partir del hibridoma usando TRIZOL (Invitrogen/Life Technologies) y se trató con DNasa (Qiagen N.V., conjunto de DNasa sin RNasa). Se preparó ADNc bicatenario a partir del ARN total usando un kit de síntesis de ADNc (TAKARA). Se añadió el adaptador 5' obtenido por la reasociación de oligo-ADN ad29S (ACATCACTCCGT) (SEQ ID NO: 5) y oligo-ADN ad29AS (ACGGAGTGATGTCCGTCGACGTATCTCTGCGTTGATACTTCAGCGTAGCT) (SEQ ID NO: 6) al ADNc. El ADNc obtenido se amplificó usando el cebador directo 5' (cebador 5'-PCR4, AGCTACGCTGAAGTATCAACGCAGAG) (SEQ ID NO: 7) y se usó el cebador inverso 3' (GCCAGTGGATAGACTGATGG) (SEQ ID NO: 8) para la amplificación del gen de la cadena pesada de IgG de ratón, y se usó GATGGATACAGTTGGTGAGC (SEQ ID NO: 9) para la amplificación del gen de la cadena ligera de IgG de ratón. El ADNc amplificado se insertó en un vector pCR2.1 (Invitrogen/Life Technologies). La secuencia del gen del anticuerpo A se analizó usando ABI3130XL. En cuanto a la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia del gen del anticuerpo A identificada por este análisis, la secuencia señal de la cadena pesada se muestra en la SEQ ID NO: 10; la región variable de la cadena pesada se muestra en la SEQ ID NO: 11; la secuencia señal de la cadena ligera se muestra en la SEQ ID NO: 12; y la región variable de la cadena ligera se muestra en la SEQ ID NO: 13. En cuanto a la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia del gen del anticuerpo A, la secuencia señal de la

cadena pesada se muestra en la SEQ ID NO: 14, la región variable de la cadena pesada se muestra en la SEQ ID NO: 15; la secuencia señal de la cadena ligera se muestra en la SEQ ID NO: 16; y la región variable de la cadena ligera se muestra en la SEQ ID NO: 17.

- 5 Las secuencias de longitud completa de la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo A se obtuvieron por las siguientes etapas. Se preparó ARN total a partir del hibridoma usando TRIZOL (Invitrogen/Life Technologies) y se trató con DNasa (Qiagen N.V., conjunto de DNasa sin RNasa). El ADNc se preparó a partir del ARN total usando un kit de síntesis de ADNc (TAKARA). El ADNc obtenido se usó como molde en la PCR para amplificar las secuencias de genes que codifican la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo A usando el cebador directo 5' (GCGAAGCTTGCCGCCACCATGGCTTGGGTGTGGACCTTGC (SEQ ID NO: 18) que se usó para la
- 10 amplificación del gen de la cadena pesada, y GCGAAGCTTGCCGCCACCATGAGTGTGCCCCACTCAGGTCC (SEQ ID NO: 19) se usó para la amplificación del gen de la cadena ligera) y el cebador inverso 3' (GCGGAATTCATCATTTACCAGGAGAGTGGGAGAGGC (SEQ ID NO: 20) se usó para la amplificación del gen de la cadena pesada y CGCGAATTCATACTAATACTCATTCTGTTGAAGCTCTTGAC (SEQ ID NO: 21) se usó para la amplificación del gen de la cadena ligera). Los productos de amplificación se clonaron en vectores pEE6.4 y pEE12.4 (Lonza), respectivamente. Estas secuencias de genes se analizaron usando ABI3130XL. En cuanto a la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia del gen del anticuerpo A identificada por este análisis, la región constante de la
- 15 cadena pesada se muestra en la SEQ ID NO: 22, y la región constante de la cadena ligera se muestra en la SEQ ID NO: 23. En cuanto a la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia del gen del anticuerpo A, la región constante de la cadena pesada se muestra en la SEQ ID NO: 24, y la región constante de la cadena ligera se muestra en SEQ ID NO: 25.
- 20 Las CDR del anticuerpo A se determinaron numerando la secuencia de aminoácidos del anticuerpo A usando el software Abysis (UCL) según el sistema de numeración de Kabat e identificando las CDR según la definición de Kabat o el método de definición de AbM basado en los números. Las secuencias de aminoácidos de CDR y las secuencias de nucleótidos del anticuerpo A se muestran en las Tablas 1 y 2, respectivamente.

[Tabla 1]

25 Tabla 1. Secuencias de aminoácidos de las CDR del anticuerpo A

Nombre	Secuencia
CDR 1 de la cadena pesada (definición de Kabat)	DYSMH (SEQ ID NO: 26)
CDR 1 de la cadena pesada (definición de AbM)	GYTFTDYSMH (SEQ ID NO: 27)
CDR 2 de la cadena pesada (definición de Kabat)	WINTETGEPTYADDFKG (SEQ ID NO: 28)
CDR 2 de la cadena pesada (definición de AbM)	WINTETGEPT (SEQ ID NO: 29)
CDR 3 de la cadena pesada	IPLYYYGSRYWYFDV (SEQ ID NO: 30)
CDR 1 de la cadena ligera	RASENIYRNLA (SEQ ID NO: 31)
CDR 2 de la cadena ligera	AATNLAD (SEQ ID NO: 32)
CDR 3 de la cadena ligera	QHFWGTPWT (SEQ ID NO: 33)

[Tabla 2]

Tabla 2. Secuencias de aminoácidos de las CDR del anticuerpo A

Nombre	Secuencia
CDR 1 de la cadena pesada (definición de Kabat)	GACTATTCAATGCAC (SEQ ID NO: 34)
CDR 1 de la cadena pesada (definición de AbM)	GGTTATACCTTCACAGACTATTCAATGCAC (SEQ ID NO: 35)

Nombre	Secuencia
CDR 2 de la cadena pesada (definición de Kabat)	TGGATAAACTGAGACTGGTGAGCCAACATATG CAGATGACTTCAAGGGA (SEQ ID NO: 36)
CDR 2 de la cadena pesada (definición de AbM)	TGGATAAACTGAGACTGGTGAGCCAACA (SEQ ID NO: 37)
CDR 3 de la cadena pesada	ATTCCCCTCTATTACTACGGTAGTAGGTACTGGTA CTTCGATGTC (SEQ IDNO: 38)
CDR 1 de la cadena ligera	CGAGCAAGTGAGAATATTTACAGAAATTTAGCA (SEQ ID NO: 39)
CDR 2 de la cadena ligera	GCTGCAACAACTTAGCAGAT (SEQ ID NO: 40)
CDR 3 de la cadena ligera	CAACATTTTGGGGTACTCCGTGGACG (SEQ ID NO: 41)

Ejemplo 2: Afinidad de unión del anticuerpo monoclonal anti-EphA4 por EphA4 de ratón y humano

La afinidad de unión del anticuerpo A obtenido en el ejemplo 1 por EphA4 de ratón y humano se determinó por resonancia de plasmón de superficie (SPR) usando Biacore A100 (GE Healthcare). Primero, se inmovilizó un anticuerpo de rata anti-IgG₁ de ratón producido con un procedimiento convencional inmunizando una rata con un anticuerpo IgG₁ de ratón en el chip detector CM5. La inmovilización del anticuerpo de rata anti-IgG₁ de ratón en el chip detector CM5 se llevó a cabo por el método de acoplamiento de amina usando N-hidroxisuccinimida (NHS) e hidrocloreuro de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC). Se usó etanolamina para bloquear (el chip detector y los reactivos para la inmovilización fueron fabricados todos por GE Healthcare). El anticuerpo se diluyó con una solución tampón para inmovilización (acetato de sodio 10 mM, pH 4,5) en 1 a 2 µg/ml y se inmovilizó en el chip detector de acuerdo con el protocolo adjunto a Biacore A100. El anticuerpo A se diluyó con una solución tampón de análisis de HBS-EP (GE Healthcare, BR-1001-88), se inyectó en una celda de flujo durante 120 segundos y se capturó (cantidad de anticuerpo capturado: aproximadamente de 70 a 100 RU). Posteriormente, se añadió al chip detector la región extracelular de EphA4 de ratón o humano-SEAP-His diluida en serie en el intervalo de 50, 25, 12,5, 6,3, 3,1, 1,6, 0,8 y 0 nM usando HBS-EP durante 120 segundos. Las curvas de la reacción de unión se observaron secuencialmente en el momento de la adición (fase de asociación, durante 120 s) y después de completarse la adición (fase de disociación, durante 900 s). Después de completar cada observación, el chip detector se regeneró por la adición de MgCl₂ 3 M (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) (durante 30 segundos). Las curvas de reacción de unión obtenidas se sometieron a análisis de ajuste con modelos de unión 1:1 usando la evaluación del software BIA adjunta al sistema para calcular la afinidad de unión ($K_D = k_d/k_a$) para EphA4 de ratón y humano.

La afinidad de unión (K_D) del anticuerpo A por EphA4 de ratón y humano era de $7,29 \times 10^{-10}$ M y $6,61 \times 10^{-10}$ M, respectivamente (Fig. 1). Otros parámetros de unión para EphA4 de ratón y humano eran casi equivalentes. Por consiguiente, se considera que el anticuerpo A tiene una afinidad de unión equivalente por EphA4 de ratón y humano.

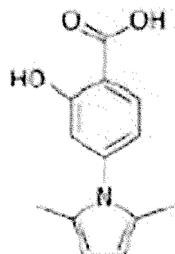
Ejemplo 3: Actividad inhibidora de la unión de EphA4 de ratón-ligando de ratón del anticuerpo monoclonal anti-EphA4

Se evaluó la actividad inhibidora del anticuerpo A obtenido en el ejemplo 1 contra la unión entre EphA4 de ratón y su ligando de ratón de acuerdo con las siguientes etapas. Cada pocillo de una placa de 96 pocillos (Nunc) se recubrió con un anticuerpo anti-fosfatasa alcalina (Thermo Fisher Scientific). Después de la incubación durante la noche a 4°C, cada pocillo se bloqueó con BlockAce al 1% (DS Pharma Biomedical) a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar tres veces con Tween 20/PBS al 0,05% (Thermo Fisher Scientific), se añadió la proteína región extracelular de EphA4 de ratón-SEAP-His obtenida por el método del ejemplo 1 (concentración final: 10 nM) a cada pocillo y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar tres veces, se añadieron a cada pocillo ligandos y anticuerpo A en dilución seriada (0, 0,001, 0,003, 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1,3, 10, 30, 100, 300 y 1000 nM) o un péptido KYL inhibidor de EphA4 conocido (KYLPLYWPVLSL, 0, 0,003, 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30 y 100 µM, su síntesis se subcontrató a Hokkaido System Science) o compuesto 1 (0, 0,03, 0,1, 0,3, 1,3, 10, 30, 100, 300 y 1000 µM, fórmula 1, Matrix Scientific). Los ligandos usados eran la quimera de efrina A1-Fc de ratón (R&D Systems, concentración final: 20 nM) y la quimera de efrina B2-Fc de ratón (R&D Systems, concentración final: 0,6 nM). Después de la incubación a temperatura ambiente durante 1 hora y el posterior lavado tres veces, se le añadió un anticuerpo anti-IgG humana marcado con peroxidasa de rábano picante (Jackson ImmunoResearch Laboratories) y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar tres veces, se añadió una solución de TMBZ (3,3',5,5'-tetrametilbencidina,

Sigma-Aldrich) a cada pocillo y se incubó a temperatura ambiente durante 2 minutos. Se añadió a cada pocillo una cantidad igual de una solución de parada de la reacción (H_2SO_4 1 N, Wako Pure Chemical Industries). La absorbancia a 450 nm se leyó usando un lector de microplaca (Molecular Devices).

Fórmula 1

5 [Fórmula 1]



El anticuerpo A suprimía la unión entre EphA4 de ratón y su ligando de ratón de una manera dependiente de la concentración con valores de CI_{50} de aproximadamente 1,2 y 1,2 nM para la unión a la efrina A1 y efrina B2 de ratón, respectivamente. Los valores de CI_{50} del péptido KYL inhibidor de EphA4 existente eran de aproximadamente 1,3 y 1,3 μM para la unión a la efrina A1 y efrina B2 de ratón, respectivamente (Fig. 2). El compuesto 1 tenía actividad más débil y no se encontró dependencia con la concentración. Por consiguiente, se encontró que el anticuerpo A inhibía la unión entre EphA4 de ratón y el ligando de ratón con la actividad 1.000 o más veces más fuerte que la del péptido KYL inhibidor de EphA4 existente.

15 **Ejemplo 4: Actividad inhibidora de la unión de EphA4 humano-ligando humano del anticuerpo monoclonal anti-EphA4**

Se evaluó la actividad inhibidora del anticuerpo A obtenido en el ejemplo 1 frente a la unión entre EphA4 humano y su ligando humano de acuerdo con las siguientes etapas. Cada pocillo de una placa de 96 pocillos (Nunc) se recubrió con un anticuerpo anti-fosfatasa alcalina (Thermo Fisher Scientific). Después de incubación durante la noche a 4°C, cada pocillo se bloqueó con BlockAce al 1% (DS Pharma Biomedical) a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar tres veces con Tween 20/PBS al 0,05% (Thermo Fisher Scientific), se añadió la proteína de región extracelular EphA4 humana-SEAP-His obtenida por el método del ejemplo 1 (concentración final: 10 nM) a cada pocillo y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar tres veces, se añadieron los ligandos y el anticuerpo A (0, 0,003, 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000 y 3000 nM) o un péptido KYL inhibidor de EphA4 (KYLPLYWPVLSL, 0, 0,003, 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000 y 3000 μM , su síntesis se subcontrató a Toray Research Center) diluidos en serie a cada pocillo. Los ligandos usados eran la quimera de efrina A5-Fc humana biotinilada (R&D Systems, concentración final: 0,7 nM) y quimera de efrina B3-Fc humana biotinilada (R&D Systems, concentración final: 2,3 nM). Después de la incubación a temperatura ambiente durante 1 hora y posterior lavado tres veces, se le añadió estreptavidina marcada con peroxidasa de rábano picante (GE Healthcare) y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar tres veces, se añadió una solución de TMBZ (3,3',5,5'-tetrametilbencidina, Sigma-Aldrich) a cada pocillo y se incubó a temperatura ambiente durante 2 minutos. Se añadió a cada pocillo una cantidad igual de una solución de parada de la reacción (H_2SO_4 1 N, Wako Pure Chemical Industries). La absorbancia a 450 nm se leyó usando un lector de microplacas (Molecular Devices o PerkinElmer).

El anticuerpo A suprimía la unión entre EphA4 humana y su ligando humano de una manera dependiente de la concentración con valores de CI_{50} de aproximadamente 2,7 y 1,9 nM para la unión a la efrina A5 y efrina B3 humanas, respectivamente. Los valores de CI_{50} del péptido KYL inhibidor de EphA4 eran de aproximadamente 6,1 y 1,6 μM para la unión a la efrina A5 y efrina B3 humanas, respectivamente (Fig. 3). Por consiguiente, también se encontró que el anticuerpo A inhibe fuertemente la unión entre EphA4 humano y su ligando humano.

Ejemplo 5: Afinidad de unión del fragmento de unión a EphA4 por EphA4 de ratón y humano

Primero, se prepararon un fragmento Fab y un fragmento F(ab')_2 del anticuerpo A (en lo sucesivo, denominado anticuerpo A-Fab y anticuerpo A- F(ab')_2 , respectivamente) como fragmentos de unión a EphA4.

La preparación del anticuerpo A-Fab se llevó a cabo de acuerdo con las siguientes etapas. En un tubo de 1,5 ml (Eppendorf), el anticuerpo A (4,36 mg/ml, 1 ml), L-cisteína 10 mM (Wako Pure Chemical Industries), EDTA 1 mM (Gibco) y papaína 2,18 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Sigma-Aldrich) se mezclaron y se incubaron a 37°C durante 12 horas. Se añadió yodoacetamida (Wako Pure Chemical Industries) a una concentración final de 50 mM al tubo después de la incubación. Después de terminar la reacción, la solución de anticuerpo se dializó contra PBS (Sigma-Aldrich). A la solución de anticuerpo, se añadió una cantidad igual de Tris-HCl 0,1 M (Sigma-Aldrich)/NaCl 5 M (pH 8,0, Wako Pure Chemical Industries), seguido de purificación usando resina rProtein A FF. Se llenó un tubo de 2 ml con 800 μl de rProtein A FF, que después se equilibró por la adición de 3,5 V.C. cada uno de agua ultrapura y un tampón de unión (Tris-HCl 0,1 M (Sigma-Aldrich)/NaCl 3 M (pH 8,0, Wako Pure Chemical Industries)) en este orden. La solución de anticuerpo

complementada con una cantidad igual de Tris-HCl 0,1 M (Sigma-Aldrich)/NaCl 5 M (Wako Pure Chemical Industries) (pH 8,0) se inyectó en la columna. Se recuperó una solución eluida de la columna (fracción de flujo continuo) y se añadió de nuevo a la columna. Esta operación se repitió tres veces. Después, se recuperó la fracción de flujo continuo de la serie final. El lavado se repitió dos veces mediante la adición de 2,5 ml de un tampón de unión. Las fracciones de flujo continuo y de lavado se dializaron contra PBS para obtener el anticuerpo A-Fab.

La preparación del anticuerpo A-F(ab')₂ se llevó a cabo de acuerdo con las siguientes etapas. Se dializó el anticuerpo A contra un tampón de acetato 0,2 M (pH 4,0, Wako Pure Chemical Industries) durante la noche a 4°C. La solución dializada se recuperó y se filtró a través de un filtro de 0,22 µm (Merck Millipore), y después se cuantificó y la concentración de anticuerpo se ajustó a 4,0 mg/ml. La pepsina (Sigma-Aldrich) se llevó de nuevo a temperatura ambiente y se ajustó a 2,0 mg/ml usando un tampón de acetato 0,2 M (pH 4,0, Wako Pure Chemical Industries). En un tubo de 1,5 ml (Eppendorf), se mezclaron el anticuerpo A (4,0 mg/ml, 800 µl), la solución de pepsina (2,0 mg/ml, 16 µl) y un tampón de acetato 0,2 M (pH 4,0, Wako Pure Chemical Industries) con 64 µl/tubo y se incubaron a 37°C durante 15 horas. La reacción se terminó por la adición de 112 µl/tubo de Tris-base 2 M (Sigma-Aldrich) al tubo después de la incubación. Después, la especie molecular se confirmó por SDS-PAGE. Después de terminar la reacción, la solución de anticuerpo se dializó contra Tris-HCl 100 mM (pH 8,0). Posteriormente, el anticuerpo A-F(ab')₂ se purificó usando rProtein A FF (GE Healthcare, 17-1279-02). Se llenó un tubo de 5 ml con 1 ml de resina de rProteína A, que después se equilibró por la adición de 3,5 V.C. cada uno de agua ultrapura y un tampón de unión en este orden. Se inyectó en la columna la solución de anticuerpo dializada equilibrada por la adición de una cantidad igual de Tris-HCl 0,1 M (Sigma-Aldrich)/NaCl 5 M (pH 8,0, Wako Pure Chemical Industries). Se recuperó una fracción de flujo continuo y se añadió de nuevo a la columna. Esta operación se repitió tres veces. Después, se recuperó la fracción de flujo continuo de la serie final. Después, el lavado se repitió dos veces por la adición de 5 ml de un tampón de unión. Con el fin de eliminar la IgG sin reaccionar, etc., la elución se llevó a cabo con citrato 0,1 M (pH 3,0, Wako Pure Chemical Industries). Después, la especie molecular se confirmó por SDS-PAGE. Las fracciones de flujo continuo y lavado se dializaron contra PBS para obtener el anticuerpo A-F(ab')₂.

A continuación, se determinó la afinidad de unión del anticuerpo A-Fab y el anticuerpo A-F(ab')₂ por EphA4 de ratón y humano por resonancia de plasmón de superficie (SPR) usando Biacore T200 (GE Healthcare). El anticuerpo A obtenido en el ejemplo 1 se usó como control para la comparación de cada fragmento. Primero, se inmovilizó un anticuerpo anti-marcador de His en el chip detector CM5. La inmovilización del anticuerpo anti-marcador de His en el chip detector CM5 se realizó por el método de acoplamiento de amina usando N-hidroxisuccinimida (NHS) e hidrócloruro de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC). Se usó etanolamina para bloquear (el chip detector y los reactivos para la inmovilización eran todos fabricados por GE Healthcare). El anticuerpo se diluyó con una solución de tampón para inmovilización (acetato de sodio 10 mM, pH 4,5) en 3 µg/ml y se inmovilizó en el chip detector de acuerdo con el protocolo adjunto a Biacore T200.

La proteína de región extracelular EphA4 de ratón o humana-SEAP-His se diluyó con una solución de tampón de análisis HBS-EP (GE Healthcare, BR-1001-88), se inyectó en una celda de flujo durante 120 segundos y se capturó (cantidad de proteína capturada: aproximadamente de 10 a 20 RU). Posteriormente, se añadieron el anticuerpo A (50, 16,7, 5,6, 1,9, 0,6 y 0 nM), el anticuerpo A-Fab (500, 166,7, 55,6, 18,5, 6,2 y 0 nM) o el anticuerpo A-F(ab')₂ (50, 16,7, 5,6, 1,9, 0,6 y 0 nM) diluidos en serie usando HBS-EP al chip detector durante 120 segundos. Las curvas de la reacción de unión se observaron secuencialmente en el momento de la adición (fase de asociación, durante 120 s) y después de completarse la adición (fase de disociación, durante 900 s). Después de completar cada observación, el chip detector se regeneró por la adición de MgCl₂ 3 M (Wako Pure Chemical Industries) (durante 30 s). Las curvas de reacción de unión obtenidas se sometieron a análisis de ajuste con modelos de unión 1:1 usando el software de evaluación BIA adjunto al sistema para calcular la afinidad de unión ($KD = kd/ka$) para EphA4 de ratón y humano.

La afinidad de unión (KD) del anticuerpo A-Fab por EphA4 de ratón y humano era de $4,51 \times 10^{-8}$ M y $4,04 \times 10^{-8}$ M, respectivamente (Figs. 4A y 4C). Por otro lado, la afinidad de unión (KD) del anticuerpo A-F(ab')₂ por EphA4 de ratón y humano era de $2,29 \times 10^{-11}$ M y $5,30 \times 10^{-11}$ M, respectivamente (Figs. 4B y 4D).

Ejemplo 6: Actividad inhibidora de la unión de EphA4 de ratón-ligando de ratón del fragmento de unión de EphA4

Se evaluó la actividad inhibidora del anticuerpo A-Fab y el anticuerpo A-F(ab')₂ obtenidos en el ejemplo 5 contra la unión entre EphA4 y su ligando de acuerdo con las siguientes etapas. Cada pocillo de una placa de 96 pocillos (Nunc) se revistió con un anticuerpo anti-fosfatasa alcalina (Thermo Fisher Scientific). Después de incubación durante la noche a 4°C, cada pocillo se bloqueó con BlockAce al 1% (DS Pharma Biomedical) a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar tres veces con Tween 20/PBS al 0,05% (Thermo Fisher Scientific), se añadió la proteína región extracelular EphA4 de ratón-SEAP-His obtenida por el método del ejemplo 1 (concentración final: 10 nM) a cada pocillo y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar tres veces, se añadieron a cada pocillo un ligando y el anticuerpo A (0, 0,003, 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000 y 3000 nM), anticuerpo A-Fab (0, 0,003, 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000 y 3000 nM), anticuerpo A-F(ab')₂ (0, 0,003, 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000 y 3000 nM), o el péptido KYL inhibidor de EphA4 (KYLPLYWPVLSL, 0, 0,0003, 0,001, 0,003, 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000 y 3000 µM, su síntesis se subcontrató al Centro de Investigación Toray) diluidos en serie. El ligando usado era la quimera de efrina B2-Fc de ratón biotinilada (R&D Systems, concentración final: 2,5 nM). Después de incubación a temperatura ambiente durante 1 hora y posterior

lavado tres veces, se le añadió estreptavidina marcada con peroxidasa de rábano picante (GE Healthcare) y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar tres veces, se añadió una solución de TMBZ (3,3',5,5'-tetrametilbencidina, Sigma-Aldrich) a cada pocillo y se incubó a temperatura ambiente durante 2 minutos. Se añadió a cada pocillo una cantidad igual de una solución de parada de la reacción (H_2SO_4 1 N, Wako Pure Chemical Industries). La absorbancia a 450 nm se leyó usando un lector de microplacas (Molecular Devices o PerkinElmer).

Los valores de CI_{50} del anticuerpo A (anticuerpo A-IgG), anticuerpo A-Fab, anticuerpo A-F(ab')₂ y péptido KYL eran de 2,6 (o 3,6) nM, 438,5 nM, 2,9 nM y 5,293 μM , respectivamente (Fig. 5). El anticuerpo A y el anticuerpo A-F(ab')₂ tenían 1000 o más veces la actividad del péptido KYL, y el anticuerpo A-Fab también tenía 10 o más veces la actividad del péptido KYL.

Ejemplo 7: Selectividad del anticuerpo monoclonal anti-EphA4 por el receptor Eph humano

De acuerdo con el método descrito en el ejemplo 1, una secuencia de ADN que codifica la secuencia señal y la región extracelular de cada receptor Eph humano (EphA1, EphA2, EphA3, EphA4, EphA5, EphA6, EphA7, EphA8, EphA10, EphB1, EphB2, EphB3, EphB4 y EphB6) se amplificó por RT-PCR usando ARN total derivado de tejido y se clonó en un vector pENTR1A (Invitrogen/Life Technologies) que tiene una secuencia de ADN que codifica una región Fc de IgG1 humana y marcador de histidina. A continuación, la secuencia de ADN que codifica la secuencia señal y la región extracelular de cada receptor Eph humano, Fc y marcador de histidina se transfirió a un vector pcDNA3.1_{-rfcB} a través de la reacción LR usando el Gateway System (Invitrogen/Life Technologies) para construir un vector para la expresión de una proteína de la región extracelular de cada receptor Eph humano fusionada con la región Fc de IgG1 humana y el marcador de His (denominada "proteína de región extracelular del receptor Eph-Fc-His") (este vector se denomina "vector de expresión de la proteína de región extracelular del receptor Eph-Fc-His").

A continuación, se inocularon células HEK293EBNA (Life Technologies) en una placa de 10 cm (Falcon) y se cultivaron a 37°C durante 1 día. Las células HEK293EBNA se transfectaron con cada vector de expresión de la proteína de región extracelular del receptor Eph humano-Fc-His obtenidos anteriormente usando TransIT-LT1 (TAKARA). Después de incubación (5% de CO_2 , 37°C) durante 4 días, se recuperó el líquido sobrenadante del cultivo y se centrifugó a 1500 rpm a temperatura ambiente durante 5 minutos. El líquido sobrenadante de la centrifugación se filtró a través de un filtro de 0,22 μm (Merck Millipore) y se le añadieron Hepes (Dojindo Laboratories) y azida sódica (Wako Pure Chemical Industries) en concentraciones finales de 20 mM y 0,02%, respectivamente.

Se evaluó la actividad de unión del anticuerpo A frente a cada receptor Eph humano de acuerdo con las siguientes etapas.

Cada pocillo de una placa de 96 pocillos (Nunc) se recubrió con un anticuerpo de burro anti-IgG humana (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Después de incubación durante la noche a 4°C, cada pocillo se bloqueó con BlockAce al 1% (DS Pharma Biomedical) a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar con Tween 20/PBS al 0,05% (Nacalai Tesque) tres veces, cada proteína de región extracelular del receptor Eph humano-Fc-His se diseminó (concentración final: 1 nM) en cada pocillo y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar tres veces, se añadieron a cada pocillo una solución de IgG humana (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Mitsubishi Pharma) y el anticuerpo A (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadió a los mismos anticuerpo de burro anti-IgG de ratón marcado con peroxidasa de rábano picante (Jackson ImmunoResearch Laboratories) y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar tres veces, se añadió a cada pocillo una solución de TMBZ (3,3' 5,5'-tetrametilbencidina, Sigma-Aldrich). Después de la confirmación de desarrollo moderado del color, se añadió a cada pocillo una cantidad igual de una solución de parada de la reacción (H_2SO_4 1 N, Wako Pure Chemical Industries). La absorbancia a 450 nm se leyó usando un lector de microplacas (PerkinElmer).

El anticuerpo A tenía específicamente actividad de reacción solo con EphA4 humano entre los miembros de la familia del receptor Eph humano (Fig. 6A).

Ejemplo 8: Selectividad del anticuerpo monoclonal anti-EphA4 para el receptor Eph de ratón

De acuerdo con el método descrito en el ejemplo 1, se amplificó una secuencia de ADN que codifica la secuencia señal y la región extracelular de cada receptor Eph de ratón (EphA1, EphA3, EphA4, EphA5, EphA6, EphA7, EphA8, EphA10, EphB1, EphB2, EphB3, EphB4, y EphB6) por RT-PCR usando ARN total derivado de tejido y se clonó en un vector pENTR1A (Invitrogen/Life Technologies) que tiene una secuencia de ADN que codifica una región Fc de IgG1 humana y marcador de histidina. A continuación, la secuencia de ADN que codifica la secuencia señal y la región extracelular de cada receptor Eph de ratón (EphA1, EphA3, EphA4, EphA5, EphA6, EphA7, EphA8, EphA10, EphB1, EphB2, EphB3, EphB4 y EphB6), Fc, y el marcador de histidina se transfirió a un vector pcDNA3.1_{-rfcB} a través de la reacción LR usando el Gateway System (Invitrogen/Life Technologies) para construir cada vector de expresión de la proteína de región extracelular del receptor Eph de ratón-Fc-His. Para la construcción de un vector de expresión de la proteína de región extracelular de EphA2 de ratón-Fc-His, se amplificó una secuencia de ADN que codifica la secuencia señal y la región extracelular de EphA2 de ratón por RT-PCR usando ARN total derivado de tejido y se clonó en un vector pcDNA3.1 que tiene una secuencia de ADN que codifica Fc y el marcador de histidina para construir un vector de expresión de la proteína de región extracelular de EphA2 de ratón-Fc-His.

A continuación, se inocularon células HEK293EBNA (Life Technologies) en una placa de 10 cm (Falcon o BD Biosciences) y se cultivaron a 37°C durante 1 día. Las células HEK293EBNA se transfectaron con el vector de expresión de la proteína de región extracelular de EphA1, EphA2, EphA3, EphA4, EphA5, EphA6, EphA7, EphA8, EphA10, EphB1, EphB2, EphB3, EphB4 o EphB6 de ratón-Fc-His obtenido como se ha descrito antes usando TransIT-LT1 (TAKARA). Después de incubación (5% de CO₂, 37°C) durante 4 días, se recuperó el líquido sobrenadante del cultivo y se centrifugó a 1500 rpm a temperatura ambiente durante 5 minutos. El líquido sobrenadante de la centrifugación se filtró a través de un filtro de 0,22 µm (Merck Millipore) y se le añadieron Hepes (Dojindo Laboratories) y azida sódica (Wako Pure Chemical Industries) en concentraciones finales de 20 mM y 0,02%, respectivamente.

Se evaluó la actividad de unión del anticuerpo A frente a cada receptor Eph de ratón de acuerdo con las siguientes etapas.

Cada pocillo de una placa de 96 pocillos (Nunc) se recubrió con un anticuerpo de burro anti-IgG humana (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Después de incubación durante la noche a 4°C, cada pocillo se bloqueó con BlockAce al 1% (DS Pharma Biomedical) a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar con Tween 20/PBS al 0,05% (Thermo Fisher Scientific) tres veces, se inoculó cada proteína de región extracelular del receptor Eph de ratón-Fc-His (concentración final: 1 nM) en cada pocillo y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar tres veces, se añadieron a cada pocillo una solución de IgG humana (100 µg/ml, Sigma-Aldrich) y el anticuerpo A (10 µg/ml) y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadió a los mismos un anticuerpo de burro anti-IgG de ratón marcado con peroxidasa de rábano picante (Jackson ImmunoResearch Laboratories) y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar tres veces, se añadió a cada pocillo una solución de TMBZ (3,3',5,5'-tetrametilbencidina, Sigma-Aldrich). Después de confirmar el desarrollo moderado de color, se añadió a cada pocillo una cantidad igual de una solución de detención de la reacción (H₂SO₄ 1 N, Wako Pure Chemical Industries). La absorbancia a 450 nm se leyó usando un lector de microplacas (PerkinElmer).

El anticuerpo A tenía específicamente actividad de reacción sólo con EphA4 de ratón entre los miembros de la familia de receptores Eph de ratón (Fig. 6B).

Ejemplo 9: Reactividad del anticuerpo monoclonal anti-EphA4 con EphA4 de ratón, rata, mono y humano

Se prepararon proteínas de región extracelular de EphA4 de ratón, rata, mono y humano-Fc-His de acuerdo con las siguientes etapas. Primero, de acuerdo con el método descrito en el ejemplo 1, se construyó un vector de expresión de la proteína de región extracelular de EphA4 de mono-Fc-His. La secuencia de aminoácidos de EphA4 de mono usada en la construcción del vector se muestra en la SEQ ID NO: 44, y su región extracelular se muestra en la SEQ ID NO: 45. A continuación, se inocularon células HEK293EBNA (Life Technologies) en una placa de 10 cm (Falcon) y se cultivaron a 37°C durante 1 día. Las células HEK293EBNA se transfectaron con el vector de expresión de la proteína de región extracelular de EphA4 de mono-Fc-His o el vector de expresión de la proteína de región extracelular de EphA4 de ratón, EphA4 de rata o EphA4 humano-Fc-His descrito en el ejemplo 1 usando TransIT-LT1 (TAKARA). Después de incubación (5% de CO₂, 37°C) durante 4 días, se recuperó el líquido sobrenadante del cultivo y se centrifugó a 1500 rpm a temperatura ambiente durante 5 minutos. El líquido sobrenadante de la centrifugación se filtró a través de un filtro de 0,22 µm (Merck Millipore) y se le añadieron Hepes (Dojindo Laboratories) y azida sódica (Wako Pure Chemical Industries) a concentraciones finales de 20 mM y 0,02%, respectivamente.

Se evaluó la actividad de unión del anticuerpo A frente a varios receptores Eph de acuerdo con las siguientes etapas.

Cada pocillo de una placa de 96 pocillos (Nunc) se recubrió con un anticuerpo de burro anti-IgG de ratón (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Después de incubación durante la noche a 4°C, cada pocillo se bloqueó con BlockAce al 1% (Sumitomo Dainippon Pharma) a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar con Tween 20/PBS al 0,05% (Nacalai Tesque) tres veces, se diseminó la proteína de región extracelular de EphA4 de ratón, rata, mono o humano-Fc-His (concentración final: 1 nM) en cada pocillo y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar tres veces, se añadieron una solución de IgG humana (100 µg/ml, Mitsubishi Pharma) y anticuerpo A (0, 0,00128, 0,0064, 0,032, 0,16, 0,8, 4 y 20 µg/ml) a cada pocillo y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadió a los mismos un anticuerpo de burro anti-IgG de ratón marcado con peroxidasa de rábano picante (Jackson ImmunoResearch Laboratories) y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar tres veces, se añadió a cada pocillo una solución de TMBZ (3,3',5,5'-tetrametilbencidina, Sigma-Aldrich). Después de confirmar el desarrollo moderado del color, se añadió a cada pocillo una cantidad igual de una solución de detención de la reacción (H₂SO₄ 1 N, Wako Pure Chemical Industries). La absorbancia a 450 nm se leyó usando un lector de microplacas (PerkinElmer).

El anticuerpo A tenía una actividad de reacción equivalente frente a todos los EphA4 de ratón, rata, mono y humano (Fig. 7).

Ejemplo 10: Efecto inhibitor del anticuerpo monoclonal anti-EphA4 en la autofosforilación de EphA4 inducida por ligando en neuronas del hipocampo

Se prepararon neuronas de hipocampo de rata de acuerdo con las siguientes etapas. Se extrajo un feto de una rata preñada de 18 días (Charles River Laboratories Japan) y se hizo una incisión en la cabeza para aislar el cerebro. Se extirpó una región del hipocampo bajo un microscopio estereoscópico, después se puso en una solución de digestión

(NaCl 137 mM (Wako Pure Chemical Industries), KCl 5 mM (Wako Pure Chemical Industries), Na_2HPO_4 7 mM (Wako Pure Chemical Industries), Hepes 25 mM (Dojindo Laboratories), DNasa 0,5 mg/ml (Sigma-Aldrich) y 0,25% de tripsina (Life Technologies)), y se agita a 37°C durante 10 minutos. La solución se retiró y se añadió suero bovino fetal al 20%/solución tampón de Hanks (Sigma-Aldrich) a los tejidos del hipocampo. La solución se retiró y los tejidos del hipocampo se lavaron dos veces con una solución tampón de Hanks y después se pipetearon en una solución tampón de Hanks para preparar una suspensión celular. Las células se inocularon en una placa de 6 pocillos (Falcon) recubierta con poli-L-lisina que contenía una solución de cultivo (medio neurobasal (Life Technologies), 1 x suplemento B-27 (Life Technologies) y L-glutamina 0,5 mM (Life Technologies)).

La evaluación de la actividad inhibidora de la autofosforilación de EphA4 usando las neuronas del hipocampo se llevó a cabo de acuerdo con las siguientes etapas. Las neuronas del hipocampo de rata inoculadas en una placa de 6 pocillos (Falcon) se trataron con quimera de efrina A1 de ratón-Fc (R&D Systems, concentración final: 10 nM), anticuerpo A (0, 1, 10, 100 y 1000 nM) o péptido KYL (KYLPYWPVLSSL, un inhibidor de EphA4, su síntesis se subcontrató a Hokkaido System Science, 0, 0,01, 0,1, 1, 10 y 100 μM) y se lavó con PBS frío (Wako Pure Chemical Industries) 45 minutos después. Se le añadió un tampón de lisis (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Triton X-100 al 1% (Wako Pure Chemical Industries), 1 x inhibidor de proteasa (Nacalai Tesque) y 1 x inhibidor de fosfatasa (Nacalai Tesque)) para recuperar las células. Después de mezclar a 4°C durante 15 minutos, se recuperó el líquido sobrenadante por centrifugación refrigerada a 15000 rpm a 4°C durante 15 minutos. Se añadió al líquido sobrenadante un anticuerpo policlonal de conejo anti-EphA4 (Medical & Biological Laboratories) y se hizo reaccionar durante 90 minutos. Después, se le añadieron perlas de proteína G (GE Healthcare) y se hizo reaccionar más durante 30 minutos. El líquido sobrenadante se separó por centrifugación refrigerada a 3000 rpm a 4°C durante 1 minuto, seguido de la adición de 1 ml de tampón de lisis. Esta operación se realizó tres veces. Después, se añadió tampón de muestra 2 x SDS a cada muestra, que después se hirvió durante 10 minutos. Esta muestra se usó en SDS-PAGE y transferencia Western usando un anticuerpo anti-tirosina fosforilada (Santa Cruz Biotechnology). Se llevó a cabo además transferencia Western usando un anticuerpo monoclonal anti-EphA4 (Abnova) y se cuantificó la intensidad de la banda para calcular un valor de EphA4 fosforilado/EphA4 total. El anticuerpo monoclonal anti-EphA4 (Abnova), cuyo inmunógeno es un péptido sintético para una región C-terminal de EphA4 humano, se reconoce como un anticuerpo que carece de actividad neutralizante frente a EphA4 humano que tiene una región extracelular N-terminal.

El anticuerpo A y el péptido KYL (un inhibidor de EphA4) suprimían, de una manera dependiente de la concentración, la autofosforilación de EphA4 inducida por la efrina A1 de ratón en las neuronas del hipocampo, y los valores de IC_{50} eran 24,2 nM y 9,91 μM , respectivamente (Fig. 8). Estos resultados demostraban que el anticuerpo A antagoniza la señalización de EphA4/efrina, como con el péptido KYL, en los sistemas celulares.

Ejemplo 11: Efecto inhibidor del anticuerpo monoclonal anti-EphA4 en el colapso de conos de crecimiento inducido por ligando en neuronas del hipocampo

Se prepararon neuronas del hipocampo de rata como se describe en el ejemplo 10 anterior. Las células se inocularon en una placa de 96 pocillos (Greiner Bio-One) recubierta con una solución de cultivo que contenía poli-L-lisina.

El ensayo de colapso de conos de crecimiento usando las neuronas del hipocampo se llevó a cabo de acuerdo con las siguientes etapas. Las neuronas del hipocampo de rata del día 2 de cultivo inoculadas en la placa de 96 pocillos (Greiner Bio-One) se trataron con PBS (Wako Pure Chemical Industries), anticuerpo A (0,1, 0,3 y 1 μM) o un péptido KYL inhibidor de EphA4 (KYLPYWPVLSSL, 10, 30 y 100 μM , su síntesis se subcontrató al Centro de Investigación Toray) durante 15 minutos y después se trató con anticuerpo de cabra anti-fragmento Fcy de IgG1 humana (Jackson ImmunoResearch Laboratories)-quimera de efrina A1 de ratón-Fc agrupada previamente (R&D systems, concentración final: 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (relación: 1:5) durante 30 minutos. Después, se retiró la solución de cultivo y se añadió PFA al 2% (Wako Pure Chemical Industries)/sacarosa al 4% (Wako Pure Chemical Industries)/PBS, y se dejó reposar durante 20 minutos para fijar las células. La solución se retiró y las células se lavaron con PBS tres veces, seguido de la adición de Triton X-100 al 0,25% (Wako Pure Chemical Industries)/PBS para el tratamiento de penetración celular durante 15 minutos. La solución se retiró y se bloqueó durante 1 hora por la adición de BSA al 2% (Sigma-Aldrich)/Triton X-100 al 0,25%/Opti-MEM (Life Technologies) y después se hizo reaccionar con un anticuerpo anti-Tau-1 (Merck Millipore) y un anticuerpo anti-MAP-2 (Merck Millipore) durante 2 horas. Se retiró la solución de anticuerpo primario, se lavó con PBS tres veces y se hizo reaccionar con un anticuerpo secundario y Alexa Fluor 546 Phalloidin (Molecular Probes) durante 1 hora. La solución de anticuerpo secundario se separó y se lavó con PBS tres veces, y después se encerró por la adición de reactivos de antidecoloración SlowFade Gold (Molecular Probes) y se observó bajo BIOREVO (Keyence). Las neuronas que forman el cono de crecimiento se contaron en 30 campos de visión por muestra para calcular la proporción del número de neuronas que causan el colapso de conos de crecimiento.

El anticuerpo A y el péptido KYL inhibidor de EphA4 suprimían, de una manera dependiente de la concentración, el colapso de conos de crecimiento inducido por la efrina A1 de ratón en las neuronas del hipocampo (Fig. 9). Por consiguiente, se muestra que el anticuerpo A inhibe funcionalmente EphA4, como con el péptido KYL, en sistemas celulares.

Ejemplo 12: Efecto antagonista del ligando del anticuerpo monoclonal anti-EphA4 in vivo

El ensayo de competición in vivo usando ratones recién nacidos se realizó de acuerdo con las siguientes etapas. Se administraron PBS (Wako Pure Chemical Industries), anticuerpo A o un anticuerpo de control (anticuerpo anti-dinitrofenol de ratón) producido con un procedimiento convencional inmunizando ratas con dinitrofenol, por vía subcutánea en una dosis de 300 mg/kg (30 ml/kg) a cada ratón de 8 días de edad (Charles River Laboratories Japan). Después de 24 horas, se hizo una incisión en el cuero cabelludo bajo anestesia con isoflurano al 4% (Intervet), y se administró quimera de efrina A1 de ratón-Fc (300 pmol/cabeza, R&D Systems) o PBS (Wako Pure Chemical Industries) en el ventrículo lateral. 1 hora después, el ratón se sacrificó por decapitación, seguido de la extirpación del hemisferio cerebral. El hemisferio cerebral recogido se puso en un tubo de filtro cargado en un tubo para la recuperación de BioMasher (R) I (Nippi). Después de insertar una varilla trituradora, el hemisferio cerebral se homogeneizó por centrifugación refrigerada a 15000 rpm a 4°C durante 2 minutos. El homogeneizado se suspendió en tampón TNE (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, 1x inhibidor de proteasa (Nacalai Tesque), 1x inhibidor de fosfatasa (Nacalai Tesque)). Se añadió 3 x tampón de muestra SDS a una porción del homogeneizado, que después se hirvió durante 10 minutos, seguido de cuantificación de proteínas. Esta muestra se usó en SDS-PAGE y transferencia Western usando un anticuerpo de burro anti-IgG humana (H+L) (Jackson ImmunoResearch Laboratories), un anticuerpo monoclonal anti-EphA4 (Abnova) y un anticuerpo anti-actina (Sigma-Aldrich). El homogeneizado restante se sometió a cuantificación de proteínas y después se dispensó en una cantidad correspondiente a 3 mg de proteína, y se le añadió Triton X-100 al 1% (Wako Pure Chemical Industries) y SDS al 0,1% (Nacalai Tesque). Después de mezclar a 4°C durante 15 minutos, el líquido sobrenadante se recuperó por centrifugación refrigerada a 15000 rpm a 4°C durante 15 minutos. Se añadió 3 x tampón de muestra SDS a una porción del líquido sobrenadante, que después se hirvió durante 10 minutos para preparar una muestra de entrada. Esta muestra se usó en SDS-PAGE y transferencia Western usando un anticuerpo monoclonal anti-EphA4 (Abnova) y un anticuerpo anti-actina (Sigma-Aldrich). Se añadió un anticuerpo policlonal de conejo anti-EphA4 (Santa Cruz Biotechnology) al líquido sobrenadante restante y se hizo reaccionar durante 60 minutos. Después, se le añadieron perlas de proteína G (GE Healthcare) y se hizo reaccionar más durante 30 minutos. El líquido sobrenadante se separó por centrifugación refrigerada a 3000 rpm a 4°C durante 2 minutos, seguido de la adición de 0,5 ml de tampón de lisis (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Triton X-100 al 1% (Wako Pure Chemical Industries), SDS al 0,1% (Nacalai Tesque), 1 x inhibidor de proteasa (Nacalai Tesque), 1 x inhibidor de fosfatasa (Nacalai Tesque)). Esta operación se realizó tres veces. Después, se añadió 1 x tampón de muestra SDS a las perlas, que después se hirvieron durante 10 minutos para preparar una muestra de perlas. Esta muestra se usó en SDS-PAGE y transferencia Western usando un anticuerpo anti-tirosina fosforilada (Santa Cruz Biotechnology). Se realizó además una transferencia Western usando un anticuerpo monoclonal anti-EphA4 (Abnova) y se cuantificó la intensidad de la banda para calcular un valor de EphA4 fosforilado/EphA4 total. El anticuerpo monoclonal anti-EphA4 (Abnova), cuyo inmunógeno es un péptido sintético para una región C-terminal de EphA4 humano, se reconoce como un anticuerpo que carece de actividad neutralizante contra EphA4 humano que tiene una región extracelular N-terminal.

La administración de efrina A1 de ratón en el ventrículo lateral del ratón recién nacido inducía la autofosforilación de EphA4 en un hemisferio cerebral. El anticuerpo A suprimía la autofosforilación de EphA4 inducida por la efrina A1 de ratón en 66% (Fig. 10). Por consiguiente, se muestra que el anticuerpo A también inhibe la unión entre EphA4 y su ligando in vivo.

Ejemplo 13: Efecto protector de neuronas motoras del anticuerpo monoclonal anti-EphA4 en un modelo de ELA in vitro derivado de células ES de ratón

Las células ES de ratón se mantuvieron y cultivaron de acuerdo con las siguientes etapas. Las células ES de ratón (129x1/SvJ) criopreservadas -80°C se descongelaron en un baño termostático y después se diluyeron con un medio de cultivo de células ES de ratón (KnockOut(TM) DMEM (Gibco) que contenía suero bovino fetal al 10% (FBS, Gibco), β-mercaptoetanol 0,1 mM (Gibco), piruvato de sodio 1 mM (Invitrogen), L-glutamina 2 mM (Invitrogen), 1% de aminoácidos no esenciales (Invitrogen), penicilina 100 unidades/ml-estreptomicina 100 µg/ml (Invitrogen) y factor inhibidor de la leucemia ESGRO(R) 1000 unidades/ml (Merck Millipore)) calentado a 37°C. Cada suspensión de células se centrifugó (1500 rpm, 3 min, temperatura ambiente), seguido de la eliminación del líquido sobrenadante. Las células se suspendieron en un medio nuevo, después se transfirieron a una placa de cultivo con células alimentadoras inoculadas de antemano y se mantuvieron y cultivaron en una incubadora con CO₂ (5% de CO₂, 37°C).

Se establecieron astrocitos a partir de un ratón recién nacido y se mantuvieron y cultivaron de acuerdo con las siguientes etapas. Un ratón recién nacido genéticamente intacto de dos días de edad (C57BL/6JmsSlc (Japan SLC)) y un ratón híbrido recién nacido de un ratón genéticamente intacto y un ratón de variante de SOD1 humana (G93A) Tg-(B6.Cg-Tg(SOD1_G93A)1Gur/J (Jackson ImmunoResearch Laboratories)) se sacrificó cada uno mediante anestesia por inhalación con isoflurano (Intervet) o decapitación. Después, se aisló la corteza cerebral de cada ratón y se dispersó por tratamiento con tripsina-EDTA al 0,25% (Invitrogen) a 37°C durante 15 minutos. Después del tratamiento enzimático, las células se diluyeron con 4 ml de medio Eagle modificado por Dulbecco (Gibco) que contenía FBS al 10% (Gibco) y penicilina-estreptomicina al 1% (Invitrogen) (FBS-DMEM al 10%) para terminar la digestión enzimática. Después, las impurezas distintas de las células individuales se sometieron a filtración usando un tamiz de células (BD Biosciences) y las células se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos. El líquido sobrenadante se aspiró, se diluyó con 4 ml de FBS-DMEM al 10% de nueva aportación, se inoculó en una placa de cultivo de 60 mm de forma individual y se cultivó a 37°C. Dos días después de la inoculación, se aspiró el medio y se reemplazó por la

adición de 4 ml de FBS-DMEM al 10% de nueva aportación. Después de alcanzar la confluencia, se recuperó un líquido sobrenadante del cultivo que contenía células no adherentes y se sometió a genotipado de la variante de SOD1 humana (G93A). Se añadieron de nuevo 2 ml de PBS (Wako Pure Chemical Industries) al líquido sobrenadante y se aspiró de nuevo. Se añadió a las células 1 ml de tripsina-EDTA al 0,25% y se incubaron a 37°C durante 3 minutos. El tratamiento enzimático se terminó con 3 ml de FBS-DMEM al 10% y las células se centrifugaron a 1500 rpm durante 3 minutos. Después de la centrifugación, se aspiró el medio y se añadieron 6 ml de FBS-DMEM al 10% de nueva aportación a las células, que se inocularon en una placa de cultivo de 100 mm y se subcultivaron (número de pases: 2). Después de alcanzar la confluencia, se aspiró el medio y después se añadieron 3 ml de PBS (Wako Pure Chemical Industries) a las células y se aspiró nuevamente. Se añadieron 2 ml de tripsina-EDTA al 0,25% a las células y se incubaron a 37°C durante 3 minutos. El tratamiento enzimático se terminó con 4 ml de FBS-DMEM al 10% y las células se centrifugaron a 1500 rpm durante 3 minutos. Después de la centrifugación, se aspiró el medio y se añadieron 12 ml de FBS-DMEM al 10% de nueva aportación a las células, después 6 ml de estos se inocularon en una placa de cultivo de 100 mm y se subcultivaron (número de pases: 3). Se aspiró el medio de los astrocitos en el número de pases de 3 y se añadieron 2 ml de PBS (Wako Pure Chemical Industries) a las células y se aspiró de nuevo. Se añadieron 2 ml de tripsina-EDTA al 0,25% a las células y se incubaron a 37°C durante 3 minutos. El tratamiento enzimático se terminó por adición de 4 ml de FBS-DMEM al 10%. La suspensión se recuperó, se centrifugó a 1500 rpm durante 3 minutos, se diluyó con Cell banker (Nippon Zenyaku Kogyo) y se criopreservó a -80°C hasta que se sometió a un ensayo. Cuando se sometió a un ensayo, cada suspensión celular criopreservada se descongeló en un baño de termostato y después se diluyó con FBS-DMEM al 10% calentado a 37°C. Después de la centrifugación (1500 rpm, 3 min, temperatura ambiente) de cada suspensión celular, se separó el líquido sobrenadante y las células se suspendieron en un medio de nueva aportación, después se inocularon en una cámara de 8 pocillos (ibidi) y se mantuvieron y cultivaron en una incubadora con CO₂ (5% de CO₂, 37°C).

El genotipado de la variante de SOD1 humana (G93A) se realizó usando el kit de PCR de tejido REDExtract-N-Amp(TM) (Sigma-Aldrich). En la etapa de mantener y cultivar las células ES de ratón, el líquido sobrenadante del cultivo que contenía células no adherentes de astrocitos que expresan la variante de SOD1 humana (G93A) recuperado durante el subcultivo se recuperó en un tubo de 1,5 ml y se centrifugó a 1500 rpm durante 3 minutos. Después de la centrifugación, se aspiró el líquido sobrenadante y las células se lavaron por la adición de 1 ml de PBS y se centrifugaron de nuevo, seguido de la aspiración de PBS. Se mezclaron 50 µl de una solución de extracción y 12,5 µl de una solución de preparación de tejido y se añadieron a cada muestra. Después de mezclar, la mezcla se transfirió a un tubo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), seguido de la extracción del genoma en un ciclo de 55°C durante 10 minutos → 95°C durante 3 minutos → 4°C ∞ usando el sistema de PCR GeneAmp(R) 9700 (Applied Biosystems(R)). Después, la solución de reacción se neutralizó por la adición de 50 µl de solución de neutralización B.

El genoma extraído se usó en PCR genómica según la composición mostrada en la Tabla 3. Las secuencias de cebadores usadas en la PCR se muestran en la Tabla 4. Cada producto de PCR resultante se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1% a 100 V durante 20 minutos. Las muestras con dos bandas de un patrón interno de 324 pb y la variante de SOD1 humana (G93A) de 236 pb detectadas se identificaron como astrocitos que expresan la variante de SOD1 humana (G93A).

[Tabla 3]

Tabla 3. Mezcla de PCR genómica

Nombre del reactivo	Volumen de líquido
Molde:	1 µl
Mezcla Red:	5 µl
Cebador 1 (100 µmol/l):	0,05 µl
Cebador 2 (100 µmol/l):	0,05 µl
Cebador 3 (100 µmol/l):	0,05 µl
Cebador 4 (100 µmol/l):	0,05 µl
Agua destilada	3,8 µl
Total:	10 µl
Mezcla Red = Mezcla de reacción de PCR REDExtract-N-Amp	

[Tabla 4]

Tabla 4. Secuencias de nucleótidos de cebadores

Cebador 1	Variante humana de <i>SOD1</i> (G93A)	CATCAGCCCTAATCCATCTGA
Cebador 2	Variante humana de <i>SOD1</i> (G93A)	CGCGACTAACAATCAAAGTGA
Cebador 3	Referencia interna	CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT
Cebador 4	Referencia interna	GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC

El efecto protector de la neurona motora en los modelos de ELA in vitro se evaluó de acuerdo con las siguientes etapas. Las células ES de ratón cultivadas y mantenidas se trataron con tripsina al 0,25%/solución de EDTA al 0,05% (Gibco) para disociar las células de la placa de cultivo. Las células se recuperaron por centrifugación y después se preparó una suspensión y se inocularon $1,2 \times 10^5$ células/ml en una placa de 12 pocillos de baja adsorción (Nunc) (día 0). El cultivo flotante de agregados se realizó durante 2 días en un medio DFK (medio DMEM avanzado/F-12 (Invitrogen):Neurobasal (Invitrogen) [1:1] que contenía 5% de reemplazo de suero KnockOut (Invitrogen), L-glutamina 2 mM, penicilina 100 unidades/ml - estreptomicina 100 µg/ml y β-mercaptoetanol 0,1 mM). El día 2, el medio DFK se reemplazó por un medio DFK que contenía ácido retinoico 1 µM (Sigma-Aldrich) y purmorfamina 2 µM (Stemgent). Después, se realizó el reemplazo del medio con una frecuencia de una vez cada dos días. La diferenciación en neuronas motoras se indujo por cultivo durante 5 días (días 3 a 7).

El día 7, las masas celulares de las neuronas motoras diferenciadas se dispersaron en una solución de dispersión celular Accumax (MS Tech) y se prepararon en una suspensión que tenía una densidad celular de $5,5 \times 10^5$ células/ml. Se inocularon 200 µl/pocillo de suspensión en la cámara de 8 pocillos que contenía los astrocitos genéticamente intactos derivados de ratón o los astrocitos que expresaban la variante de *SOD1* humana (G93A) cultivados y mantenidos por adelantado, y las células cocultivadas resultantes de los astrocitos y las neuronas motoras se usaron en la evaluación.

El número de neuronas motoras observadas por el cocultivo de los astrocitos genéticamente intactos y las neuronas motoras se usó como control. Para el grupo tratado con fármaco, los astrocitos que expresan la variante de *SOD1* humana (G93A) y las neuronas motoras se cocultivaron en unas condiciones que implicaba la adición de vehículo (IgG y agua ultrapura al 0,1%), anticuerpo A (10, 30 y 100 nM), EphA4-Fc (R&D Systems, 3, 10 y 30 nM) o péptido KYL (Toray Research Center, 1, 3 y 10 µM). Después de cultivo durante 2 días a 37°C en un ambiente de CO₂ al 5% en cada condición, las neuronas motoras se tiñeron inmunocitoquímicamente con un anticuerpo anti-ISL1 de conejo (Abcam) y Hoechst 33342 (Molecular Probes). Las células copositivas ISL1/Hoechst 33342 por unidad de área se contaron como neuronas motoras vivas, y se calculó la tasa de supervivencia de las neuronas motoras como un porcentaje (%) con respecto al control. La fig. 11 muestra una vista esquemática simple que muestra las etapas del sistema de evaluación.

La tasa de supervivencia de las neuronas motoras se redujo significativamente en el cocultivo de neuronas motoras derivadas de células ES de ratón/astrocitos que expresan la variante de *SOD1* humana (40-50%). El anticuerpo A suprimía, de una manera dependiente de la concentración, la muerte de las neuronas motoras derivada de células ES de ratón inducida por los astrocitos que expresan la variante de *SOD1* humana (G93A) (Fig. 12). Se confirmó que el tratamiento con péptido KYL o EphA4-Fc, como con el anticuerpo A, tiene un efecto protector de la neurona motora en este sistema experimental, mostrando que el anticuerpo A promueve la supervivencia de las neuronas motoras derivadas de células ES de ratón por inhibición de la señalización de EphA4/efrina en este modelo de ELA in vitro.

Ejemplo 14: Efecto protector de neuronas motoras del anticuerpo monoclonal anti-EphA4 en un modelo de ELA in vitro derivado de células iPS humanas

Las células iPS humanas se mantuvieron y cultivaron de acuerdo con las siguientes etapas. Células iPS humanas (201B7) criopreservadas en nitrógeno líquido usando el banco de células madre (TAKARA) se extrajeron de la fase gaseosa del nitrógeno líquido y se suspendieron y descongelaron inmediatamente en 5 ml de un medio de cultivo de células iPS humanas (Essential 8, Thermo Fisher Scientific) precalentado a 37°C. La suspensión celular se recuperó en un tubo cónico de 15 ml (Falcon) y se centrifugó (1000 rpm, 5 min, temperatura ambiente), seguido de la separación del líquido sobrenadante. Las células se suspendieron en un medio de nueva aportación y después se diseminaron en una placa de cultivo celular de 60 mm de Φ (Falcon BD) recubierta con 0,5 µg/cm² de vitronectina humana recombinante (Invitrogen) de antemano. Se le añadió Y-27632 10 µM (Wako Pure Chemical Industries) y las células se mantuvieron y cultivaron en una incubadora con CO₂ (5% de CO₂, 37°C). El reemplazo del medio se realizó todos los días y las células se sometieron al experimento cuando alcanzaron la confluencia.

El efecto protector de neuronas motoras en los modelos de ELA in vitro se evaluó de acuerdo con las siguientes etapas. El medio de cultivo de las células iPS humanas mantenidas y cultivadas se aspiró y las células se lavaron con 2 ml de PBS (Wako Pure Chemical Industries). Después de la aspiración de PBS, se añadieron 500 µl de EDTA 0,5

mM a las células, que después se incubaron durante 2 a 3 minutos en una incubadora con CO₂ (5% de CO₂, 37°C) (las células se confirmaron al microscopio cada 30 segundos, y la incubación se interrumpió cuando la asociación intercelular se volvió débil). La reacción de EDTA se terminó por suspensión en 5 ml de un medio de cultivo de células iPS humanas y las células se recuperaron en un tubo cónico de 15 ml. Las células se centrifugaron a 1000 rpm a temperatura ambiente durante 5 minutos y se aspiró el líquido sobrenadante. La suspensión celular que contenía masas de células iPS humanas se inoculó en una cantidad de aproximadamente 1/10 por pocillo en una placa de cultivo celular de 6 pocillos de baja adhesión (Nunc) y se cultivó en una incubadora con CO₂ (5% de CO₂, 37°C) usando un medio DFK (medio DMEM avanzado/F-12 (Invitrogen):neurobasal (Invitrogen) [1:1] medio que contiene un suplemento de B27 al 2%, reemplazo de suero KnockOut al 5% (Invitrogen), L-glutamina 2 mmol/l, penicilina 100 unidades/ml-estreptomicina 100 µg/ml y β-mercaptoetanol 0,1 mmol/l) complementado con SB431542 2 µM (Sigma-Aldrich), LDN193189 300 nM (Sigma-Aldrich) y CHIR99021 3 µM (Sigma-Aldrich). El reemplazo del medio se realizó cada 2 días por el siguiente método. Primero, se recuperaron agregados de células diferenciadas de células iPS humanas (SFEB) en un medio base en un tubo cónico de 15 ml y se dejó reposar a temperatura normal durante 5 minutos para precipitar las masas celulares. Este líquido sobrenadante se aspiró y se añadió un medio DFK de nueva aportación y SB431542 2 µM (Sigma-Aldrich), LDN193189 300 nM (Sigma-Aldrich, CHIR99021 3 µM (Sigma-Aldrich) y después se devolvió al pocillo original para el reemplazo del medio. El día de cultivo 8, los SFEB se recuperaron en un medio base en un tubo cónico de 15 ml y se dejaron reposar a temperatura normal durante 5 minutos para precipitar los SFEB. Este líquido sobrenadante se aspiró y se añadió un medio DFK de nueva aportación y después ácido retinoico 0,1 µM (Sigma-Aldrich) y purmorfamina 0,5 µM (Miltenyi Biotec), y después se devolvió al pocillo original y se cultivó en una incubadora con CO₂ (5% de CO₂, 37°C). El reemplazo del medio se realizó cada 2 días. El día de cultivo 12, los SFEB se recuperaron en un medio base en un tubo cónico de 15 ml y se dejaron reposar a temperatura normal durante 5 minutos para precipitar los SFEB. Se aspiró el líquido sobrenadante y se añadieron 500 µl de Accumax (MS TechnoSystems) a las células, que después se pipetearon varias veces y después se incubaron durante 5 minutos en una incubadora con CO₂ (37°C, 5% de CO₂). Las células se sacaron de la incubadora, se suspendieron en 5 ml de medio DFK y se pipetearon varias veces para dispersar las masas celulares. La suspensión celular se disoció en células individuales por filtración a través de un tamiz de células (Falcon). Después, se contó el número de células usando una cámara de recuento. La suspensión celular se recuperó en otro tubo cónico de 15 ml y se centrifugó a 1000 rpm a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se preparó una suspensión que tenía una densidad celular de 5,5 x 10⁵ células/ml con un medio de cultivo de neuronas motoras (medio DMEM avanzado/F-12 (Invitrogen):neurobasal (Invitrogen) [1:1] medio que contenía 2% de suplemento B27, suero de caballo al 1%, L-glutamina 2 mmol/l, penicilina 100 unidades/ml - estreptomicina 100 µg/ml y β-mercaptoetanol 0,1 mmol/l) y se inocularon 200 µl/pocillo en una cámara de 8 pocillos que contenía astrocitos genéticamente intactos o astrocitos que expresan la variante de SOD1 humana (G93A) inoculados con 8 x 10⁴ células/pocillo con antelación. Las células cocultivadas resultantes de los astrocitos y las neuronas motoras se usaron en la evaluación (el establecimiento, congelación, descongelación, inoculación y mantenimiento y cultivo de los astrocitos genéticamente intactos y que expresan la variante de SOD1 humana (G93A) y se llevaron a cabo de la misma manera que en el ejemplo 13). El número de neuronas motoras observadas por el cocultivo de los astrocitos genéticamente intactos y las neuronas motoras se usó como control. Para el grupo tratado con fármaco, los astrocitos que expresan la variante de SOD1 humana (G93A) y las neuronas motoras se cocultivaron en unas condiciones que implicaban la adición de vehículo (IgG y agua ultrapura al 0,1%), anticuerpo A (10, 30 y 100 nM), el péptido KYL inhibidor de EphA4 (KYLPLYWVPLSSL, 1, 3 y 10 µM, su síntesis se subcontrató al Centro de Investigación Toray), o EphA4-Fc (3, 10 y 30 nM, R&D systems). Después de cultivo durante 2 días a 37°C en un ambiente de CO₂ al 5% en cada condición, las neuronas motoras se tiñeron inmunocitoquímicamente con un anticuerpo anti-ISL1 (obtenido de Developmental Studies Hybridoma Bank) y Hoechst 33342 (Molecular Probes). Las células positivas ISL1/Hoechst 33342 por pocillo se contaron como neuronas motoras vivas, y la tasa de supervivencia de las neuronas motoras se calculó como % con respecto al control. La fig. 13 muestra una vista esquemática simple que muestra las etapas del sistema de evaluación.

La tasa de supervivencia de las neuronas motoras se redujo significativamente (aproximadamente 50%) en el cocultivo de neuronas motoras derivadas de células iPS humanas/astrocitos que expresan la variante de SOD1 humana (G93A), al igual que con el sistema de ensayo que usa células ES de ratón. El anticuerpo A suprimía, de una manera dependiente de la concentración, la muerte de neuronas motoras derivadas de células iPS humanas inducida por los astrocitos que expresan la variante de SOD1 humana (G93A) (Fig. 14). Se confirmó que el tratamiento con péptido KYL o EphA4-Fc, como con el anticuerpo A, tiene un efecto protector de neuronas motoras derivadas de células iPS humanas en este sistema experimental. Por consiguiente, se muestra que el anticuerpo A también promueve la supervivencia de neuronas motoras inhibiendo la unión entre EphA4 y su ligando en células humanas.

Ejemplo 15: Mapeo de epítomos del dominio de unión al ligando de EphA4 (EphA4-LBD) por cristalografía de rayos X

Con el fin de preparar un complejo de anticuerpo A-Fab preparado en el ejemplo 5 y un antígeno EphA4-LBD, se preparó EphA4-LBD (Qin H. et al., *J. Biol. Chem.*, 283: 29473 - 29484 (2008)). Se mezclaron 1,33 mol (950 M, 1,4 ml) de EphA4-LBD y 0,9 mol (150 M, 6 ml) de anticuerpo A-Fab de modo que EphA4-LBD tenía aproximadamente 1,5 veces la relación molar del anticuerpo A-Fab. La mezcla se incubó en hielo durante 30 minutos. A continuación, la solución mezclada se aplicó a HILOAD 26/60 Superdex 75 calidad de preparación (GE Healthcare), seguido de elución con una solución tampón para cromatografía (Tris/HCl 25 mM (pH 7,5), NaCl 100 mM). Las fracciones que contenían

el complejo se analizaron por SDS PAGE y las fracciones de alta pureza se recogieron y se concentraron en 34 mg/ml. Este concentrado se usó en la cristalización.

La cristalización del complejo se llevó a cabo por el método de difusión de vapor de gota sedente usando un aparato de cristalización automático sistema Hydra II Plus One (Matrix Technologies). La placa usada era MRC-2 (Molecular Dimensions). La composición de una solución de depósito era Tris/HCl 100 mM (pH 7,5 a 8,5) y polietilenglicol 400 al 30%. Esta solución de depósito y la solución de complejo descritas antes se mezclaron en una relación de volumen de 1:1 para preparar gotitas de cristalización. La placa de cristalización preparada se dejó reposar a 20°C.

Como resultado de llevar a cabo la cristalización en las condiciones descritas antes, se obtuvieron cristales que tenían un grupo espacial P212121, constante de red a de 70,0 angstroms, constante de red b de 82,3 angstroms y constante de red c de 216,0 angstroms. Los datos de difracción a 2,1 angstroms se obtuvieron por la incidencia de rayos X de sincrotrón (1,0 angstroms) en los cristales obtenidos. Los datos de difracción se procesaron con HKL2000 (HKL Research Inc.) y su determinación de fase se realizó por el método de sustitución molecular. El método de sustitución molecular usaba un programa PHASER (versión 2.5.0, McCoy A.J. et al., *J. Appl. Cryst.* 40: 658-674 (2007)) contenido en CCP4 Software Suite (proyecto computacional colaborativo número 4, [CCP4] versión 6.5.0, *Acta Cryst. D* 67: 235 - 242 (2011)). Los modelos de búsqueda usados en el método de sustitución molecular eran la estructura cristalina (PDBID:3CKH) de EphA4-LBD y la estructura cristalina de Fab de un anticuerpo diferente determinado en el pasado por los autores de la presente invención. Se construyó un modelo molecular adecuado para una densidad electrónica obtenida de la fase determinada usando un programa COOT (Emsley P. et al., *Acta Cryst. D* 60: 2126-2132 (2004)) y se sometió a refinamiento de estructura usando un programa REFMAC (Murshudov G.N., *Acta Cryst. D* 53: 240 - 255 (1997)).

De esta manera, la estructura cristalina del complejo que tiene una resolución de 2,1 angstroms se obtuvo mediante el cálculo de la estructura ($R = 0,234$, $R_{libre} = 0,288$).

La estructura cristalina obtenida del complejo Fab/EphA4-LBD se analizó usando una herramienta de detección de interacción instalada en un sistema químico computacional MOE 2011.10 (Chemical Computing Group Inc.) para identificar restos de aminoácidos en EphA4-LBD que interactúan directamente con Fab (FIG. 15). Se usaron ajustes estándar de MOE como protocolo de detección. Los restos de aminoácidos identificados eran Ser58, Met60, Gln71, Val72, Cys73, Thr104, Arg106, Gln156, Asp161, Arg162, Ile163, Cys191 e Ile192. La fig. 16 muestra la estructura de la superficie de EphA4-LBD preparada usando Maestro (versión 10.6, Schrodinger). Como resultado, los autores de la presente invención concluyeron que las regiones que tienen estos restos de aminoácidos son regiones de unión a Fab de EphA4-LBD.

Ejemplo 16: Preparación de anticuerpo humanizado de anticuerpo A

Preparación de anticuerpo anti-EphA4 humano humanizado

Se diseñaron regiones variables de cada anticuerpo humanizado. Basándose en la alta homología con las regiones armazón (FR) del anticuerpo A, las FR de la cadena ligera del anticuerpo humano IGKV1-NL1*01 (SEQ ID NO: 50) o IGKV3D-15*01 (SEQ ID NO: 51) y JK1 (SEQ ID NO: 52) y las FR de la cadena pesada IGHV7-4-1*02 (SEQ ID NO: 53) y JH6 (SEQ ID NO: 54) se seleccionaron como FR de anticuerpos humanizados. Después, se predijeron los aminoácidos de la FR que interactúan con aminoácidos de la CDR usando el modelo de predicción estructural 3D del anticuerpo A de ratón y se usaron en el injerto con CDR (SEQ ID NO: 26 a 30 y 31 a 33). En vista de la mejora de la fosforilación de EphA4 y la actividad de ADCC, una región constante de la cadena pesada de IgG₂ humana (SEQ ID NO: 62) que tenía mutaciones C131S, C219S, V234A y G237A y carecía de un resto de lisina C-terminal, o una región constante de la cadena pesada (SEQ ID NO: 60) que contenía CH1 derivado de IgG₁ humana y región bisagra y CH2 y CH3 derivadas de IgG₂ humana que tiene mutaciones V234A y G237A y que carece de un resto de lisina C-terminal, se usó como región constante de la cadena pesada. La región constante de la cadena ligera de Igk humana (SEQ ID NO: 64) se utilizó como región constante de la cadena ligera. HK1 (SEQ ID NO: 72), HK2 (SEQ ID NO: 74) y HK4 (SEQ ID NO: 76) se diseñaron como regiones variables de la cadena pesada de anticuerpos humanizados que llevan CDR injertadas (SEQ ID NO: 26, 28 y 30) determinado por el método de definición de Kabat. HA1 (SEQ ID NO: 66), HA2 (SEQ ID NO: 68) y HA4 (SEQ ID NO: 70) se diseñaron como regiones variables de la cadena pesada de anticuerpos humanizados que llevan CDR injertadas (SEQ ID NO: 27, 29 y 30) determinado por el método de definición AbM. L1-4 (SEQ ID NO: 78), L1-5 (SEQ ID NO: 80) y L1-6 (SEQ ID NO: 82) se diseñaron como regiones variables de la cadena ligera de anticuerpos humanizados usando IGKV1-NL1*01 y JK1. L2-4 (SEQ ID NO: 84) se diseñó como una región variable de la cadena ligera de anticuerpo humanizado usando IGKV3D-15*01 y JK1. Casualmente, en el diseño de las regiones constantes de la cadena pesada, se confirmó la fosforilación de EphA4 de la misma forma que se describe en el Ejemplo 10.

Se sintetizó una secuencia génica que codifica la secuencia de aminoácidos de HK1, HK2 o HK4 convirtiendo la secuencia de aminoácidos de las CDR de la cadena pesada (SEQ ID NO: 26, 28 y 30) del anticuerpo A injertado en IGHV7-4-1*02 (SEQ ID NO: 53) y JH6 (SEQ ID NO: 54) con una secuencia señal (SEQ ID NO: 55) añadida adicionalmente al extremo N, a una secuencia génica de GenScript USA Inc., y preparada por mutagénesis por PCR (HK1: SEQ ID NO: 73, HK2: SEQ ID NO: 75, HK4: SEQ ID NO: 77, secuencia de señal: SEQ ID NO: 57). Se sintetizó una secuencia génica que codifica la secuencia de aminoácidos de HA1, HA2 o HA4 convirtiendo la secuencia de

aminoácidos de las CDR de la cadena pesada (SEQ ID NO: 27, 29 y 30) del anticuerpo A injertado en IGHV7-4-1*02 (SEQ ID NO: 53) y JH6 (SEQ ID NO: 54) con una secuencia señal (SEQ ID NO: 55) añadida adicionalmente al extremo N, a una secuencia génica de GenScript USA Inc., y preparada por mutagénesis por PCR (HA1: SEQ ID NO: 67, HA2: SEQ ID NO: 69, HA4: SEQ ID NO: 71, secuencia señal: SEQ ID NO: 56). Los genes que codifican estas regiones variables de la cadena pesada humanizadas y secuencias señal se insertaron en vectores de expresión (pcDNA3.4) que contienen una secuencia génica (SEQ ID NO: 63) que codifica la región constante de IgG₂ humana (SEQ ID NO: 62) que tenía mutaciones C131S, C219S, V234A y G237A y carecía de un resto de lisina C-terminal, o vectores de expresión (pcDNA3.4) que contenían una secuencia génica (SEQ ID NO: 61) que codificaban la región constante (SEQ ID NO: 60) que contenía CH1 derivada de IgG₁ humana y bisagra y CH2 y CH3 derivadas de IgG₂ humana que tenían mutaciones V234A y G237A. Se sintetizó una secuencia génica que codificaba la secuencia de aminoácidos de L1-4, L1-5 o L1-6 convirtiendo la secuencia de aminoácidos de las CDR de la cadena ligera (SEQ ID NO: 31 a 33) del anticuerpo A injertado en IGKV1-NL1*01 (SEQ ID NO: 50) y JK1 (SEQ ID NO: 52) con una secuencia señal (SEQ ID NO: 58) añadida adicionalmente al extremo N, a una secuencia génica de GenScript USA Inc., y preparada por mutagénesis por PCR (L1-4: SEQ ID NO: 79, L1-5: SEQ ID NO: 81, L1-6: SEQ ID NO: 83, secuencia señal: SEQ ID NO: 59). Se sintetizó una secuencia génica que codificaba la secuencia de aminoácidos de L2-4 convirtiendo la secuencia de aminoácidos de las CDR de la cadena ligera (SEQ ID NO: 31 a 33) del anticuerpo A injertado en IGKV3D-15*01 (SEQ ID NO: 51) y JK1 (SEQ ID NO: 52) con una secuencia señal (SEQ ID NO: 58) añadida adicionalmente al extremo N, a una secuencia génica de GenScript USA Inc., y preparada por mutagénesis por PCR (L2-4: SEQ ID NO: 85, secuencia señal: SEQ ID NO: 59). Los genes que codificaban estas regiones variables de la cadena ligera humanizada y secuencias señal se insertaron en vectores de expresión (pcDNA3.4) que contenían una secuencia génica (SEQ ID NO: 65) que codificaba la región constante de Igk humana (SEQ ID NO: 64). En este contexto, el término "C131S" se refiere a una mutación que sustituye la cisteína en la posición 131 de la numeración Eu por serina. El término "C219S" se refiere a una mutación que sustituye la cisteína en la posición 219 de la numeración de Eu por serina. El término "V234A" se refiere a una mutación que sustituye la valina en la posición 234 de la numeración de Eu por alanina. El término "G237A" se refiere a una mutación que sustituye la glicina en la posición 237 de la numeración de Eu por alanina. En este contexto, la CH1 se refiere a una región de las posiciones de numeración Eu 118 a 215 en la región constante de IgG humana. La bisagra se refiere a una región de las posiciones de numeración de Eu 216 a 230 en la región constante de IgG humana. La CH2 se refiere a una región de las posiciones de numeración Eu 231 a 340 en la región constante de IgG humana. La CH3 se refiere a una región de las posiciones de numeración Eu 341 a 446 en la región constante de IgG humana. Con el fin de producir estos anticuerpos humanizados, los vectores de expresión descritos anteriormente se usaron en combinación como se muestra en la Tabla 5 usando el sistema de expresión Expi293 (Gibco/Thermo Fisher Scientific) para transfectar células Expi293F (Gibco/Thermo Fisher Scientific). Cada líquido sobrenadante se recuperó y purificó usando proteína A (GE Healthcare).

[Tabla 5]

Anticuerpo humanizado nº	Cadena L				Cadena H			
	Región variable				Región variable			
	Nombre	Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO)	Secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO)	Nombre	Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO)	Secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO)	Región constante	Región constante
75	L1-4	78	79	HA1	66	67	60	61
76	L1-4	78	79	HA2	68	69		
67	L1-4	78	79	HA4	70	71		
77	L14	78	79	HK1	72	73		
78	L1-4	78	79	HK2	74	75		
69	L1-4	78	79	HK4	76	77		
81	L1-5	80	81	HA1	66	67		
82	L1-5	80	81	HA2	68	69		
83	L1-5	80	81	HA4	70	71		
84	L1-5	80	81	HK1	72	73		
85	L1-5	80	81	HK2	74	75		
86	L1-5	80	81	HK4	76	77		
87	L1-6	82	83	HA1	66	67		
88	L1-6	82	83	HA2	68	69		
89	L1-6	82	83	HA4	70	71		
90	L1-6	82	83	HK1	72	73		
91	L1-6	82	83	HK2	74	75		
92	L1-6	82	83	HK4	76	77		
93	L24	84	85	HA1	66	67		
94	L2-4	84	85	HA2	68	69		
71	L2-4	84	85	HA4	70	71		
95	L2-4	84	85	HK1	72	73		
96	L2-4	84	85	HK2	74	75		
73	L2-4	84	85	HK4	76	77		

(continuación)

Anticuerpo humanizado nº	Cadena L				Cadena H			
	Región variable		Región constante		Región variable		Región constante	
	Nombre	Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO)	Secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO)	Nombre	Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO)	Secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO)	Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO)	Secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO)
75	L1-4	78	79	HA1	66	67	60	61
76	L1-4	78	79	HA2	68	69		
67	L1-4	78	79	HA4	70	71		
77	L14	78	79	HK1	72	73		
78	L1-4	78	79	HK2	74	75		
69	L1-4	78	79	HK4	76	77		
81	L1-5	80	81	HA1	66	67		
82	L1-5	80	81	HA2	68	69		
83	L1-5	80	81	HA4	70	71		
84	L1-5	80	81	HK1	72	73		
85	L1-5	80	81	HK2	74	75		
86	L1-5	80	81	HK4	76	77		
87	L1-6	82	83	HA1	66	67		
88	L1-6	82	83	HA2	68	69		
89	L1-6	82	83	HA4	70	71		
90	L1-6	82	83	HK1	72	73		
91	L1-6	82	83	HK2	74	75		
92	L1-6	82	83	HK4	76	77		
93	L24	84	85	HA1	66	67		
94	L2-4	84	85	HA2	68	69		
71	L2-4	84	85	HA4	70	71		
95	L2-4	84	85	HK1	72	73		
96	L2-4	84	85	HK2	74	75		
73	L2-4	84	85	HK4	76	77		

Ejemplo 17: Afinidad del anticuerpo monoclonal anti-EphA4 humanizado por el EphA4 humano

La afinidad de unión de cada anticuerpo monoclonal anti-EphA4 humanizado obtenido en el ejemplo 16 por el EphA4 humano se determinó mediante resonancia de plasmón de superficie (SPR) usando Biacore T200 (GE Healthcare). Primero, para el ensayo del anticuerpo A, un anticuerpo de rata anti-IgG₁ de ratón producido con un método convencional inmunizando ratas con anticuerpo IgG₁ de ratón se inmovilizó en el chip detector CM5. La inmovilización del anticuerpo de rata anti-IgG₁ de ratón en el chip detector CM5 se realizó por el método de acoplamiento de amina usando N-hidroxisuccinimida (NHS) e hidrócloruro de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC). Se usó etanolamina para bloquear (el chip detector y los reactivos para la inmovilización fueron todos fabricados por GE Healthcare). El anticuerpo se diluyó con una solución tampón para inmovilización (acetato de sodio 10 mM, pH 4,5) y se inmovilizó en el chip detector de acuerdo con el protocolo adjunto a Biacore T200. Para el ensayo de cada anticuerpo monoclonal humanizado, se usó un chip de proteína A (GE Healthcare, 29-1383-03). El anticuerpo A o el anticuerpo monoclonal humanizado se diluyó con una solución tampón de análisis de HBS-EP (GE Healthcare), se inyectó solo en la celda de flujo 2 durante 120 segundos y se capturó (cantidad capturada: aproximadamente 30 a 60 RU). Posteriormente, la proteína de región extracelular de EphA4 humana-SEAP-His en dilución seriada en el intervalo de 50, 16,7, 5,6, 1,9 y 0,6 nM usando HBS-EP se añadió secuencialmente desde los lados de concentración más baja hacia la más alta sin operación de regeneración. Las curvas de la reacción de unión se observaron secuencialmente en el momento de la adición (fase de asociación, durante 120 s) y después de completarse la adición (fase de disociación, durante 900 s). Después de completar cada observación, el chip detector se regeneró por adición de MgCl₂ 3 M (durante 60 s) o Glicina-HCl 10 mM pH 1,5 (durante 30 segundos). Las curvas de reacción de unión obtenidas se sometieron a análisis de ajuste con modelos de unión 1:1 usando la evaluación de software BIA adjunta al sistema para calcular la afinidad ($KD = kd/ka$) por EphA4 humano (Tabla 6).

Se encontró que todos los anticuerpos humanizados descritos en la Tabla 5 presentaban afinidad sustancialmente equivalente por su anticuerpo A parental (Tabla 6).

[Tabla 6]

Anticuerpo humanizado n°	ka 1/Ms	kd 1/s	KD M	R _{máx1} UR	Chi ² UR ²
75	3,6. E+05	4,2. E-04	1,2.E-09	29	0,17
76	3,3.E+05	3,4.E-04	1,0.E-09	29	0,18
67	3,3.E+05	3,5.E-04	1,1. E-09	28	0,15
77	4,1.E+05	5,8.E-04	1,4.E-09	27	0,20
78	3,4.E+05	3,9.E-04	1,1.E-09	30	0,17
69	3,4.E+05	3,7.E-04	1,1.E-09	29	0,19
81	3,4.E+05	5,4.E-04	1,6.E-09	24	0,12
82	2,9.E+05	4,6.E-04	1,6.E-09	24	0,10
83	2,9.E+05	5,4.E-04	1,9.E-09	20	0,06
84	3,5.E+05	5,8.E-04	1,7.E-09	25	0,13
85	3,1.E+05	5,0.E-04	1,6.E-09	26	0,12
86	3,1.E+05	4,6.E-04	1,5.E-09	26	0,13
87	3,5.E+05	5,1.E-04	1,5.E-09	27	0,12
88	3,0.E+05	4,2.E-04	1,4.E-09	26	0,13

ES 2 846 175 T3

Anticuerpo humanizado nº	ka 1/Ms	kd 1/s	KD M	Rmáx1 UR	Chi² UR²
89	3,1.E+05	4,1.E-04	1,3.E-09	24	0,13
90	3,6.E+05	5,5.E-04	1,5.E-09	27	0,14
91	3,3.E+05	4,4.E-04	1,3.E-09	25	0,13
92	3,3.E+05	4,3.E-04	1,3.E-09	27	0,16
93	3,1.E+05	2,4.E-04	7,7.E-10	24	0,10
94	2,6.E+05	2,4.E-04	9,5.E-10	25	0,06
71	2,8.E+05	2,3.E-04	8,2.E-10	25	0,09
95	3,0.E+05	3,1.E-04	1,0.E-09	27	0,08
96	2,7.E+05	3,1.E-04	1,1. E-09	28	0,07
73	2,9.E+05	2,7.E-04	9,3.E-10	27	0,09
139	3,7.E+05	5,3.E-04	1,4.E-09	29	0,15
140	3,2.E+05	4,3.E-04	1,4.E-09	29	0,12
138	3,3.E+05	4,3.E-04	1,3.E-09	29	0,12
141	3,9.E+05	6,2.E-04	1,6.E-09	26	0,14
142	3,4.E+05	5,0.E-04	1,5.E-09	28	0,12
143	3,5.E+05	5,1.E-04	1,5.E-09	26	0,12
152	4,0.E+05	8,2.E-04	2,0.E-09	23	0,09
153	2,8.E+05	6,0.E-04	2,1.E-09	24	0,07
151	3,2.E+05	5,3.E-04	1,7.E-09	26	0,13
154	3,9.E+05	8,5.E-04	2,2.E-09	24	0,10
145	3,3.E+05	6,5.E-04	2,0.E-09	27	0,11
155	3,3.E+05	6,4.E-04	1,9.E-09	27	0,11
157	3,5.E+05	6,8.E-04	2,0.E-09	24	0,09
158	3,1.E+05	6,1.E-04	1,9.E-09	24	0,06
156	3,1.E+05	5,6.E-04	1,8.E-09	24	0,08

Anticuerpo humanizado nº	ka 1/Ms	kd 1/s	KD M	Rmáx1 UR	Chi² UR²
144	4,0.E+05	7,8.E-04	2,0.E-09	23	0,09
159	3,1.E+05	6,1.E-04	2,0.E-09	22	0,07
160	3,2.E+05	6,1.E-04	1,9.E-09	25	0,06
133	3,0.E+05	3,2.E-04	1,1. E-09	26	0,07
134	2,6.E+05	3,2.E-04	1,2.E-09	24	0,06
132	2,7.E+05	3,1.E-04	1,2.E-09	26	0,06
135	3,2.E+05	4,0.E-04	1,3.E-09	26	0,08
136	2,9.E+05	3,9.E-04	1,4.E-09	25	0,07
137	2,9.E+05	3,8.E-04	1,3.E-09	27	0,09
anticuerpo A	4,2.E+05	2,5.E-04	6,0.E-10	37	0,19

Ejemplo 18: Actividad inhibidora de la unión de EphA4 humano-ligando humano del anticuerpo monoclonal anti-EphA4 humanizado

Se evaluó la actividad inhibidora de cada anticuerpo monoclonal humanizado anti-EphA4 obtenido en el Ejemplo 16 frente a la unión entre EphA4 humano y su ligando humano de acuerdo con las siguientes etapas. Cada pocillo de una placa de 96 pocillos (Nunc) se recubrió con un anticuerpo anti-fosfatasa alcalina (Thermo Fisher Scientific). Después de la incubación durante la noche a 4°C, cada pocillo se bloqueó con BlockAce al 1% (DS Pharma Biomedical) a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar tres veces con Tween 20/PBS al 0,05% (Thermo Fisher Scientific), se añadió la proteína de región extracelular EphA4 humana-SEAP-His obtenida por el método del Ejemplo 2 (concentración final: 10 nM) a cada pocillo y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar tres veces, se añadieron a cada pocillo un ligando y cada anticuerpo humanizado diluido en serie del anticuerpo A (0, 0,003, 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000 y 3000 nM). El ligando usado era quimera Efrina A5-Fc humana biotinilada (R&D Systems, concentración final: 0,7 nM). Después de incubación a temperatura ambiente durante 1 hora y posterior lavado tres veces, se le añadió estreptavidina marcada con peroxidasa de rábano picante (GE Healthcare) y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar tres veces, se añadió una solución de TMBZ (3,3',5,5'-tetrametilbencidina, Sigma-Aldrich) a cada pocillo y se incubó a temperatura ambiente durante 2 minutos. Se añadió a cada pocillo una cantidad igual de una solución de parada de la reacción (H₂SO₄ 1 N, Wako Pure Chemical Industries). La absorbancia a 450 nm se leyó usando un lector de microplacas (PerkinElmer).

Se encontró que todos los anticuerpos humanizados descritos en la Tabla 5 presentaban actividad inhibidora sustancialmente equivalente a su anticuerpo A parental (Tabla 7).

[Tabla 7]

Anticuerpo humanizado N°	CI50 nM
75	2,9
76	2,9
67	4,4
77	3,5

ES 2 846 175 T3

Anticuerpo humanizado N°	CI50 nM
78	2,8
69	3,1
81	4,0
82	4,1
83	3,7
84	4,8
85	4,0
86	4,0
87	3,0
88	3,6
89	4,3
90	4,5
91	4,9
92	3,5
93	2,5
94	2,7
71	2,5
95	3,1
96	3,7
73	2,4
139	3,3
140	2,4
138	2,9
141	3,0
142	3,7
143	5,3

Anticuerpo humanizado N°	CI50 nM
152	2,0
153	2,3
151	2,0
154	2,5
145	3,7
155	2,4
157	2,6
158	2,8
156	2,5
144	3,6
159	2,6
160	2,2
133	3,0
134	3,0
132	3,1
135	2,5
136	2,5
137	2,5

Ejemplo 19: Selectividad del anticuerpo monoclonal humanizado anti-EphA4 por el receptor Eph humano

Según el método descrito en el ejemplo 7, una secuencia de ADN que codifica la secuencia señal y la región extracelular de cada receptor Eph humano (EphA1, EphA2, EphA3, EphA4, EphA5, EphA6, EphA7, EphA8, EphA10, EphB1, EphB2, EphB3, EphB4 y EphB6) se amplificó mediante RT-PCR usando ARN total derivado de tejido y se clonó en un vector pENTR1A (Invitrogen/life Technologies) que tiene una secuencia de ADN que codifica la proteína SEAP y el marcador de histidina. A continuación, la secuencia de ADN que codifica la secuencia señal y la región extracelular de cada receptor Eph humano, proteína SEAP y marcador de histidina se transfirió a un vector pcDNA3.1_rfcB a través de la reacción LR usando Gateway System (Invitrogen/life Technologies) para construir un vector para la expresión de una proteína de la región extracelular de cada receptor Eph humano fusionada con la proteína SEAP y el marcador His (denominada "proteína de región extracelular del receptor Eph-SEAP-His") (este vector se denomina "vector de expresión de la proteína de región receptor extracelular del receptor Eph-SEAP-His").

A continuación, cada vector de expresión de la proteína de región extracelular del receptor Eph humano-SEAP-His se transfirió a células Expi293F (Gibco/Thermo Fisher Scientific) usando el sistema de expresión Expi293 (Gibco/Thermo Fisher Scientific). Después de la incubación (5% de CO₂, 37°C) durante 5 días, se recuperó el líquido sobrenadante del cultivo y se centrifugó a 1500 rpm a temperatura ambiente durante 5 minutos. El líquido sobrenadante de la centrifugación se filtró a través de un filtro de 0,45 µm (Merck Millipore).

Se evaluó la actividad de unión de cada anticuerpo monoclonal humanizado anti-EphA4 obtenido en el Ejemplo 16 frente a cada receptor Eph humano de acuerdo con las siguientes etapas.

- 5 Cada pocillo de una placa de 96 pocillos (Nunc) se recubrió con un anticuerpo de conejo anti-6-His (Bethyl Laboratories). Cada pocillo se bloqueó a temperatura ambiente durante 1 hora y después se incubó durante la noche con BlockAce al 1% (DS Pharma Biomedical) a 4°C. Después de lavar con Tween 20/PBS al 0,05% (Nacalai Tesque) tres veces, la se añadió proteína SEAP-His de EphA1, EphA2, EphA3, EphA4, EphA5, EphA6, EphA7, EphA8, EphA10, EphB1, EphB2, EphB3, EphB4 o EphB6 humano (concentración final: 1 nM) a cada pocillo y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar tres veces, se añadió el anticuerpo humanizado a cada pocillo y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar tres veces, se le añadió un anticuerpo de burro anti-IgG de ratón marcado con peroxidasa de rábano picante (Jackson ImmunoResearch Laboratories) y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar tres veces, se añadió a cada pocillo el sistema TMB Microwell Peroxidase Substrate System (Kirkegaard & Perry Laboratories (KPL)). Después de confirmar el desarrollo moderado del color, se añadió a cada pocillo una cantidad igual de una solución de parada de la reacción (H₂SO₄ 1N, Wako Pure Chemical Industries). La absorbancia a 450 nm se leyó usando un lector de microplacas (Thermo Fisher Scientific).
- 10
- 15 Los porcentajes con respecto a la absorbancia a 450 nm para EphA4 humano (hEphA4-SEAP-His) como 100% se resumen en la tabla 8. Como resultado, se encontró que todos los anticuerpos humanizados descritos en la tabla 5 se unían específicamente a EphA4 humano, como con su anticuerpo A parental (tabla 8).

[Tabla 8]

Anticuerpo humanizado	SEAP- His	hEphA1- SEAP-	hEphA2- SEAP-	hEphA3- SEAP-	hEphA4- SEAP-	hEph5- SEAP-	hEph6- SEAP-	hEph7- SEAP-	hEph8- SEAP-	hEph10- SEAP-	hEphB1- SEAP-	hEphB2- SEAP-	hEphB3- SEAP-	hEphB4- SEAP-	hEphB6- SEAP-
75	4.4	4.7	4.6	4.8	100	4.7	8.3	4.7	4.8	4.4	4.4	4.5	4.7	4.6	4.7
76	5.5	5.1	4.8	4.9	100	5.3	7.9	4.8	5.5	4.7	4.9	4.9	5.0	5.2	5.2
67	5.0	4.6	4.6	4.8	100	4.8	7.3	4.7	4.7	4.6	4.6	4.7	4.9	4.9	4.7
77	4.7	4.5	4.5	4.5	100	4.4	6.0	4.3	4.8	4.5	4.6	4.5	4.6	4.5	4.5
78	5.3	6.6	4.9	5.1	100	5.1	10.0	5.0	5.4	5.2	5.0	5.1	5.2	5.1	5.2
69	6.1	5.7	5.5	5.4	100	5.6	9.5	5.3	5.5	5.4	5.6	5.5	5.9	5.5	5.6
81	5.0	4.4	4.8	5.0	100	4.9	8.8	5.2	5.2	4.8	4.9	5.0	4.9	5.0	5.0
82	5.9	5.4	5.4	5.4	100	6.5	8.7	5.4	5.8	5.4	5.4	5.6	5.6	5.7	5.5
83	6.5	5.7	5.8	5.7	100	5.8	7.5	5.5	6.0	5.6	5.6	5.6	5.7	5.7	5.8
84	5.1	5.2	4.9	4.9	100	5.0	6.0	4.8	5.3	5.1	5.2	4.9	4.8	5.4	4.9
85	5.3	5.0	5.1	5.1	100	5.0	6.2	4.8	5.5	5.0	5.0	5.1	5.2	5.2	5.2
86	6.1	5.9	5.7	5.8	100	5.7	8.6	5.6	5.7	5.6	5.7	5.7	5.9	5.8	5.7
87	5.5	5.3	5.4	5.5	100	5.4	6.4	5.3	5.7	5.2	5.3	5.4	5.5	5.5	5.3
88	6.1	5.8	5.8	6.0	100	5.9	7.5	6.0	6.2	5.8	6.1	6.0	6.3	6.1	6.1
89	5.8	5.5	5.6	5.8	100	5.8	8.4	5.4	5.7	5.7	5.7	5.7	5.7	5.8	4.8
90	5.2	5.1	5.2	5.2	100	5.1	7.6	4.9	5.4	5.1	4.9	5.9	5.1	5.0	5.2
91	6.4	5.8	6.1	6.6	100	6.4	8.8	5.6	6.2	8.5	6.6	7.0	7.0	6.2	6.3
92	6.5	7.0	6.9	6.5	100	6.8	9.6	6.4	6.7	6.6	6.9	6.6	6.9	6.6	6.5
93	5.0	5.0	5.0	5.1	100	4.9	7.1	4.9	5.0	4.9	5.0	5.0	5.1	5.0	4.9
94	6.7	6.5	6.4	6.8	100	6.5	8.6	6.1	7.0	6.4	6.7	7.0	6.7	6.5	6.4
71	5.6	5.6	5.7	5.6	100	5.6	9.2	5.2	5.3	5.3	5.4	5.5	5.5	5.5	5.3
95	4.4	4.5	4.2	4.8	100	4.6	7.0	4.4	4.4	4.5	4.6	4.7	4.6	4.6	4.7
96	5.5	5.6	5.3	5.5	100	6.0	9.8	5.3	5.4	5.3	5.6	5.5	5.6	5.5	5.5
73	5.8	6.0	5.7	5.8	100	6.0	7.4	5.6	5.8	5.6	5.7	5.6	5.8	5.7	5.6
139	5.7	5.7	5.9	5.9	100	5.7	10.0	5.5	6.0	5.5	5.5	5.7	5.6	5.7	5.9
140	5.4	5.5	5.3	5.5	100	5.4	10.8	5.2	5.4	5.2	5.3	5.3	5.4	5.4	5.2
138	5.1	5.2	5.0	4.9	100	5.1	10.2	4.9	5.4	5.0	5.1	5.2	5.1	5.2	5.0
141	5.0	5.3	5.2	5.3	100	5.3	9.0	5.3	5.5	5.2	5.4	5.2	5.2	5.4	5.4
142	5.8	5.6	5.6	5.5	100	5.7	9.7	5.5	5.7	5.4	5.6	5.6	5.6	5.7	5.6
143	6.3	6.0	5.7	5.6	100	6.1	9.9	5.8	6.0	5.2	5.9	5.8	5.9	5.9	5.6
152	5.4	5.8	5.8	5.8	100	5.8	8.3	5.7	6.0	5.8	5.9	5.8	6.0	5.9	5.9
153	5.9	6.3	6.0	6.1	100	6.1	8.7	6.2	6.1	6.0	6.0	5.9	5.9	6.0	6.2
151	6.8	7.1	6.9	6.9	100	7.0	9.9	6.8	6.9	6.6	6.8	7.0	7.3	7.4	7.1

(continuación)

Anticuerpo humanizado	SEAP- His	hEphA1- SEAP-	hEphA2- SEAP-	hEphA3- SEAP-	hEphA4- SEAP-	hEph5- SEAP-	hEph6- SEAP-	hEph7- SEAP-	hEph8- SEAP-	hEph10- SEAP-	hEphB1- SEAP-	hEphB2- SEAP-	hEphB3- SEAP-	hEphB4- SEAP-	hEphB6 -SEAP-
154	6.3	6.4	6.2	6.2	100	6.3	8.4	6.3	5.5	5.9	6.3	6.2	6.2	6.4	6.4
145	6.4	6.7	6.5	6.6	100	6.6	8.6	6.3	6.6	6.5	6.5	6.7	6.7	6.7	6.6
155	5.8	5.5	5.5	5.6	100	5.6	7.2	5.6	5.5	5.4	5.4	5.5	5.5	5.7	5.6
157	6.1	6.2	6.3	6.4	100	6.1	9.0	6.0	6.0	6.1	6.1	6.2	6.4	6.5	6.3
158	6.3	6.5	6.7	6.5	100	6.7	10.0	6.3	6.4	6.4	6.2	6.3	6.5	6.5	6.3
156	5.4	5.7	5.5	5.7	100	5.7	8.9	5.6	5.5	5.3	5.4	5.5	5.6	5.6	5.7
144	5.7	5.6	5.6	5.7	100	5.6	8.1	5.6	5.8	5.7	5.7	5.7	5.8	5.7	5.9
159	5.3	5.4	5.4	5.4	100	5.5	7.6	5.5	5.5	5.3	5.3	5.4	5.5	5.4	5.5
160	6.3	6.5	6.1	6.2	100	6.5	8.7	6.1	5.4	5.0	6.1	6.2	6.2	6.3	6.2
133	4.7	4.9	4.7	5.0	100	4.7	8.8	4.6	4.7	4.7	4.6	4.6	4.7	4.9	4.8
134	5.1	5.1	5.0	5.0	100	5.2	9.6	5.1	5.7	5.0	5.1	5.1	5.2	5.1	5.2
132	4.9	4.8	4.8	4.8	100	4.7	9.7	4.5	4.7	4.7	4.8	4.7	4.7	4.8	4.7
135	5.3	5.2	5.0	5.0	100	5.0	7.0	5.2	5.0	5.1	5.1	5.0	5.0	5.1	5.3
136	5.2	5.3	5.1	5.2	100	5.2	7.2	5.4	5.4	5.2	5.2	5.3	5.5	5.2	5.5
137	5.9	6.1	5.4	5.6	100	5.7	7.1	5.8	5.9	5.6	5.8	5.6	5.7	5.7	5.7

Ejemplo 20: Efecto protector de las neuronas motoras del anticuerpo monoclonal humanizado anti-EphA4 en un modelo de ELA in vitro derivado de células iPS humanas

Las células iPS humanas se mantienen y cultivan de acuerdo con las siguientes etapas. Células iPS humanas (201B7) crioconservadas en nitrógeno líquido usando el banco de células madre (TAKARA) se extraen de la fase gaseosa del nitrógeno líquido y se suspenden y descongelan inmediatamente en 5 ml de un medio de cultivo de células iPS humanas (Essential 8, Thermo Fisher Scientific) precalentado a 37°C. La suspensión celular se recupera en un tubo cónico de 15 ml (Falcon) y se centrifuga (1000 rpm, 5 min, temperatura ambiente), seguido de la eliminación del líquido sobrenadante. Las células se suspenden en un medio nuevo y después se diseminan en una placa de cultivo celular de Φ 60 mm (Falcon BD) recubierta con 0,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de vitronectina humana recombinante (Invitrogen) previamente. Se les añade Y-27632 10 μM (Wako Pure Chemical Industries) y las células se mantienen y cultivan en una incubadora de CO₂ (5% de CO₂, 37°C). Se lleva a cabo la sustitución del medio todos los días y las células se someten al experimento cuando alcanzan la confluencia.

El efecto protector de las neuronas motoras del anticuerpo monoclonal humanizado anti-EphA4 obtenido en el ejemplo 16 en los modelos de ELA in vitro se evalúa de acuerdo con las siguientes etapas. El medio de cultivo de las células iPS humanas mantenidas y cultivadas se aspira y las células se lavan con 2 ml de PBS (Wako Pure Chemical Industries). Después de la aspiración de PBS, se añaden 500 μL de EDTA 0,5 mM a las células, que después se incuban durante 2 a 3 minutos en una incubadora de CO₂ (5% de CO₂, 37°C) (las células se confirman al microscopio cada 30 segundos, y la incubación se interrumpe cuando la asociación intercelular se debilita). La reacción de EDTA se termina mediante suspensión en 5 ml de un medio de cultivo de células iPS humanas, y las células se recuperan en un tubo cónico de 15 ml. Las células se centrifugan a 1000 rpm a temperatura ambiente durante 5 minutos y se aspira el líquido sobrenadante. La suspensión celular que contiene masas de células iPS humanas se inocula en una cantidad de aproximadamente 1/10 por pocillo en una placa de cultivo celular de 6 pocillos de baja adhesión (Nunclon Sphere, Nunc) y se cultiva en una incubadora de CO₂ (5% de CO₂, 37°C) usando un medio DFK (DMEM avanzado/F-12 (Invitrogen):medio neurobasal (Invitrogen) [1:1] medio que contiene suplemento de B27 al 2%, reemplazo de suero KnockOut al 5% (Invitrogen), L-glutamina 2 mmol/l, penicilina 100 unidades/ml- estreptomycin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y β -mercaptoetanol 0,1 mmol/l) complementado con SB431542 2 μM (Sigma-Aldrich), LDN193189 300 nM (Sigma-Aldrich) y CHIR99021 3 μM (Sigma-Aldrich). Se lleva a cabo la sustitución del medio cada 2 días por el siguiente método. Primero, se recuperan agregados de células diferenciadas de células iPS humanas (SFEB) en un medio base en un tubo cónico de 15 ml y se dejan reposar a temperatura normal durante 5 minutos para precipitar las masas de células. Este líquido sobrenadante se aspira y se añade un medio DFK nuevo y SB431542 2 μM (Sigma-Aldrich), LDN193189 300 nM (Sigma-Aldrich), CHIR99021 3 μM (Sigma-Aldrich) y después se devuelve al pocillo original para la sustitución de medio. El día de cultivo 8, los SFEB se recuperan en un medio base en un tubo cónico de 15 ml y se dejan reposar a temperatura normal durante 5 minutos para precipitar los SFEB. Este líquido sobrenadante se aspira y se añade un medio DFK nuevo y después ácido retinoico 0,1 μM (Sigma-Aldrich) y purmorfamina 0,5 μM (Miltényi Biotec), y después se devuelve al pocillo original y se cultiva en una incubadora de CO₂ (5% de CO₂, 37°C). La sustitución de medio se realiza cada 2 días. El día de cultivo 12, los SFEB se recuperan en un medio base en un tubo cónico de 15 ml y se dejan reposar a temperatura normal durante 5 minutos para precipitar los SFEB. Se aspira el líquido sobrenadante y se añaden 500 μl de Accumax (MS TechnoSystems) a las células, que después se pipeteen varias veces y después se incuban durante 5 minutos en una incubadora de CO₂ (5% de CO₂, 37°C). Las células se sacan de la incubadora, se suspenden en 5 ml de un medio DFK y se pipeteen varias veces para dispersar las masas celulares. La suspensión celular se disocia en células individuales por filtración a través de un filtro de células (Falcon). Después, se cuenta el número de células usando una cámara de recuento. La suspensión celular se recupera en otro tubo cónico de 15 ml y se centrifuga a 1000 rpm a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se prepara una suspensión que tiene una densidad celular de $5,5 \times 10^5$ células/ml con un medio de cultivo de motoneuronas (DMEM avanzado/F-12 (Invitrogen):medio neurobasal (Invitrogen) [1:1] medio que contiene suplemento B27 al 2%, suero de caballo al 1%, L-glutamina 2 mmol/l, penicilina 100 unidades/ml - estreptomycin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y β -mercaptoetanol 0,1 mmol/l) y se inoculan 200 $\mu\text{l}/\text{pocillo}$ en una cámara de 8 pocillos que contiene astrocitos de tipo natural derivados de ratón o astrocitos que expresan la variante SOD1 humana (G93A) previamente inoculados con 8×10^4 células/pocillo. Las células cocultivadas resultantes de los astrocitos y las neuronas motoras se usan en la evaluación (el establecimiento, congelación, descongelación, inoculación y mantenimiento y cultivo de los astrocitos de tipo natural y los que expresan la variante SOD1 humana (G93A) se realizan de la misma manera como en el ejemplo 13). El número de neuronas motoras observadas por el cocultivo de los astrocitos de tipo natural y las neuronas motoras se usa como control. Para el grupo tratado con fármaco, los astrocitos que expresan la variante SOD1 humana (G93A) y las neuronas motoras se cocultivan en unas condiciones que implican la adición de vehículo (IgG y agua ultrapura al 0,1%) y el anticuerpo humanizado. Después del cultivo durante 2 días a 37°C en un ambiente de 5% de CO₂ en cada una de las condiciones, las neuronas motoras se tiñen de forma inmunocitoquímica con un anticuerpo anti-ISL1 (obtenido de Developmental Studies Hybridoma Bank) y Hoechst 33342 (Molecular Probes). Las células copositivas ISL1/Hoechst 33342 por pocillo se cuentan como neuronas motoras vivas, y la tasa de supervivencia de las neuronas motoras se calcula como % con respecto al control.

La tasa de supervivencia de las neuronas motoras se reduce significativamente en el cocultivo de astrocitos que expresan la variante SOD1 humana (G93A)/neuronas motoras derivadas de células iPS humanas. El anticuerpo humanizado descrito en la Tabla 5 suprimió, de una manera dependiente de la concentración, la muerte de neuronas motoras derivadas de células iPS humanas inducida por los astrocitos que expresan la variante SOD1 humana (G93A).

Por consiguiente, se muestra que el anticuerpo humanizado monoclonal anti-EphA4 promueve la supervivencia de las neuronas motoras en células humanas.

Aplicabilidad industrial

- 5 La presente invención puede proporcionar un anticuerpo anti-EphA4 o un fragmento de unión a EphA4 del mismo que es capaz de unirse a EphA4 e inhibir la unión entre EphA4 y su ligando, y una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo como un principio activo. El anticuerpo o la composición farmacéutica según la presente invención pueden ser útiles en el tratamiento de enfermedades causadas por la unión entre EphA4 y su ligando, por ejemplo, ELA.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 10 <110> EISAI R&D MANAGEMENT CO., LTD.

<120> ANTICUERPO ANTI-EPHA4

<130> ESAP1505F

<150> JP2015-177081

<151> 2015-09-08

- 15 <160> 85

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 986

- 20 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

ES 2 846 175 T3

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

ES 2 846 175 T3

	165		170		175
Ser Lys Lys Gly Phe Tyr Leu Ala Phe Gln Asp Val Gly Ala Cys Ile	180		185		190
Ala Leu Val Ser Val Arg Val Phe Tyr Lys Lys Cys Pro Leu Thr Val	195		200		205
Arg Asn Leu Ala Gln Phe Pro Asp Thr Ile Thr Gly Ala Asp Thr Ser	210		215		220
Ser Leu Val Glu Val Arg Gly Ser Cys Val Asn Asn Ser Glu Glu Lys	225		230		240
Asp Val Pro Lys Met Tyr Cys Gly Ala Asp Gly Glu Trp Leu Val Pro	245		250		255
Ile Gly Asn Cys Leu Cys Asn Ala Gly His Glu Glu Gln Asn Gly Glu	260		265		270
Cys Gln Ala Cys Lys Ile Gly Tyr Tyr Lys Ala Leu Ser Thr Asp Ala	275		280		285
Ser Cys Ala Lys Cys Pro Pro His Ser Tyr Ser Val Trp Glu Gly Ala	290		295		300
Thr Ser Cys Thr Cys Asp Arg Gly Phe Phe Arg Ala Asp Asn Asp Ala	305		310		320
Ala Ser Met Pro Cys Thr Arg Pro Pro Ser Ala Pro Leu Asn Leu Ile	325		330		335
Ser Asn Val Asn Glu Thr Ser Val Asn Leu Glu Trp Ser Ser Pro Gln	340		345		350
Asn Thr Gly Gly Arg Gln Asp Ile Ser Tyr Asn Val Val Cys Lys Lys	355		360		365
Cys Gly Ala Gly Asp Pro Ser Lys Cys Arg Pro Cys Gly Ser Gly Val	370		375		380
His Tyr Thr Pro Gln Gln Asn Gly Leu Lys Thr Thr Arg Val Ser Ile	385		390		400
Thr Asp Leu Leu Ala His Thr Asn Tyr Thr Phe Glu Ile Trp Ala Val	405		410		415

ES 2 846 175 T3

Asn Gly Val	Ser Lys Tyr	Asn Pro	Ser Pro	Asp Gln	Ser Val	Ser Val
420		425			430	
Thr Val Thr	Thr Asn Gln	Ala Ala	Pro Ser	Ser Ile	Ala Leu	Val Gln
435		440			445	
Ala Lys Glu	Val Thr Arg	Tyr Ser	Val Ala	Leu Ala	Trp Leu	Glu Pro
450		455			460	
Asp Arg Pro	Asn Gly Val	Ile Leu	Glu Tyr	Glu Val	Lys Tyr	Tyr Glu
465		470		475		480
Lys Asp Gln	Asn Glu Arg	Ser Tyr	Arg Ile	Val Arg	Thr Ala	Ala Arg
	485		490			495
Asn Thr Asp	Ile Lys Gly	Leu Asn	Pro Leu	Thr Ser	Tyr Val	Phe His
	500		505		510	
Val Arg Ala	Arg Thr Ala	Ala Gly	Tyr Gly	Asp Phe	Ser Glu	Pro Leu
	515		520		525	
Glu Val Thr	Thr Asn Thr	Val Pro	Ser Arg	Ile Ile	Gly Asp	Gly Ala
530		535		540		
Asn Ser Thr	Val Leu Leu	Val Ser	Val Ser	Gly Ser	Val Val	Leu Val
545		550		555		560
Val Ile Leu	Ile Ala Ala	Phe Val	Ile Ser	Arg Arg	Arg Ser	Lys Tyr
	565		570			575
Ser Lys Ala	Lys Gln Glu	Ala Asp	Glu Glu	Lys His	Leu Asn	Gln Gly
	580		585		590	
Val Arg Thr	Tyr Val Asp	Pro Phe	Thr Tyr	Glu Asp	Pro Asn	Gln Ala
	595		600		605	
Val Arg Glu	Phe Ala Lys	Glu Ile	Asp Ala	Ser Cys	Ile Lys	Ile Glu
610		615		620		
Lys Val Ile	Gly Val Gly	Glu Phe	Gly Glu	Val Cys	Ser Gly	Arg Leu
625		630		635		640
Lys Val Pro	Gly Lys Arg	Glu Ile	Cys Val	Ala Ile	Lys Thr	Leu Lys
	645		650			655
Ala Gly Tyr	Thr Asp Lys	Gln Arg	Arg Asp	Phe Leu	Ser Glu	Ala Ser
	660		665		670	

ES 2 846 175 T3

Ile	Met	Gly	Gln	Phe	Asp	His	Pro	Asn	Ile	Ile	His	Leu	Glu	Gly	Val	675	680	685
Val	Thr	Lys	Cys	Lys	Pro	Val	Met	Ile	Ile	Thr	Glu	Tyr	Met	Glu	Asn	690	695	700
Gly	Ser	Leu	Asp	Ala	Phe	Leu	Arg	Lys	Asn	Asp	Gly	Arg	Phe	Thr	Val	705	710	715
Ile	Gln	Leu	Val	Gly	Met	Leu	Arg	Gly	Ile	Gly	Ser	Gly	Met	Lys	Tyr	725	730	735
Leu	Ser	Asp	Met	Ser	Tyr	Val	His	Arg	Asp	Leu	Ala	Ala	Arg	Asn	Ile	740	745	750
Leu	Val	Asn	Ser	Asn	Leu	Val	Cys	Lys	Val	Ser	Asp	Phe	Gly	Met	Ser	755	760	765
Arg	Val	Leu	Glu	Asp	Asp	Pro	Glu	Ala	Ala	Tyr	Thr	Thr	Arg	Gly	Gly	770	775	780
Lys	Ile	Pro	Ile	Arg	Trp	Thr	Ala	Pro	Glu	Ala	Ile	Ala	Tyr	Arg	Lys	785	790	795
Phe	Thr	Ser	Ala	Ser	Asp	Val	Trp	Ser	Tyr	Gly	Ile	Val	Met	Trp	Glu	805	810	815
Val	Met	Ser	Tyr	Gly	Glu	Arg	Pro	Tyr	Trp	Asp	Met	Ser	Asn	Gln	Asp	820	825	830
Val	Ile	Lys	Ala	Ile	Glu	Glu	Gly	Tyr	Arg	Leu	Pro	Pro	Pro	Met	Asp	835	840	845
Cys	Pro	Ile	Ala	Leu	His	Gln	Leu	Met	Leu	Asp	Cys	Trp	Gln	Lys	Glu	850	855	860
Arg	Ser	Asp	Arg	Pro	Lys	Phe	Gly	Gln	Ile	Val	Asn	Met	Leu	Asp	Lys	865	870	875
Leu	Ile	Arg	Asn	Pro	Asn	Ser	Leu	Lys	Arg	Thr	Gly	Ser	Glu	Ser	Ser	885	890	895
Arg	Pro	Asn	Thr	Ala	Leu	Leu	Asp	Pro	Ser	Ser	Pro	Glu	Phe	Ser	Ala	900	905	910
Val	Val	Ser	Val	Gly	Asp	Trp	Leu	Gln	Ala	Ile	Lys	Met	Asp	Arg	Tyr	915	920	925

ES 2 846 175 T3

Lys Asp Asn Phe Thr Ala Ala Gly Tyr Thr Thr Leu Glu Ala Val Val
930 935 940

His Met Ser Gln Asp Asp Leu Ala Arg Ile Gly Ile Thr Ala Ile Thr
945 950 955 960

His Gln Asn Lys Ile Leu Ser Ser Val Gln Ala Met Arg Thr Gln Met
965 970 975

Gln Gln Met His Gly Arg Met Val Pro Val
980 985

<210> 2

<211> 528

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Val Thr Gly Ser Arg Val Tyr Pro Ala Asn Glu Val Thr Leu Leu Asp
1 5 10 15

Ser Arg Ser Val Gln Gly Glu Leu Gly Trp Ile Ala Ser Pro Leu Glu
20 25 30

Gly Gly Trp Glu Glu Val Ser Ile Met Asp Glu Lys Asn Thr Pro Ile
35 40 45

Arg Thr Tyr Gln Val Cys Asn Val Met Glu Ala Ser Gln Asn Asn Trp
50 55 60

Leu Arg Thr Asp Trp Ile Thr Arg Glu Gly Ala Gln Arg Val Tyr Ile
65 70 75 80

Glu Ile Lys Phe Thr Leu Arg Asp Cys Asn Ser Leu Pro Gly Val Met
85 90 95

Gly Thr Cys Lys Glu Thr Phe Asn Leu Tyr Tyr Tyr Glu Ser Asp Asn
100 105 110

Asp Lys Glu Arg Phe Ile Arg Glu Ser Gln Phe Gly Lys Ile Asp Thr
115 120 125

Ile Ala Ala Asp Glu Ser Phe Thr Gln Val Asp Ile Gly Asp Arg Ile
130 135 140

Met Lys Leu Asn Thr Glu Ile Arg Asp Val Gly Pro Leu Ser Lys Lys
145 150 155 160

10

ES 2 846 175 T3

Gly Phe Tyr Leu Ala Phe Gln Asp Val Gly Ala Cys Ile Ala Leu Val
 165 170 175
 Ser Val Arg Val Phe Tyr Lys Lys Cys Pro Leu Thr Val Arg Asn Leu
 180 185 190
 Ala Gln Phe Pro Asp Thr Ile Thr Gly Ala Asp Thr Ser Ser Leu Val
 195 200 205
 Glu Val Arg Gly Ser Cys Val Asn Asn Ser Glu Glu Lys Asp Val Pro
 210 215 220
 Lys Met Tyr Cys Gly Ala Asp Gly Glu Trp Leu Val Pro Ile Gly Asn
 225 230 235 240
 Cys Leu Cys Asn Ala Gly His Glu Glu Gln Asn Gly Glu Cys Gln Ala
 245 250 255
 Cys Lys Ile Gly Tyr Tyr Lys Ala Leu Ser Thr Asp Ala Ser Cys Ala
 260 265 270
 Lys Cys Pro Pro His Ser Tyr Ser Val Trp Glu Gly Ala Thr Ser Cys
 275 280 285
 Thr Cys Asp Arg Gly Phe Phe Arg Ala Asp Asn Asp Ala Ala Ser Met
 290 295 300
 Pro Cys Thr Arg Pro Pro Ser Ala Pro Leu Asn Leu Ile Ser Asn Val
 305 310 315 320
 Asn Glu Thr Ser Val Asn Leu Glu Trp Ser Ser Pro Gln Asn Thr Gly
 325 330 335
 Gly Arg Gln Asp Ile Ser Tyr Asn Val Val Cys Lys Lys Cys Gly Ala
 340 345 350
 Gly Asp Pro Ser Lys Cys Arg Pro Cys Gly Ser Gly Val His Tyr Thr
 355 360 365
 Pro Gln Gln Asn Gly Leu Lys Thr Thr Arg Val Ser Ile Thr Asp Leu
 370 375 380
 Leu Ala His Thr Asn Tyr Thr Phe Glu Ile Trp Ala Val Asn Gly Val
 385 390 395 400
 Ser Lys Tyr Asn Pro Ser Pro Asp Gln Ser Val Ser Val Thr Val Thr

ES 2 846 175 T3

405 410 415
 Thr Asn Gln Ala Ala Pro Ser Ser Ile Ala Leu Val Gln Ala Lys Glu
 420 425 430
 Val Thr Arg Tyr Ser Val Ala Leu Ala Trp Leu Glu Pro Asp Arg Pro
 435 440 445
 Asn Gly Val Ile Leu Glu Tyr Glu Val Lys Tyr Tyr Glu Lys Asp Gln
 450 455 460
 Asn Glu Arg Ser Tyr Arg Ile Val Arg Thr Ala Ala Arg Asn Thr Asp
 465 470 475 480
 Ile Lys Gly Leu Asn Pro Leu Thr Ser Tyr Val Phe His Val Arg Ala
 485 490 495
 Arg Thr Ala Ala Gly Tyr Gly Asp Phe Ser Glu Pro Leu Glu Val Thr
 500 505 510
 Thr Asn Thr Val Pro Ser Arg Ile Ile Gly Asp Gly Ala Asn Ser Thr
 515 520 525
 <210> 3
 <211> 986
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 3
 Met Ala Gly Ile Phe Tyr Phe Ala Leu Phe Ser Cys Leu Phe Gly Ile
 1 5 10 15
 Cys Asp Ala Val Thr Gly Ser Arg Val Tyr Pro Ala Asn Glu Val Thr
 20 25 30
 Leu Leu Asp Ser Arg Ser Val Gln Gly Glu Leu Gly Trp Ile Ala Ser
 35 40 45
 Pro Leu Glu Gly Gly Trp Glu Glu Val Ser Ile Met Asp Glu Lys Asn
 50 55 60
 Thr Pro Ile Arg Thr Tyr Gln Val Cys Asn Val Met Glu Pro Ser Gln
 65 70 75 80
 Asn Asn Trp Leu Arg Thr Asp Trp Ile Thr Arg Glu Gly Ala Gln Arg
 85 90 95
 Val Tyr Ile Glu Ile Lys Phe Thr Leu Arg Asp Cys Asn Ser Leu Pro

ES 2 846 175 T3

100	105	110
Gly Val Met Gly Thr Cys Lys Glu Thr Phe Asn Leu Tyr Tyr Tyr Glu 115 120 125		
Ser Asp Asn Asp Lys Glu Arg Phe Ile Arg Glu Asn Gln Phe Val Lys 130 135 140		
Ile Asp Thr Ile Ala Ala Asp Glu Ser Phe Thr Gln Val Asp Ile Gly 145 150 155 160		
Asp Arg Ile Met Lys Leu Asn Thr Glu Ile Arg Asp Val Gly Pro Leu 165 170 175		
Ser Lys Lys Gly Phe Tyr Leu Ala Phe Gln Asp Val Gly Ala Cys Ile 180 185 190		
Ala Leu Val Ser Val Arg Val Phe Tyr Lys Lys Cys Pro Leu Thr Val 195 200 205		
Arg Asn Leu Ala Gln Phe Pro Asp Thr Ile Thr Gly Ala Asp Thr Ser 210 215 220		
Ser Leu Val Glu Val Arg Gly Ser Cys Val Asn Asn Ser Glu Glu Lys 225 230 235 240		
Asp Val Pro Lys Met Tyr Cys Gly Ala Asp Gly Glu Trp Leu Val Pro 245 250 255		
Ile Gly Asn Cys Leu Cys Asn Ala Gly His Glu Glu Arg Ser Gly Glu 260 265 270		
Cys Gln Ala Cys Lys Ile Gly Tyr Tyr Lys Ala Leu Ser Thr Asp Ala 275 280 285		
Thr Cys Ala Lys Cys Pro Pro His Ser Tyr Ser Val Trp Glu Gly Ala 290 295 300		
Thr Ser Cys Thr Cys Asp Arg Gly Phe Phe Arg Ala Asp Asn Asp Ala 305 310 315 320		
Ala Ser Met Pro Cys Thr Arg Pro Pro Ser Ala Pro Leu Asn Leu Ile 325 330 335		
Ser Asn Val Asn Glu Thr Ser Val Asn Leu Glu Trp Ser Ser Pro Gln 340 345 350		

ES 2 846 175 T3

Asn Thr Gly Gly Arg Gln Asp Ile Ser Tyr Asn Val Val Cys Lys Lys
 355 360 365
 Cys Gly Ala Gly Asp Pro Ser Lys Cys Arg Pro Cys Gly Ser Gly Val
 370 375 380
 His Tyr Thr Pro Gln Gln Asn Gly Leu Lys Thr Thr Lys Val Ser Ile
 385 390 395 400
 Thr Asp Leu Leu Ala His Thr Asn Tyr Thr Phe Glu Ile Trp Ala Val
 405 410 415
 Asn Gly Val Ser Lys Tyr Asn Pro Asn Pro Asp Gln Ser Val Ser Val
 420 425 430
 Thr Val Thr Thr Asn Gln Ala Ala Pro Ser Ser Ile Ala Leu Val Gln
 435 440 445
 Ala Lys Glu Val Thr Arg Tyr Ser Val Ala Leu Ala Trp Leu Glu Pro
 450 455 460
 Asp Arg Pro Asn Gly Val Ile Leu Glu Tyr Glu Val Lys Tyr Tyr Glu
 465 470 475 480
 Lys Asp Gln Asn Glu Arg Ser Tyr Arg Ile Val Arg Thr Ala Ala Arg
 485 490 495
 Asn Thr Asp Ile Lys Gly Leu Asn Pro Leu Thr Ser Tyr Val Phe His
 500 505 510
 Val Arg Ala Arg Thr Ala Ala Gly Tyr Gly Asp Phe Ser Glu Pro Leu
 515 520 525
 Glu Val Thr Thr Asn Thr Val Pro Ser Arg Ile Ile Gly Asp Gly Ala
 530 535 540
 Asn Ser Thr Val Leu Leu Val Ser Val Ser Gly Ser Val Val Leu Val
 545 550 555 560
 Val Ile Leu Ile Ala Ala Phe Val Ile Ser Arg Arg Arg Ser Lys Tyr
 565 570 575
 Ser Lys Ala Lys Gln Glu Ala Asp Glu Glu Lys His Leu Asn Gln Gly
 580 585 590
 Val Arg Thr Tyr Val Asp Pro Phe Thr Tyr Glu Asp Pro Asn Gln Ala
 595 600 605

ES 2 846 175 T3

Val	Arg	Glu	Phe	Ala	Lys	Glu	Ile	Asp	Ala	Ser	Cys	Ile	Lys	Ile	Glu	610	615	620
Lys	Val	Ile	Gly	Val	Gly	Glu	Phe	Gly	Glu	Val	Cys	Ser	Gly	Arg	Leu	625	630	635
Lys	Val	Pro	Gly	Lys	Arg	Glu	Ile	Cys	Val	Ala	Ile	Lys	Thr	Leu	Lys	645	650	655
Ala	Gly	Tyr	Thr	Asp	Lys	Gln	Arg	Arg	Asp	Phe	Leu	Ser	Glu	Ala	Ser	660	665	670
Ile	Met	Gly	Gln	Phe	Asp	His	Pro	Asn	Ile	Ile	His	Leu	Glu	Gly	Val	675	680	685
Val	Thr	Lys	Cys	Lys	Pro	Val	Met	Ile	Ile	Thr	Glu	Tyr	Met	Glu	Asn	690	695	700
Gly	Ser	Leu	Asp	Ala	Phe	Leu	Arg	Lys	Asn	Asp	Gly	Arg	Phe	Thr	Val	705	710	715
Ile	Gln	Leu	Val	Gly	Met	Leu	Arg	Gly	Ile	Gly	Ser	Gly	Met	Lys	Tyr	725	730	735
Leu	Ser	Asp	Met	Ser	Tyr	Val	His	Arg	Asp	Leu	Ala	Ala	Arg	Asn	Ile	740	745	750
Leu	Val	Asn	Ser	Asn	Leu	Val	Cys	Lys	Val	Ser	Asp	Phe	Gly	Met	Ser	755	760	765
Arg	Val	Leu	Glu	Asp	Asp	Pro	Glu	Ala	Ala	Tyr	Thr	Thr	Arg	Gly	Gly	770	775	780
Lys	Ile	Pro	Ile	Arg	Trp	Thr	Ala	Pro	Glu	Ala	Ile	Ala	Tyr	Arg	Lys	785	790	795
Phe	Thr	Ser	Ala	Ser	Asp	Val	Trp	Ser	Tyr	Gly	Ile	Val	Met	Trp	Glu	805	810	815
Val	Met	Ser	Tyr	Gly	Glu	Arg	Pro	Tyr	Trp	Asp	Met	Ser	Asn	Gln	Asp	820	825	830
Val	Ile	Lys	Ala	Ile	Glu	Glu	Gly	Tyr	Arg	Leu	Pro	Pro	Pro	Met	Asp	835	840	845
Cys	Pro	Ile	Ala	Leu	His	Gln	Leu	Met	Leu	Asp	Cys	Trp	Gln	Lys	Glu	850	855	860

ES 2 846 175 T3

Arg Ser Asp Arg Pro Lys Phe Gly Gln Ile Val Asn Met Leu Asp Lys
865 870 875 880

Leu Ile Arg Asn Pro Asn Ser Leu Lys Arg Thr Gly Thr Glu Ser Ser
885 890 895

Arg Pro Asn Thr Ala Leu Leu Asp Pro Ser Ser Pro Glu Phe Ser Ala
900 905 910

Val Val Ser Val Gly Asp Trp Leu Gln Ala Ile Lys Met Asp Arg Tyr
915 920 925

Lys Asp Asn Phe Thr Ala Ala Gly Tyr Thr Thr Leu Glu Ala Val Val
930 935 940

His Val Asn Gln Glu Asp Leu Ala Arg Ile Gly Ile Thr Ala Ile Thr
945 950 955 960

His Gln Asn Lys Ile Leu Ser Ser Val Gln Ala Met Arg Thr Gln Met
965 970 975

Gln Gln Met His Gly Arg Met Val Pro Val
980 985

<210> 4

<211> 528

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Val Thr Gly Ser Arg Val Tyr Pro Ala Asn Glu Val Thr Leu Leu Asp
1 5 10 15

Ser Arg Ser Val Gln Gly Glu Leu Gly Trp Ile Ala Ser Pro Leu Glu
20 25 30

Gly Gly Trp Glu Glu Val Ser Ile Met Asp Glu Lys Asn Thr Pro Ile
35 40 45

Arg Thr Tyr Gln Val Cys Asn Val Met Glu Pro Ser Gln Asn Asn Trp
50 55 60

Leu Arg Thr Asp Trp Ile Thr Arg Glu Gly Ala Gln Arg Val Tyr Ile
65 70 75 80

Glu Ile Lys Phe Thr Leu Arg Asp Cys Asn Ser Leu Pro Gly Val Met
85 90 95

10

ES 2 846 175 T3

Gly Thr Cys Lys Glu Thr Phe Asn Leu Tyr Tyr Tyr Glu Ser Asp Asn
 100 105 110
 Asp Lys Glu Arg Phe Ile Arg Glu Asn Gln Phe Val Lys Ile Asp Thr
 115 120 125
 Ile Ala Ala Asp Glu Ser Phe Thr Gln Val Asp Ile Gly Asp Arg Ile
 130 135 140
 Met Lys Leu Asn Thr Glu Ile Arg Asp Val Gly Pro Leu Ser Lys Lys
 145 150 155 160
 Gly Phe Tyr Leu Ala Phe Gln Asp Val Gly Ala Cys Ile Ala Leu Val
 165 170 175
 Ser Val Arg Val Phe Tyr Lys Lys Cys Pro Leu Thr Val Arg Asn Leu
 180 185 190
 Ala Gln Phe Pro Asp Thr Ile Thr Gly Ala Asp Thr Ser Ser Leu Val
 195 200 205
 Glu Val Arg Gly Ser Cys Val Asn Asn Ser Glu Glu Lys Asp Val Pro
 210 215 220
 Lys Met Tyr Cys Gly Ala Asp Gly Glu Trp Leu Val Pro Ile Gly Asn
 225 230 235 240
 Cys Leu Cys Asn Ala Gly His Glu Glu Arg Ser Gly Glu Cys Gln Ala
 245 250 255
 Cys Lys Ile Gly Tyr Tyr Lys Ala Leu Ser Thr Asp Ala Thr Cys Ala
 260 265 270
 Lys Cys Pro Pro His Ser Tyr Ser Val Trp Glu Gly Ala Thr Ser Cys
 275 280 285
 Thr Cys Asp Arg Gly Phe Phe Arg Ala Asp Asn Asp Ala Ala Ser Met
 290 295 300
 Pro Cys Thr Arg Pro Pro Ser Ala Pro Leu Asn Leu Ile Ser Asn Val
 305 310 315 320
 Asn Glu Thr Ser Val Asn Leu Glu Trp Ser Ser Pro Gln Asn Thr Gly
 325 330 335
 Gly Arg Gln Asp Ile Ser Tyr Asn Val Val Cys Lys Lys Cys Gly Ala

ES 2 846 175 T3

340	345	350
Gly Asp Pro Ser Lys Cys Arg Pro Cys Gly Ser Gly Val His Tyr Thr		
355	360	365
Pro Gln Gln Asn Gly Leu Lys Thr Thr Lys Val Ser Ile Thr Asp Leu		
370	375	380
Leu Ala His Thr Asn Tyr Thr Phe Glu Ile Trp Ala Val Asn Gly Val		
385	390	400
Ser Lys Tyr Asn Pro Asn Pro Asp Gln Ser Val Ser Val Thr Val Thr		
405	410	415
Thr Asn Gln Ala Ala Pro Ser Ser Ile Ala Leu Val Gln Ala Lys Glu		
420	425	430
Val Thr Arg Tyr Ser Val Ala Leu Ala Trp Leu Glu Pro Asp Arg Pro		
435	440	445
Asn Gly Val Ile Leu Glu Tyr Glu Val Lys Tyr Tyr Glu Lys Asp Gln		
450	455	460
Asn Glu Arg Ser Tyr Arg Ile Val Arg Thr Ala Ala Arg Asn Thr Asp		
465	470	480
Ile Lys Gly Leu Asn Pro Leu Thr Ser Tyr Val Phe His Val Arg Ala		
485	490	495
Arg Thr Ala Ala Gly Tyr Gly Asp Phe Ser Glu Pro Leu Glu Val Thr		
500	505	510
Thr Asn Thr Val Pro Ser Arg Ile Ile Gly Asp Gly Ala Asn Ser Thr		
515	520	525

<210> 5

<211> 12

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintético

10

<400> 5

acatcactcc gt 12

<210> 6

<211> 50

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Cebador sintético

<400> 6

acggagtgat gtccgtcgac gtatctctgc gttgatactt cagcgtagct 50

10

<210> 7

<211> 26

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Cebador sintético

<400> 7

20 agctacgctg aagtatcaac gcagag 26

<210> 8

<211> 20

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintético

30 <400> 8

gccagtggat agactgatgg 20

<210> 9

<211> 21

35 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintético

<400> 9

5 gatggataca gttggtgcag c 21

<210> 10

<211> 19

<212> PRT

10 <213> Mus musculus

<400> 10

Met	Ala	Trp	Val	Trp	Thr	Leu	Leu	Phe	Leu	Met	Ala	Ala	Ala	Gln	Ser
1				5					10					15	

Ile Gln Ala

15 <210> 11

<211> 124

<212> PRT

<213> Mus musculus

20 <400> 11

ES 2 846 175 T3

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

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Ser Met His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Ile Pro Leu Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Tyr Trp Tyr Phe Asp
100 105 110

Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 12

<211> 20

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 12

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

Asp Ala Arg Cys
20

10

<210> 13

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

15

<400> 13

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

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

ES 2 846 175 T3

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
35 40 45

Tyr Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Trp
85 90 95

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

<210> 14

5 <211> 57

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 14

10 atggcttggg tgggacctt gctattcctg atggcagctg cccaaagtat ccaagca 57

<210> 15

<211> 372

<212> ADN

15 <213> Mus musculus

<400> 15

cagatccagt tgggtgcagtc tggacctgag ctgaagaagc ctggagagac agtcaagatc	60
tcctgcaagg cttctgggta taccttcaca gactattcaa tgcactgggt gaagcaggct	120
ccaggaaagg gtttaaagtg gatgggctgg ataaacactg agactgggtga gccaacatat	180
gcagatgact tcaagggacg gtttgccttc tctttggaaa cctctgccag cactgcctat	240
ttgcagatca acaacctcaa aaatgaggac acggctacat atttctgtgc tagaattccc	300
ctctattact acggtagtag gtactggtac ttcgatgtct ggggcgcagg gaccacggtc	360
accgtctcct ca	372

20 <210> 16

<211> 60

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 16

atgagtgtgc ccactcaggt cctgggggtg ctgctgctgt ggcttacaga tgccagatgt 60

5

<210> 17

<211> 321

<212> ADN

<213> Mus musculus

10

<400> 17

gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgtat ctgtgggaga aactgtcacc	60
atcacatgtc gagcaagtga gaatatttac agaaatttag catggatatca gcagaaacag	120
ggaaaatctc ctcagctcct ggtctatgct gcaacaaact tagcagatgg tgtgccatca	180
aggttcagtg gcagtggatc aggcacacag tattccctca agatcaacag cctgcagtct	240
gaagattttg ggagttatta ctgtcaacat ttttggggta ctccgtggac gttcggtgga	300
ggcaccaagc tggaaatcaa a	321

<210> 18

15

<211> 40

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20

<223> Cebador sintético

<400> 18

gcgaagcttg ccgccacat ggctgggtg tggaccttgc 40

25

<210> 19

<211> 40

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Cebador sintético

<400> 19

gcgaagcttg ccgccacat gagtggtccc actcaggtcc 40

5 <210> 20

<211> 36

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Cebador sintético

<400> 20

gcggaattca tcattacca ggagagtggg agaggc 36

15

<210> 21

<211> 40

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Cebador sintético

<400> 21

25 cgcaattca ctaacactca ttctgttga agctcttgac 40

<210> 22

<211> 324

<212> PRT

30 <213> Mus musculus

<400> 22

ES 2 846 175 T3

Ala	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Ser	Val	Tyr	Pro	Leu	Ala	Pro	Gly	Ser	Ala	1	5	10	15
Ala	Gln	Thr	Asn	Ser	Met	Val	Thr	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Tyr	20	25	30	
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Thr	Trp	Asn	Ser	Gly	Ser	Leu	Ser	Ser	35	40	45	
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Asp	Leu	Tyr	Thr	Leu	50	55	60	
Ser	Ser	Ser	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Thr	Trp	Pro	Ser	Glu	Thr	Val	65	70	75	80
Thr	Cys	Asn	Val	Ala	His	Pro	Ala	Ser	Ser	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	85	90	95	
Ile	Val	Pro	Arg	Asp	Cys	Gly	Cys	Lys	Pro	Cys	Ile	Cys	Thr	Val	Pro	100	105	110	
Glu	Val	Ser	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Val	Leu	115	120	125	
Thr	Ile	Thr	Leu	Thr	Pro	Lys	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Ile	Ser	130	135	140	
Lys	Asp	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Ser	Trp	Phe	Val	Asp	Asp	Val	Glu	145	150	155	160
Val	His	Thr	Ala	Gln	Thr	Gln	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	165	170	175	
Phe	Arg	Ser	Val	Ser	Glu	Leu	Pro	Ile	Met	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	180	185	190	
Gly	Lys	Glu	Phe	Lys	Cys	Arg	Val	Asn	Ser	Ala	Ala	Phe	Pro	Ala	Pro	195	200	205	
Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Arg	Pro	Lys	Ala	Pro	Gln	210	215	220	

ES 2 846 175 T3

Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val
225 230 235 240

Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val
245 250 255

Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln
260 265 270

Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn
275 280 285

Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val
290 295 300

Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His
305 310 315 320

Ser Pro Gly Lys

<210> 23

<211> 107

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 23

Arg Ala Asp Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu
1 5 10 15

Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg
35 40 45

Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu
65 70 75 80

Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser
85 90 95

Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
100 105

10

<210> 24

<211> 975

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 24

gccccaaacga cccccccatc tgtctatcca ctggccccctg gatctgctgc ccaaactaac	60
tccatggtga ccctgggatg cctgggtcaag ggctatttcc ctgagccagt gacagtgacc	120
tggaactctg gatccctgtc cagcgggtgtg cacaccttcc cagctgtcct gcagtctgac	180
ctctacactc tgagcagctc agtgactgtc ccctccagca cctggcccag cgagaccgtc	240
acctgcaacg ttgccacccc ggccagcagc accaagggtgg acaagaaaat tgtgcccagg	300
gatttgtggtt gtaagccttg catatgtaca gtcccagaag tatcatctgt cttcatcttc	360
cccccaaagc ccaaggatgt gctcaccatt actctgactc ctaaggtcac gtgtgttgtg	420
gtagacatca gcaaggatga tcccagagtc cagttcagct ggttttaga tgatgtggag	480
gtgcacacag ctgagacgca accccgggag gagcagttca acagcacttt ccgctcagtc	540
agtgaacttc ccatcatgca ccaggactgg ctcaatggca aggagttcaa atgcagggtc	600
aacagtgcag ctttccctgc ccccatcgag aaaaccatct ccaaaaccaa aggcagaccg	660
aaggctccac aggtgtacac cattccacct cccaaggagc agatggccaa ggataaagtc	720
agtctgacct gcatgataac agacttcttc cctgaagaca ttactgtgga gtggcagtgg	780
aatgggcagc cagcggagaa ctacaagaac actcagccca tcatggacac agatggctct	840
tacttcgtct acagcaagct caatgtgcag aagagcaact gggaggcagg aaatactttc	900
acctgctctg tgttacatga gggcctgcac aaccaccata ctgagaagag cctctccac	960
5 tctcctggta aatga	975

<210> 25

<211> 324

<212> ADN

10 <213> Mus musculus

<400> 25

cgggctgatg ctgcaccaac tgtatccatc ttcccacat ccagtgagca gttaacatct	60
ggaggtgcct cagtctgtgtg cttcttgaac aacttctacc ccaaagacat caatgtcaag	120
tggaagattg atggcagtga acgacaaaat ggcgtcctga acagttggac tgatcaggac	180
agcaaagaca gcacctacag catgagcagc accctcacgt tgaccaagga cgagtatgaa	240
cgacataaca gctatacctg tgaggccact cacaagacat caacttcacc cattgtcaag	300
agcttcaaca ggaatgagtg ttag	324

15 <210> 26

ES 2 846 175 T3

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

5 <400> 26

Asp Tyr Ser Met His
1 5

<210> 27

<211> 10

10 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 27

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ser Met His
1 5 10

15

<210> 28

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

20

<400> 28

Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 29

25 <211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 29

30 Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr
1 5 10

<210> 30

<211> 15

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 30

	Ile	Pro	Leu	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Arg	Tyr	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val
5	1				5					10					15

<210> 31

$\langle 211 \rangle$ 11

<212> PRT

10 <213> Mus musculus

<400> 31

Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Arg Asn Leu Ala
1 5 10

15 <210> 32

 $\langle 211 \rangle 7$

<212> PRT

<213> Mus musculus

20 <400> 32

Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp
1 5

<210> 33

$\langle 211 \rangle$ 9

25 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 33

Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Trp Thr
1 5

30

<210> 34

<211> 15

<212> ADN

<213> Mus musculus

35

<400> 34

gactattcaa tgcac 15

<210> 35

5 <211> 30

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 35

10 ggttatacct tcacagacta ttcaatgcac 30

<210> 36

<211> 51

<212> ADN

15 <213> Mus musculus

<400> 36

tgataaaca ctgagactgg tgagccaaca tatgcagatg acttcaaggg a 51

20 <210> 37

<211> 30

<212> ADN

<213> Mus musculus

25 <400> 37

tgataaaca ctgagactgg tgagccaaca 30

<210> 38

<211> 45

30 <212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 38

attccccctct attactacgg tagtaggtac tggacttcg atgtc 45

35

<210> 39

<211> 33

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 39

5 cgagcaagtg agaataattta cagaaattta gca 33

<210> 40

<211> 21

<212> ADN

10 <213> Mus musculus

<400> 40

gctgcaacaa acttagcaga t 21

15 <210> 41

<211> 27

<212> ADN

<213> Mus musculus

20 <400> 41

caacattttt ggggtactcc gtggacg 27

<210> 42

<211> 19

25 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 42

Met Ala Gly Ile Phe Tyr Phe Ile Leu Phe Ser Phe Leu Phe Gly Ile
1 5 10 15

Cys Asp Ala

30

<210> 43

<211> 1030

<212> PRT

<213> Mus musculus

ES 2 846 175 T3

<400> 43

Val Thr Gly Ser Arg Val Tyr Pro Ala Asn Glu Val Thr Leu Leu Asp
1 5 10 15

Ser Arg Ser Val Gln Gly Glu Leu Gly Trp Ile Ala Ser Pro Leu Glu
20 25 30

Gly Gly Trp Glu Glu Val Ser Ile Met Asp Glu Lys Asn Thr Pro Ile
35 40 45

Arg Thr Tyr Gln Val Cys Asn Val Met Glu Ala Ser Gln Asn Asn Trp
50 55 60

Leu Arg Thr Asp Trp Ile Thr Arg Glu Gly Ala Gln Arg Val Tyr Ile
65 70 75 80

Glu Ile Lys Phe Thr Leu Arg Asp Cys Asn Ser Leu Pro Gly Val Met
85 90 95

Gly Thr Cys Lys Glu Thr Phe Asn Leu Tyr Tyr Tyr Glu Ser Asp Asn
100 105 110

Asp Lys Glu Arg Phe Ile Arg Glu Ser Gln Phe Gly Lys Ile Asp Thr
115 120 125

Ile Ala Ala Asp Glu Ser Phe Thr Gln Val Asp Ile Gly Asp Arg Ile
130 135 140

Met Lys Leu Asn Thr Glu Ile Arg Asp Val Gly Pro Leu Ser Lys Lys
145 150 155 160

Gly Phe Tyr Leu Ala Phe Gln Asp Val Gly Ala Cys Ile Ala Leu Val
165 170 175

Ser Val Arg Val Phe Tyr Lys Lys Cys Pro Leu Thr Val Arg Asn Leu
180 185 190

Ala Gln Phe Pro Asp Thr Ile Thr Gly Ala Asp Thr Ser Ser Leu Val
195 200 205

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

Lys Met Tyr Cys Gly Ala Asp Gly Glu Trp Leu Val Pro Ile Gly Asn
225 230 235 240

Cys Leu Cys Asn Ala Gly His Glu Glu Gln Asn Gly Glu Cys Gln Ala
245 250 255

Cys Lys Ile Gly Tyr Tyr Lys Ala Leu Ser Thr Asp Ala Ser Cys Ala
260 265 270

5

ES 2 846 175 T3

Lys Cys Pro Pro His Ser Tyr Ser Val Trp Glu Gly Ala Thr Ser Cys
 275 280 285
 Thr Cys Asp Arg Gly Phe Phe Arg Ala Asp Asn Asp Ala Ala Ser Met
 290 295 300
 Pro Cys Thr Arg Pro Pro Ser Ala Pro Leu Asn Leu Ile Ser Asn Val
 305 310 315 320
 Asn Glu Thr Ser Val Asn Leu Glu Trp Ser Ser Pro Gln Asn Thr Gly
 325 330 335
 Gly Arg Gln Asp Ile Ser Tyr Asn Val Val Cys Lys Lys Cys Gly Ala
 340 345 350
 Gly Asp Pro Ser Lys Cys Arg Pro Cys Gly Ser Gly Val His Tyr Thr
 355 360 365
 Pro Gln Gln Asn Gly Leu Lys Thr Thr Arg Val Ser Ile Thr Asp Leu
 370 375 380
 Leu Ala His Thr Asn Tyr Thr Phe Glu Ile Trp Ala Val Asn Gly Val
 385 390 395 400
 Ser Lys Tyr Asn Pro Ser Pro Asp Gln Ser Val Ser Val Thr Val Thr
 405 410 415
 Thr Asn Gln Ala Ala Pro Ser Ser Ile Ala Leu Val Gln Ala Lys Glu
 420 425 430
 Val Thr Arg Tyr Ser Val Ala Leu Ala Trp Leu Glu Pro Asp Arg Pro
 435 440 445
 Asn Gly Val Ile Leu Glu Tyr Glu Val Lys Tyr Tyr Glu Lys Asp Gln
 450 455 460
 Asn Glu Arg Ser Tyr Arg Ile Val Arg Thr Ala Ala Arg Asn Thr Asp
 465 470 475 480
 Ile Lys Gly Leu Asn Pro Leu Thr Ser Tyr Val Phe His Val Arg Ala
 485 490 495
 Arg Thr Ala Ala Gly Tyr Gly Asp Phe Ser Glu Pro Leu Glu Val Thr
 500 505 510
 Thr Asn Thr Val Pro Ser Arg Ile Ile Gly Asp Gly Ala Asn Ser Thr
 515 520 525

ES 2 846 175 T3

Ala Ala Ala Ile Ile Pro Val Glu Glu Glu Asn Pro Asp Phe Trp Asn
 530 535 540
 Arg Glu Ala Ala Glu Ala Leu Gly Ala Ala Lys Lys Leu Gln Pro Ala
 545 550 555 560
 Gln Thr Ala Ala Lys Asn Leu Ile Ile Phe Leu Gly Asp Gly Met Gly
 565 570 575
 Val Ser Thr Val Thr Ala Ala Arg Ile Leu Lys Gly Gln Lys Lys Asp
 580 585 590
 Lys Leu Gly Pro Glu Ile Pro Leu Ala Met Asp Arg Phe Pro Tyr Val
 595 600 605
 Ala Leu Ser Lys Thr Tyr Asn Val Asp Lys His Val Pro Asp Ser Gly
 610 615 620
 Ala Thr Ala Thr Ala Tyr Leu Cys Gly Val Lys Gly Asn Phe Gln Thr
 625 630 635 640
 Ile Gly Leu Ser Ala Ala Ala Arg Phe Asn Gln Cys Asn Thr Thr Arg
 645 650 655
 Gly Asn Glu Val Ile Ser Val Met Asn Arg Ala Lys Lys Ala Gly Lys
 660 665 670
 Ser Val Gly Val Val Thr Thr Thr Arg Val Gln His Ala Ser Pro Ala
 675 680 685
 Gly Thr Tyr Ala His Thr Val Asn Arg Asn Trp Tyr Ser Asp Ala Asp
 690 695 700
 Val Pro Ala Ser Ala Arg Gln Glu Gly Cys Gln Asp Ile Ala Thr Gln
 705 710 715 720
 Leu Ile Ser Asn Met Asp Ile Asp Val Ile Leu Gly Gly Gly Arg Lys
 725 730 735
 Tyr Met Phe Arg Met Gly Thr Pro Asp Pro Glu Tyr Pro Asp Asp Tyr
 740 745 750
 Ser Gln Gly Gly Thr Arg Leu Asp Gly Lys Asn Leu Val Gln Glu Trp
 755 760 765
 Leu Ala Lys Arg Gln Gly Ala Arg Tyr Val Trp Asn Arg Thr Glu Leu

ES 2 846 175 T3

770		775		780
Met Gln Ala Ser Leu Asp Pro Ser Val Thr His Leu Met Gly Leu Phe				
785		790		795
				800
Glu Pro Gly Asp Met Lys Tyr Glu Ile His Arg Asp Ser Thr Leu Asp				
	805		810	815
Pro Ser Leu Met Glu Met Thr Glu Ala Ala Leu Arg Leu Leu Ser Arg				
	820		825	830
Asn Pro Arg Gly Phe Phe Leu Phe Val Glu Gly Gly Arg Ile Asp His				
	835		840	845
Gly His His Glu Ser Arg Ala Tyr Arg Ala Leu Thr Glu Thr Ile Met				
	850		855	860
Phe Asp Asp Ala Ile Glu Arg Ala Gly Gln Leu Thr Ser Glu Glu Asp				
865		870	875	880
Thr Leu Ser Leu Val Thr Ala Asp His Ser His Val Phe Ser Phe Gly				
	885		890	895
Gly Tyr Pro Leu Arg Gly Ser Ser Ile Phe Gly Leu Ala Pro Gly Lys				
	900		905	910
Ala Arg Asp Arg Lys Ala Tyr Thr Val Leu Leu Tyr Gly Asn Gly Pro				
	915		920	925
Gly Tyr Val Leu Lys Asp Gly Ala Arg Pro Asp Val Thr Glu Ser Glu				
	930		935	940
Ser Gly Ser Pro Glu Tyr Arg Gln Gln Ser Ala Val Pro Leu Asp Glu				
945		950	955	960
Glu Thr His Ala Gly Glu Asp Val Ala Val Phe Ala Arg Gly Pro Gln				
	965		970	975
Ala His Leu Val His Gly Val Gln Glu Gln Thr Phe Ile Ala His Val				
	980		985	990
Met Ala Phe Ala Ala Cys Leu Glu Pro Tyr Thr Ala Cys Asp Leu Ala				
	995		1000	1005
Pro Pro Ala Gly Thr Thr Asp Ala Ala His Pro Gly His His His				
	1010		1015	1020
His His His His His His His				
	1025		1030	

5 <210> 44
<211> 986

ES 2 846 175 T3

<212> PRT

<213> Macaca mulatta

<400> 44

Met Ala Gly Ile Phe Tyr Phe Ala Leu Phe Ser Cys Leu Phe Gly Ile
1 5 10 15

Cys Asp Ala Val Thr Gly Ser Arg Val Tyr Pro Ala Asn Glu Val Thr
20 25 30

Leu Leu Asp Ser Arg Ser Val Gln Gly Glu Leu Gly Trp Ile Ala Ser
35 40 45

Pro Leu Glu Gly Gly Trp Glu Glu Val Ser Ile Met Asp Glu Lys Asn
50 55 60

Thr Pro Ile Arg Thr Tyr Gln Val Cys Asn Val Met Glu Pro Ser Gln
65 70 75 80

Asn Asn Trp Leu Arg Thr Asp Trp Ile Thr Arg Glu Gly Ala Gln Arg
85 90 95

Val Tyr Ile Glu Ile Lys Phe Thr Leu Arg Asp Cys Asn Ser Leu Pro
100 105 110

Gly Val Met Gly Thr Cys Lys Glu Thr Phe Asn Leu Tyr Tyr Tyr Glu
115 120 125

Ser Asp Asn Asp Lys Glu Arg Phe Ile Arg Glu Asn Gln Phe Val Lys
130 135 140

Ile Asp Thr Ile Ala Ala Asp Glu Ser Phe Thr Gln Val Asp Ile Gly
145 150 155 160

Asp Arg Ile Met Lys Leu Asn Thr Glu Ile Arg Asp Val Gly Pro Leu
165 170 175

Ser Lys Lys Gly Phe Tyr Leu Ala Phe Gln Asp Val Gly Ala Cys Ile
180 185 190

Ala Leu Val Ser Val Arg Val Phe Tyr Lys Lys Cys Pro Leu Thr Val
195 200 205

5

ES 2 846 175 T3

Arg Asn Leu Ala Gln Phe Pro Asp Thr Ile Thr Gly Ala Asp Thr Ser
 210 215 220
 Ser Leu Val Glu Val Arg Gly Ser Cys Val Asn Asn Ser Glu Glu Lys
 225 230 235 240
 Asp Val Pro Lys Met Tyr Cys Gly Ala Asp Gly Glu Trp Leu Val Pro
 245 250 255
 Ile Gly Asn Cys Leu Cys Asn Ala Gly His Glu Glu Arg Ser Gly Glu
 260 265 270
 Cys Gln Ala Cys Lys Ile Gly Tyr Tyr Lys Ala Leu Ser Thr Asp Ala
 275 280 285
 Thr Cys Ala Lys Cys Pro Pro His Ser Tyr Ser Val Trp Glu Gly Ala
 290 295 300
 Thr Ser Cys Thr Cys Asp Arg Gly Phe Phe Arg Ala Asp Asn Asp Ala
 305 310 315 320
 Ala Ser Met Pro Cys Thr Arg Pro Pro Ser Ala Pro Leu Asn Leu Ile
 325 330 335
 Ser Asn Val Asn Glu Thr Ser Val Asn Leu Glu Trp Ser Ser Pro Gln
 340 345 350
 Asn Thr Gly Gly Arg Gln Asp Ile Ser Tyr Asn Val Val Cys Lys Lys
 355 360 365
 Cys Gly Ala Gly Asp Pro Ser Lys Cys Arg Pro Cys Gly Ser Gly Val
 370 375 380
 His Tyr Thr Pro Gln Gln Asn Gly Leu Lys Thr Thr Lys Val Ser Ile
 385 390 395 400
 Thr Asp Leu Leu Ala His Thr Asn Tyr Thr Phe Glu Ile Trp Ala Val
 405 410 415
 Asn Gly Val Ser Lys Tyr Asn Pro Ser Pro Asp Gln Ser Val Ser Val
 420 425 430
 Thr Val Thr Thr Asn Gln Ala Ala Pro Ser Ser Ile Ala Leu Val Gln
 435 440 445
 Ala Lys Glu Val Thr Arg Tyr Ser Val Ala Leu Ala Trp Leu Glu Pro
 450 455 460

ES 2 846 175 T3

Asp Arg Pro Asn Gly Val Ile Leu Glu Tyr Glu Val Lys Tyr Tyr Glu
 465 470 475 480
 Lys Asp Gln Asn Glu Arg Ser Tyr Arg Ile Val Arg Thr Ala Ala Arg
 485 490 495
 Asn Thr Asp Ile Lys Gly Leu Asn Pro Leu Thr Ser Tyr Val Phe His
 500 505 510
 Val Arg Ala Arg Thr Ala Ala Gly Tyr Gly Asp Phe Ser Glu Pro Leu
 515 520 525
 Glu Val Thr Thr Asn Thr Val Pro Ser Arg Ile Ile Gly Asp Gly Ala
 530 535 540
 Asn Ser Thr Val Leu Leu Val Ser Val Ser Gly Ser Val Val Leu Val
 545 550 555 560
 Val Ile Leu Ile Ala Ala Phe Val Ile Ser Arg Arg Arg Ser Lys Tyr
 565 570 575
 Ser Lys Ala Lys Gln Glu Ala Asp Glu Glu Lys His Leu Asn Gln Gly
 580 585 590
 Val Arg Thr Tyr Val Asp Pro Phe Thr Tyr Glu Asp Pro Asn Gln Ala
 595 600 605
 Val Arg Glu Phe Ala Lys Glu Ile Asp Ala Ser Cys Ile Lys Ile Glu
 610 615 620
 Lys Val Ile Gly Val Gly Glu Phe Gly Glu Val Cys Ser Gly Arg Leu
 625 630 635 640
 Lys Val Pro Gly Lys Arg Glu Ile Cys Val Ala Ile Lys Thr Leu Lys
 645 650 655
 Ala Gly Tyr Thr Asp Lys Gln Arg Arg Asp Phe Leu Ser Glu Ala Ser
 660 665 670
 Ile Met Gly Gln Phe Asp His Pro Asn Ile Ile His Leu Glu Gly Val
 675 680 685
 Val Thr Lys Cys Lys Pro Val Met Ile Ile Thr Glu Tyr Met Glu Asn
 690 695 700
 Gly Ser Leu Asp Ala Phe Leu Arg Lys Asn Asp Gly Arg Phe Thr Val
 705 710 715 720

ES 2 846 175 T3

Ile Gln Leu Val Gly Met Leu Arg Gly Ile Gly Ser Gly Met Lys Tyr
725 730 735

Leu Ser Asp Met Ser Tyr Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Ile
740 745 750

Leu Val Asn Ser Asn Leu Val Cys Lys Val Ser Asp Phe Gly Met Ser
755 760 765

Arg Val Leu Glu Asp Asp Pro Glu Ala Ala Tyr Thr Thr Arg Gly Gly
770 775 780

Lys Ile Pro Ile Arg Trp Thr Ala Pro Glu Ala Ile Ala Tyr Arg Lys
785 790 795 800

Phe Thr Ser Ala Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Ile Val Met Trp Glu
805 810 815

Val Met Ser Tyr Gly Glu Arg Pro Tyr Trp Asp Met Ser Asn Gln Asp
820 825 830

Val Ile Lys Ala Ile Glu Glu Gly Tyr Arg Leu Pro Pro Pro Met Asp
835 840 845

Cys Pro Ile Ala Leu His Gln Leu Met Leu Asp Cys Trp Gln Lys Glu
850 855 860

Arg Ser Asp Arg Pro Lys Phe Gly Gln Ile Val Asn Met Leu Asp Lys
865 870 875 880

Leu Ile Arg Asn Pro Asn Ser Leu Lys Arg Thr Gly Thr Glu Ser Ser
885 890 895

Arg Pro Asn Thr Ala Leu Leu Asp Pro Ser Ser Pro Glu Phe Ser Ala
900 905 910

Val Val Ser Val Gly Asp Trp Leu Gln Ala Ile Lys Met Asp Arg Tyr
915 920 925

Lys Asp Asn Phe Thr Ala Ala Gly Tyr Thr Thr Leu Glu Ala Val Val
930 935 940

His Val Asn Gln Glu Asp Leu Ala Arg Ile Gly Ile Thr Ala Ile Thr
945 950 955 960

His Gln Asn Lys Ile Leu Ser Ser Val Gln Ala Met Arg Thr Gln Met

965

970

975

Gln Gln Met His Gly Arg Met Val Pro Val
980 985

ES 2 846 175 T3

<211> 528

<212> PRT

<213> Macaca mulatta

5 <400> 45

Val Thr Gly Ser Arg Val Tyr Pro Ala Asn Glu Val Thr Leu Leu Asp
1 5 10 15

Ser Arg Ser Val Gln Gly Glu Leu Gly Trp Ile Ala Ser Pro Leu Glu
20 25 30

Gly Gly Trp Glu Glu Val Ser Ile Met Asp Glu Lys Asn Thr Pro Ile
35 40 45

Arg Thr Tyr Gln Val Cys Asn Val Met Glu Pro Ser Gln Asn Asn Trp
50 55 60

Leu Arg Thr Asp Trp Ile Thr Arg Glu Gly Ala Gln Arg Val Tyr Ile
65 70 75 80

Glu Ile Lys Phe Thr Leu Arg Asp Cys Asn Ser Leu Pro Gly Val Met
85 90 95

Gly Thr Cys Lys Glu Thr Phe Asn Leu Tyr Tyr Tyr Glu Ser Asp Asn
100 105 110

Asp Lys Glu Arg Phe Ile Arg Glu Asn Gln Phe Val Lys Ile Asp Thr
115 120 125

Ile Ala Ala Asp Glu Ser Phe Thr Gln Val Asp Ile Gly Asp Arg Ile
130 135 140

Met Lys Leu Asn Thr Glu Ile Arg Asp Val Gly Pro Leu Ser Lys Lys
145 150 155 160

Gly Phe Tyr Leu Ala Phe Gln Asp Val Gly Ala Cys Ile Ala Leu Val
165 170 175

Ser Val Arg Val Phe Tyr Lys Lys Cys Pro Leu Thr Val Arg Asn Leu
180 185 190

Ala Gln Phe Pro Asp Thr Ile Thr Gly Ala Asp Thr Ser Ser Leu Val

ES 2 846 175 T3

195					200					205					
Glu	Val	Arg	Gly	Ser	Cys	Val	Asn	Asn	Ser	Glu	Glu	Lys	Asp	Val	Pro
210					215					220					
Lys	Met	Tyr	Cys	Gly	Ala	Asp	Gly	Glu	Trp	Leu	Val	Pro	Ile	Gly	Asn
225					230					235					240
Cys	Leu	Cys	Asn	Ala	Gly	His	Glu	Glu	Arg	Ser	Gly	Glu	Cys	Gln	Ala
				245					250					255	
Cys	Lys	Ile	Gly	Tyr	Tyr	Lys	Ala	Leu	Ser	Thr	Asp	Ala	Thr	Cys	Ala
			260					265					270		
Lys	Cys	Pro	Pro	His	Ser	Tyr	Ser	Val	Trp	Glu	Gly	Ala	Thr	Ser	Cys
		275					280					285			
Thr	Cys	Asp	Arg	Gly	Phe	Phe	Arg	Ala	Asp	Asn	Asp	Ala	Ala	Ser	Met
	290						295					300			
Pro	Cys	Thr	Arg	Pro	Pro	Ser	Ala	Pro	Leu	Asn	Leu	Ile	Ser	Asn	Val
305					310					315					320
Asn	Glu	Thr	Ser	Val	Asn	Leu	Glu	Trp	Ser	Ser	Pro	Gln	Asn	Thr	Gly
				325					330					335	
Gly	Arg	Gln	Asp	Ile	Ser	Tyr	Asn	Val	Val	Cys	Lys	Lys	Cys	Gly	Ala
			340					345					350		
Gly	Asp	Pro	Ser	Lys	Cys	Arg	Pro	Cys	Gly	Ser	Gly	Val	His	Tyr	Thr
		355					360					365			
Pro	Gln	Gln	Asn	Gly	Leu	Lys	Thr	Thr	Lys	Val	Ser	Ile	Thr	Asp	Leu
					375						380				
Leu	Ala	His	Thr	Asn	Tyr	Thr	Phe	Glu	Ile	Trp	Ala	Val	Asn	Gly	Val
385					390					395					400
Ser	Lys	Tyr	Asn	Pro	Ser	Pro	Asp	Gln	Ser	Val	Ser	Val	Thr	Val	Thr
				405					410					415	
Thr	Asn	Gln	Ala	Ala	Pro	Ser	Ser	Ile	Ala	Leu	Val	Gln	Ala	Lys	Glu
			420					425					430		
Val	Thr	Arg	Tyr	Ser	Val	Ala	Leu	Ala	Trp	Leu	Glu	Pro	Asp	Arg	Pro
		435					440					445			

ES 2 846 175 T3

Asn Gly Val Ile Leu Glu Tyr Glu Val Lys Tyr Tyr Glu Lys Asp Gln
450 455 460

Asn Glu Arg Ser Tyr Arg Ile Val Arg Thr Ala Ala Arg Asn Thr Asp
465 470 475 480

Ile Lys Gly Leu Asn Pro Leu Thr Ser Tyr Val Phe His Val Arg Ala
485 490 495

Arg Thr Ala Ala Gly Tyr Gly Asp Phe Ser Glu Pro Leu Glu Val Thr
500 505 510

Thr Asn Thr Val Pro Ser Arg Ile Ile Gly Asp Gly Ala Asn Ser Thr
515 520 525

<210> 46

<211> 21

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintético

10

<400> 46

catcagccct aatccatctg a 21

<210> 47

15 <211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Cebador sintético

<400> 47

cgcgactaac aatcaaagtg a 21

25 <210> 48

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintético

5 <400> 48

ctaggccaca gaattgaaag atct 24

<210> 49

<211> 25

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintético

15

<400> 49

gtaggtggaa attctagcat catcc 25

<210> 50

20 <211> 96

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Secuencia artificial

<400> 50

ES 2 846 175 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 Gln Gly Ile Ser Asn Ser
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Leu
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Arg Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Pro
85 90 95

<210> 51

<211> 96

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

10

<400> 51

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Pro
85 90 95

15

<210> 52

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Secuencia artificial

<400> 52

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

10 <210> 53

<211> 98

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Secuencia artificial

<400> 53

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

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

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

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

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

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg

20

<210> 54

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

5 <400> 54

Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
1 5 10 15

Thr Val Ser Ser
20

<210> 55

<211> 19

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

15

<400> 55

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser

<210> 56

20 <211> 57

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Secuencia artificial

<400> 56

atggaatggg catgggtctt tctgtcttt ctgtcagtc caaccggggg ccacagt 57

30 <210> 57

<211> 57

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

5

<400> 57

atggaatggt cttgggtctt tctgtcttt ctgtccgtca ctaccggggt ccactca 57

<210> 58

10 <211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Secuencia artificial

<400> 58

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

Asp	Ala	Arg	Cys
			20

20 <210> 59

<211> 60

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Secuencia artificial

<400> 59

atgtccgtgc ctactcaggt gctggggctg ctgctgctgt ggctgaccga cgctagatgt 60

30

<210> 60

<211> 328

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

5 <400> 60

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

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

ES 2 846 175 T3

Pro Ala Pro Pro Ala Ala Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
115 120 125

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
130 135 140

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
145 150 155 160

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
165 170 175

Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His
180 185 190

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
195 200 205

Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
210 215 220

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
225 230 235 240

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
245 250 255

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
260 265 270

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
275 280 285

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
290 295 300

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
305 310 315 320

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
325

<210> 61

<211> 984

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 61

gctagcacta aaggaccaag cgtgttccct ctgggtccaa gcagcaaatac aacctcaggc	60
ggcacagcag cactgggggtg tctgggtgaag gactacttcc cagagcccgt caccgtgtca	120
tggaacagcg gagcactgac tagcggagtc cacacctttc cagccgtgct gcagagctcc	180
ggactgtact ccctgtctag tgtggtcaca gtgccttcaa gctccctggg gactcagacc	240
tatatctgca acgtgaatca caagccctcc aatactaagg tcgacaaaac agtggagcct	300
aagtcttgtg ataaaacaca tacttgcccc ccttgtcctg ctccaccagc cgctgcacca	360
agcgtgttcc tgtttcctcc aaagcccaaa gacacactga tgatcagcag aactcctgag	420
gtcacctgcg tggtcgtgga cgtgtccac gaggatcccg aagtccagtt taactggtac	480
gtggatgggg tcgaagtgca taatgcaaag actaaacctc gggaggaaca gttcaactct	540
acctttagag tctgtagtgt gctgacagtc gtgcaccagg actggctgaa cggaaaggag	600
tataagtgca aagtgtctaa taagggcctg cccgccccta tcgagaaaac aattagtaag	660
actaaaggcc agccaaggga accccaggtg tacacactgc cccctagtcg cgaggaaatg	720
acaaagaacc aggtctcact gacttgtctg gtgaaagggt tctatccatc cgacattgcc	780
gtggagtggg aatctaattg acagcccga aacaattaca agaccacacc acccatgctg	840
gacagcgatg gatccttctt tctgtattca aagctgaccg tggataaaag ccggtggcag	900
cagggcaatg tcttttctg ctctgtgatg cacgaagccc tgcacaacca ctacactcag	960
aagtccctgt ccctgtctcc tggc	984

<210> 62

5 <211> 325

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia artificial

<400> 62

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

ES 2 846 175 T3

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

5 <210> 63
 <211> 975

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Secuencia artificial

<400> 63

gctagcaca	aaagcccctc	tgtcttccct	ctggctccct	cctcccgcctc	cacctccgag	60
tccactgccg	ctctgggctg	tctgggtcaag	gattacttcc	ctgagccagt	caactgtgagt	120
tggaactcag	gcgccctgac	cagcggagtc	cacacatttc	ccgctgtgct	gcagagctcc	180
ggcctgtact	cctgtctag	tgtgggtcacc	gtgccttcaa	gcaatttcgg	gactcagacc	240
tatacatgca	acgtggacca	taagccatct	aatactaagg	tcgataaaac	cgtggagcga	300
aaatcctgcg	tggaatgccc	accttgtcct	gtccaccag	ccgctgcacc	aagcgtgttc	360
ctgtttcctc	caaagcccaa	agacacactg	atgatcagca	gaactcctga	ggtcacctgc	420
gtggctcgtg	acgtgtccca	cgaggatccc	gaagtccagt	ttaactggta	cgtggatggg	480
gtcgaagtgc	ataatgcaaa	gactaaacct	cgaggaggaac	agttcaactc	tacctttaga	540
gtcgtgagt	tgctgacagt	cgtgcaccag	gactggctga	acggaaagga	gtataagtgc	600
aaagtgtcta	ataagggcct	gcccgcccct	atcgagaaaa	caattagtaa	gactaaaggc	660
cagccaaggg	aaccccaggt	gtacacactg	ccccctagtc	gcgaggaaat	gacaaagaac	720
caggctctcac	tgacttgtct	ggtgaaaggg	ttctatccat	ccgacattgc	cgtggagtgg	780
gaatctaata	gacagcccga	aaacaattac	aagaccacac	cacccatgct	ggacagcgat	840
ggatccttct	ttctgtattc	aaagctgacc	gtggataaaa	gccgggtggca	gcagggcaat	900
gtcttttctc	gctctgtgat	gcacgaagcc	ctgcacaacc	actacactca	gaagtcctctg	960
tccctgtctc	ctggc					975

10 <210> 64

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Secuencia artificial

<400> 64

Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu
1				5				10						15	

ES 2 846 175 T3

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 65

<211> 321

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

10

<400> 65

cgtacggtcg cgcggccctc cgtgtttatt tttcctccat ctgacgaaca gctgaagagt	60
gggaccgcct ccgtggtgtg cctgctgaac aatttctacc cccgggaggc caaggtgcag	120
tggaaagtcg acaacgctct gcagtctggc aatagtcagg agtcagtgac tgaacaggac	180
agcaaggatt ccacctattc tctgagctcc accctgacac tgagcaaagc agattacgaa	240
aagcacaaag tctatgcctg cgaagtgacc caccaggggc tgagcagtc cagtgaccaag	300
tcctttaaca ggggagagtg t	321

<210> 66

15 <211> 124

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Secuencia artificial

ES 2 846 175 T3

<400> 66

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

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

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

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

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

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ile Pro Leu Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Tyr Trp Tyr Phe Asp
100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

5

<210> 67

<211> 372

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 67

cagggtccagc tgggtccagtc agggagcga ctgaagaaac caggcgcatc agtgaaggtc	60
agctgcaaag cctccgggta taccttcaca gactactcta tgcactgggt gcggcaggct	120
ccaggacagg gactggagtg gatgggggtg atcaacactg agaccggaga acctacctat	180
gctcagggct tcaccggcag attcgtgttt agcctggaca catctgtcag tactgcatac	240
ctgcagatca gctccctgaa ggccgaagat accgctgtct actattgtgc caggattccc	300
ctgtactatt acgggagcag gtattggtat tttgatgtct gggggcaggg aacaaccgtc	360
actgtcagca gc	372

15

<210> 68

<211> 124

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Secuencia artificial

<400> 68

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

10

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

Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met
35 40 45

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

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

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ile Pro Leu Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Tyr Trp Tyr Phe Asp
100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 69

<211> 372

15 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

20

<400> 69

ES 2 846 175 T3

```

cagggtccagc tgggtccagtc agggagcga cagaagaaac caggcgcac agtgaaggtc      60
agctgcaaag cctccgggta taccttcaca gactactcta tgcactgggt gcggcaggct      120
ccaggacagg gactgaagtg gatgggggtgg atcaacactg agaccggaga acctacctat      180
gctcagggct tcaccggcag attcgtgttt agcctggaca catctgtcag tactgcatac      240
ctgcagatca gctccctgaa ggccgaagat accgctgtct actattgtgc caggattccc      300
ctgtactatt acgggagcag gtattggtat tttgatgtct gggggcaggg aacaaccgtc      360
actgtcagca gc                                                                372

```

<210> 70

<211> 124

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

10

<400> 70

```

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

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

Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met
35           40           45

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

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

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85           90           95

Ala Arg Ile Pro Leu Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Tyr Trp Tyr Phe Asp
100          105          110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115          120

```

<210> 71

15 <211> 372

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

5

<400> 71

cagatccagc tgggccagtc agggagcgaa ctgaagaaac caggcgcatc agtgaaggtc	60
agctgcaaag cctccgggta taccttcaca gactactcta tgcactgggt gcggcaggct	120
ccaggacagg gactgaagtg gatgggggtgg atcaacactg agaccggaga acctacctat	180
gctcagggct tcaccggcag attcgtgttt agcctggaca catctgtcag tactgcatac	240
ctgcagatca gctccctgaa ggccgaagat accgctgtct actattgtgc caggattccc	300
ctgtactatt acgggagcag gtattggtat ttgatgtct gggggcaggg aacaaccgtc	360
actgtcagca gc	372

<210> 72

10

<211> 124

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15

<223> Secuencia artificial

<400> 72

ES 2 846 175 T3

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

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

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ile Pro Leu Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Tyr Trp Tyr Phe Asp
100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 73

<211> 372

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

10

<400> 73

cagggtgcagc tgggtgcagtc tgggagcgaa ctgaagaaac cagggggcatc agtgaaggtc	60
agctgcaaag cctccggata taccttcaca gactactcta tgcactgggt gcggcaggct	120
ccaggacagg gactggagtg gatgggatgg atcaacactg agaccggcga acctacctat	180
gctgacgatt ttaagggcag attcgtgttt agcctggaca catctgtcag tactgcatac	240
ctgcagatca gctccctgaa agccgaagat acagctgtct actattgtgc caggattccc	300
ctgtactatt acggaagcag gtattggtat tttgatgtct gggggcaggg aacaactgtg	360
actgtgtcct cc	372

<210> 74

15 <211> 124

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

5

<400> 74

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

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

Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

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

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ile Pro Leu Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Tyr Trp Tyr Phe Asp
100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 75

10 <211> 372

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Secuencia artificial

<400> 75

ES 2 846 175 T3

cagggtgcagc tgggtgcagtc tgggagcgaa ctgaagaaac cagggggcatc agtgaaggtc 60
agctgcaaag cctccggata taccttcaca gactactcta tgcactgggt gcggcaggct 120
ccaggacagg gactgaagtg gatgggatgg atcaacactg agaccggcga acctacctat 180
gctgacgatt ttaagggcag attcgtgttt agcctggaca catctgtcag tactgcatac 240
ctgcagatca gctccctgaa agccgaagat acagctgtct actattgtgc caggattccc 300
ctgtactatt acggaagcag gtattggtat tttgatgtct gggggcaggg aacaactgtg 360
actgtgtcct cc 372

<210> 76

<211> 124

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

10

<400> 76

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

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

Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60

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

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ile Pro Leu Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Tyr Trp Tyr Phe Asp
100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 77

15 <211> 372

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

5

<400> 77

cagatccagc	tggtgcagtc	tgggagcgaa	ctgaagaaac	caggggcatc	agtgaaggtc	60
agctgcaaag	cctccggata	taccttcaca	gactactcta	tgcactgggt	gcggcaggct	120
ccaggacagg	gactgaagtg	gatgggatgg	atcaacactg	agaccggcga	acctacctat	180
gctgacgatt	ttaagggcag	attcgtgttt	agcctggaca	catctgtcag	tactgcatac	240
ctgcagatca	gctccctgaa	agccgaagat	acagctgtct	actattgtgc	caggattccc	300
ctgtactatt	acggaagcag	gtattggtat	tttgatgtct	gggggcaggg	aacaactgtg	360
actgtgtcct	cc					372

<210> 78

10

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15

<223> Secuencia artificial

<400> 78

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

<210> 79

<211> 321

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

10 <400> 79

gatataccaga tgacccagtc tccttcctct ctgagtgtt cagtgggcga ccgggtcacc	60
atcacatgca gagcaagcga gaacatctac aggaatctgg cctgggtatca gcagaagccc	120
ggcaaagctc ctaagctgct ggtgtacgcc gctaccaacc tggcagatgg agtgccaagc	180
cggttcagcg gatccggatc tggaacagac tatactctga ccatcagctc cctgcagccc	240
gaagattttg ccacttacta ttgtcagcat ttctggggca caccttggac cttcgggcag	300
ggaactaaag tggagattaa g	321

<210> 80

<211> 107

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

20

<400> 80

ES 2 846 175 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 Glu Asn Ile Tyr Arg Asn
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Leu
35 40 45

Tyr Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 81

<211> 321

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

10

<400> 81

gatatccaga tgacccagtc tccttcctct ctgagtgtt cagtgggcga ccgggtcacc	60
atcacatgca gagcaagcga gaacatctac aggaatctgg cctggtatca gcagaagccc	120
ggcaaagctc ctaagctgct gctgtacgcc gctaccaacc tggcagatgg agtgccaagc	180
cgggttcagcg gatccggatc tggaacagac tatactctga ccatcagctc cctgcagtcc	240
gaagattttg ccacttacta ttgtcagcat ttctggggca caccttggac cttcgggcag	300
ggaactaaag tggagattaa g	321

<210> 82

15 <211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 846 175 T3

<223> Secuencia artificial

<400> 82

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 Glu Asn Ile Tyr Arg Asn
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Gln Leu Leu Leu
35 40 45

Tyr Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

5

<210> 83

<211> 321

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Secuencia artificial

<400> 83

gatataccaga tgacccagtc tccttcctct ctgagtgtt cagtgggcga ccgggtcacc	60
atcacatgca gagcaagcga gaacatctac aggaatctgg cctggtatca gcagaagccc	120
ggcaaagctc ctcaactgct gctgtacgcc gctaccaacc tggcagatgg agtgccaagc	180
cggttcagcg gatccggatc tggaacagac tatactctga ccatcagctc cctgcagccc	240
gaagattttg ccacttacta ttgtcagcat ttctggggca caccttgac cttcgggcag	300
ggaactaaag tggagattaa g	321

15

<210> 84

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia artificial

5

<400> 84

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Arg Asn
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 85

10 <211> 321

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Secuencia artificial

<400> 85

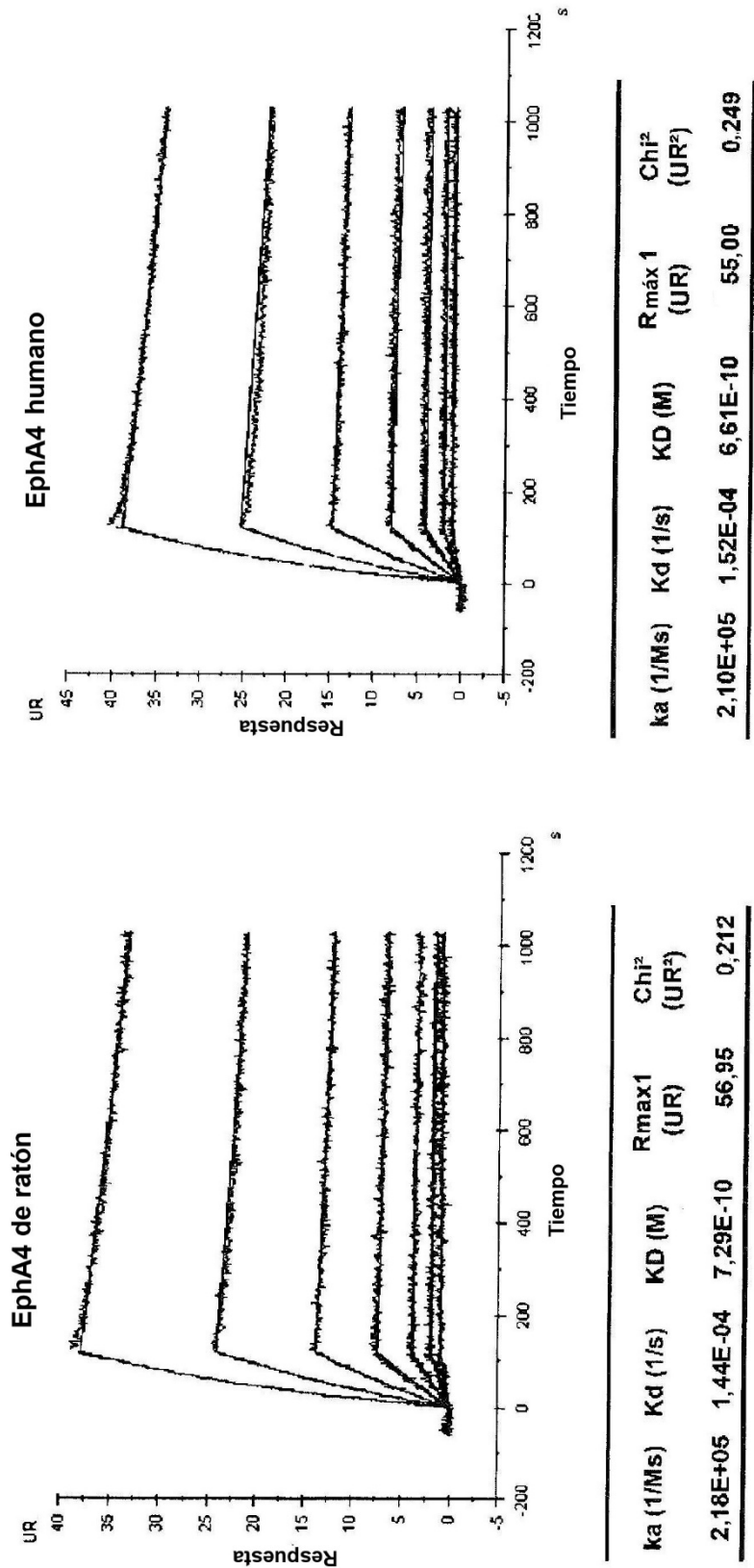
gaaatcgtga tgaccagtc tcccgccact ctgtctgtga gtccaggcga gcgggctacc	60
ctgtcttgca gagcaagcga aaacatctac aggaatctgg cctggtatca gcagaagcca	120
ggacagtctc ctcgactgct gatctacgcc gctacaaacc tggcagacgg gattcccgca	180
cgattctcag gaagcggatc cggaaccgag tataccctga caattagctc cctgcagagc	240
gaagatttcg ccgtctacta ttgtcagcat ttctggggaa caccttgac attcgggcag	300
ggaactaaag tggagattaa g	321

REIVINDICACIONES

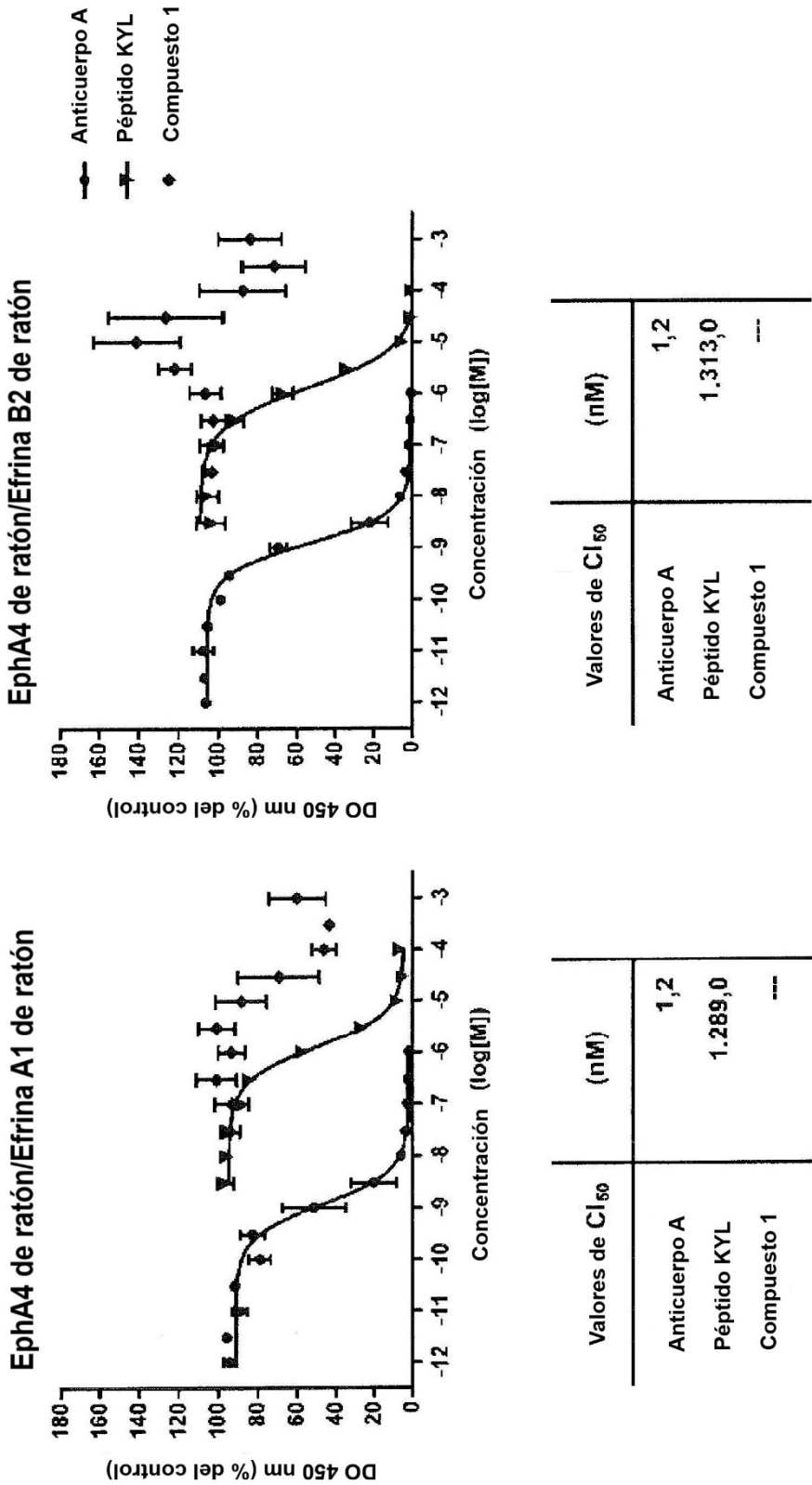
1. Un anticuerpo anti-EphA4 o un fragmento de unión a EphA4 del mismo, que comprende
 - (a) CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 27;
 - (b) CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 29;
 - 5 (c) CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 30;
 - (d) CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 31;
 - (e) CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 32; y
 - (f) CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 33.
2. El anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde
10 el anticuerpo o el fragmento de unión a EphA4 del mismo está humanizado.
3. El anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde
el anticuerpo o el fragmento de unión a EphA4 del mismo se une específicamente a EphA4 e inhibe la unión entre EphA4 y la efrina.
4. El anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde
15 el anticuerpo o el fragmento de unión a EphA4 del mismo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, y una región constante de la cadena pesada y una región constante de la cadena ligera que cada una comprende una secuencia derivada de anticuerpo humano.
5. El anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con la reivindicación 4, en donde
20 la región constante de la cadena pesada deriva de IgG humana, en donde la IgG humana opcionalmente es IgG₁ humana o IgG₂ humana.
6. El anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 5, en donde
25 la región constante de la cadena ligera deriva de Igk humana.
7. El anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde
el fragmento de unión a EphA4 se selecciona del grupo que consiste en Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv, en donde el fragmento de unión a EphA4 opcionalmente es F(ab')₂.
8. El anticuerpo anti-EphA4 o un fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 7, que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde una región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 66, 68 o 70 y una región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 78, 80, 82 o 84.
9. El anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con la reivindicación 8, en donde una
35 región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 66, y una región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 78, o en donde una región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 68, y una región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 78, o
40 en donde una región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 70, y una región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 78, o

- en donde una región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 66, y una región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 80, o
- 5 en donde una región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 68, y una región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 80, o
- en donde una región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 70, y una región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 80, o
- 10 en donde una región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 66, y una región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 82, o
- 15 en donde una región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 68, y una región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 82, o
- en donde una región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 70, y una región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 82, o
- 20 en donde una región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 68, y una región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 84.
10. El anticuerpo anti-EphA4 o un fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con la reivindicación 8, en donde una región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 66, y una región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 84.
- 25 11. El anticuerpo anti-EphA4 o un fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con la reivindicación 8, en donde una región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 70, y una región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 84.
12. El anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en donde
- 30 la región constante de la cadena pesada deriva de IgG humana, en donde la IgG humana es IgG humana que consiste en IgG₂ humana o una combinación de IgG₁ humana y IgG₂ humana.
13. El anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con la reivindicación 12, en donde la IgG humana es IgG₂ humana.
- 35 14. El anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con la reivindicación 13, en donde la IgG₂ humana tiene una mutación C131S, C219S, V234A y/o G237A con la numeración Eu, y no tiene un resto de lisina en el carboxi terminal, en donde opcionalmente la IgG₂ humana comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 62.
15. El anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con la reivindicación 12, en donde la IgG humana es IgG humana que consiste en una combinación de IgG₁ humana e IgG₂ humana.
- 40 16. El anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con la reivindicación 15, en donde en la IgG humana que consiste en una combinación de IgG₁ humana e IgG₂ humana, una región CH1 y una región bisagra son IgG₁ humana, y una región CH2 y una región CH3 son IgG₂ humana.
- 45 17. El anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con la reivindicación 16, en donde la IgG humana que consiste en una combinación de IgG₁ humana e IgG₂ humana tiene una mutación V234A y/o G237A con la numeración Eu, y no tiene un resto lisina en el carboxi terminal, en donde opcionalmente la IgG humana que consiste en una combinación de IgG₁ humana e IgG₂ humana comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 60.
- 50 18. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-EphA4 o el fragmento de unión a EphA4 del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, que comprende además opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.
19. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 18 para usar en el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA).

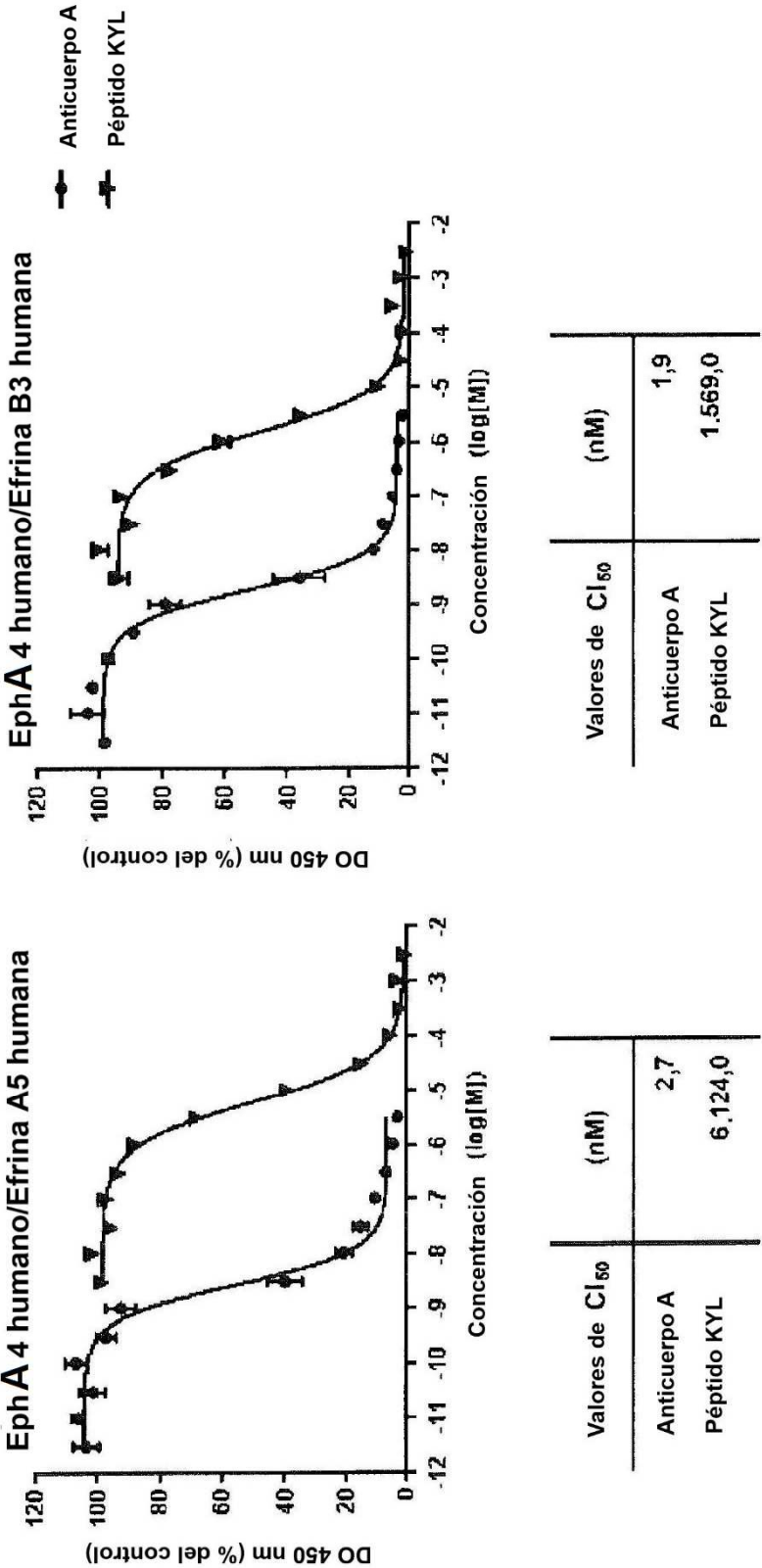
[FIG. 1]



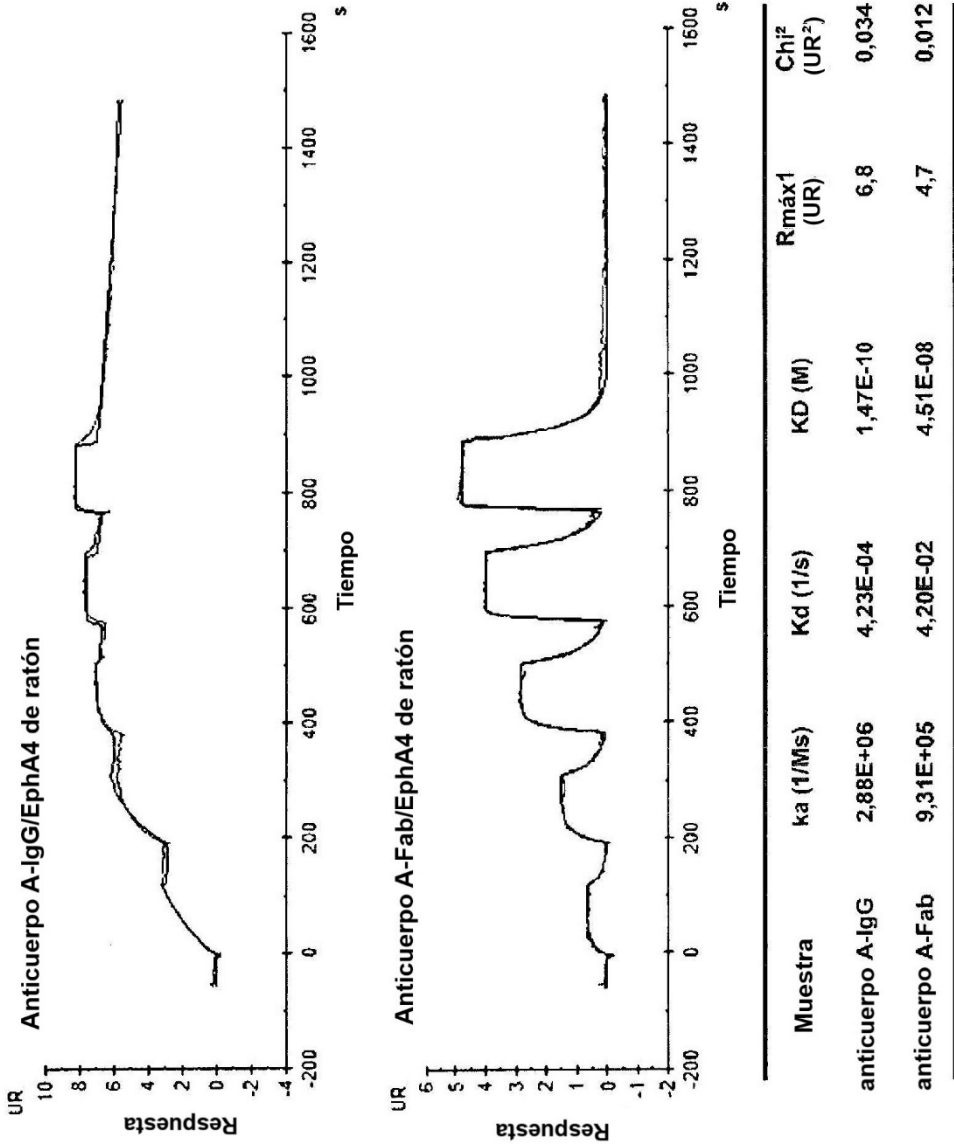
[FIG. 2]



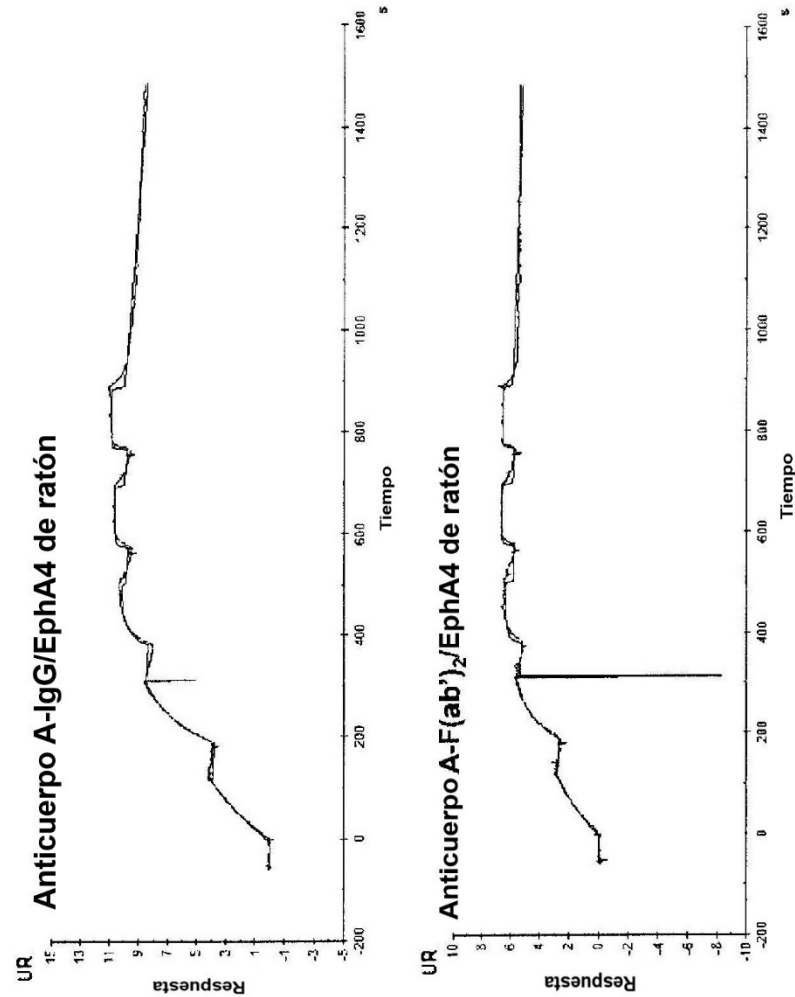
[FIG. 3]



[FIG. 4A]

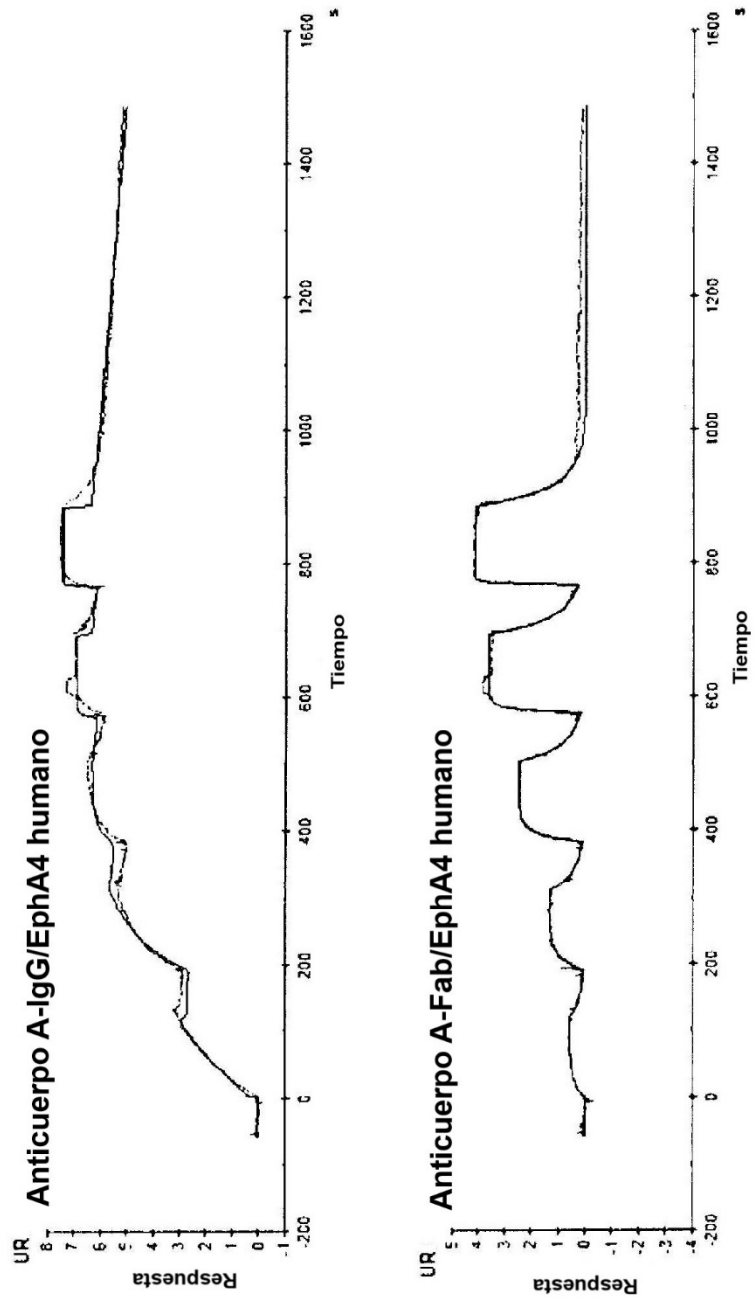


[FIG. 4B]



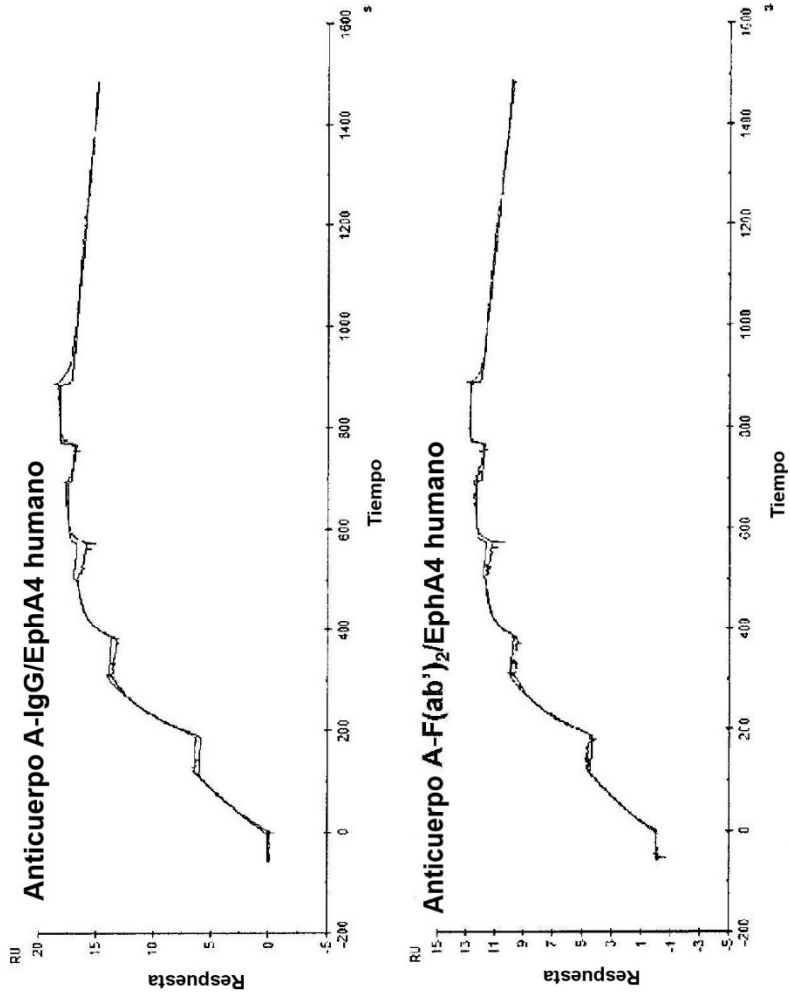
Muestra	ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)	Rmáx1 (UR)	Chi² (UR²)
anticuerpo A-IgG	6,81E+06	2,88E-04	4,23E-11	9,97	0,084
anticuerpo A-F(ab') ₂	8,98E+06	2,05E-04	2,29E-11	5,87	0,067

[FIG. 4C]



Muestra	ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)	R _{máx1} (UR)	Chi ² (UR ²)
anticuerpo A-IgG	2,70E+06	3,89E-04	1,44E-10	6,3	0,042
anticuerpo A-Fab	9,21E+05	3,73E-02	4,04E-08	4,0	0,024

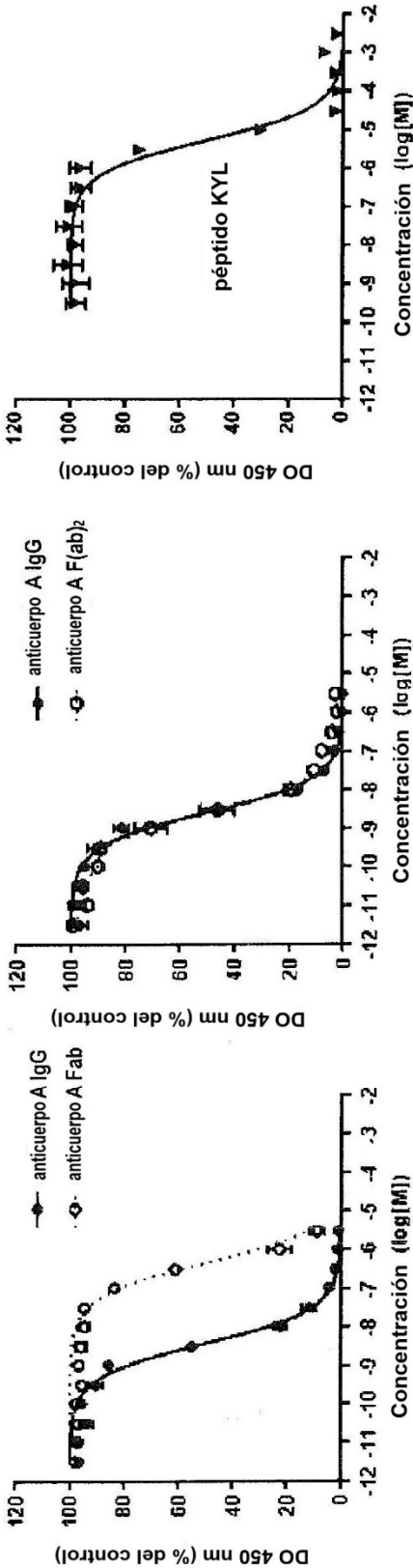
[FIG. 4D]



Muestra	ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)	Rmáx1 (UR)	Chi² (UR²)
anticuerpo A-IgG	5,91E+06	2,36E-04	3,99E-11	17,1	0,175
anticuerpo A-F(ab') ₂	6,29E+05	3,33E-02	5,30E-11	12,0	0,082

[FIG. 5]

EphA4 de ratón/Efrina B2 de ratón

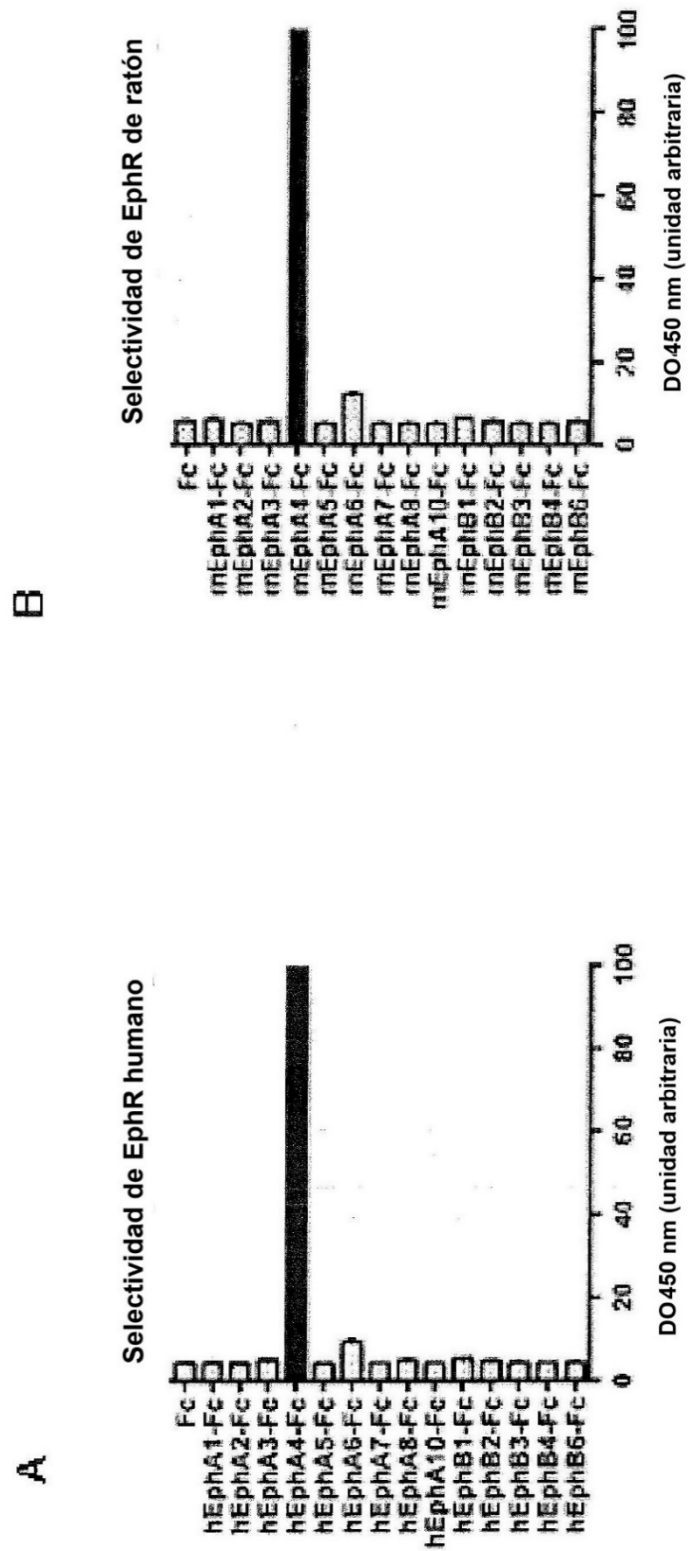


Valores de CI ₅₀	(nM)
anticuerpo A-IgG	3,6
anticuerpo A-Fab	438,5

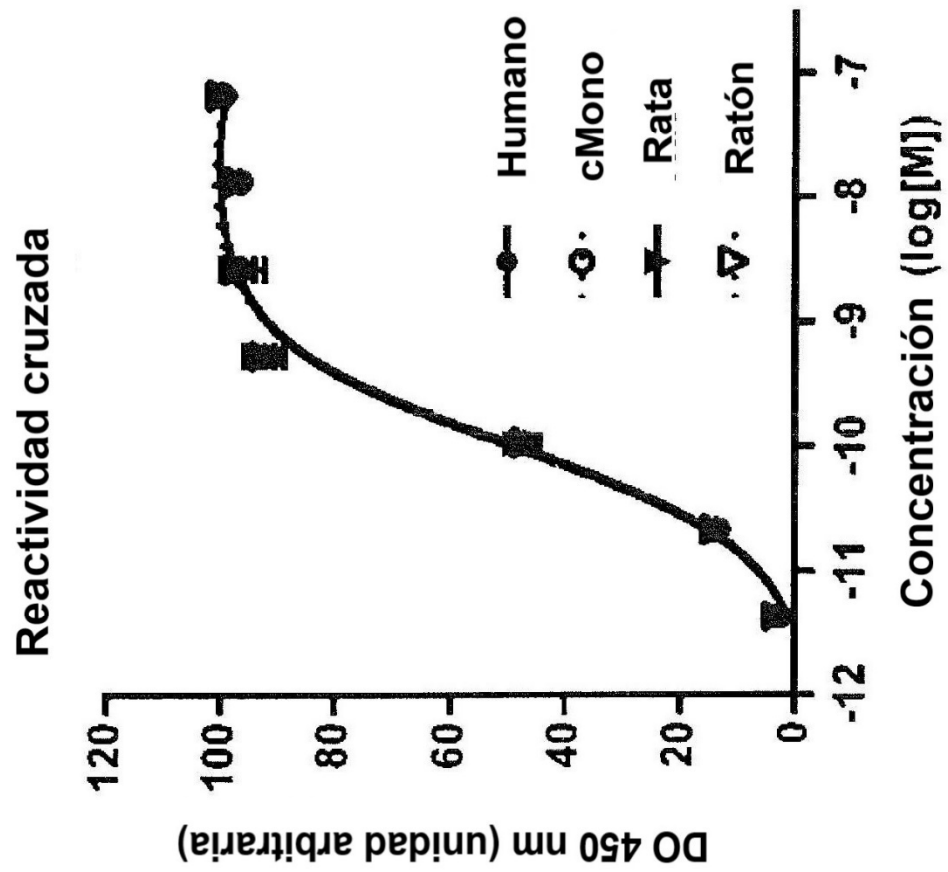
Valores de CI ₅₀	(nM)
anticuerpo A-IgG	2,6
anticuerpo A-F(ab') ₂	2,9

Valores de CI ₅₀	(nM)
péptido KYL	5.293,0

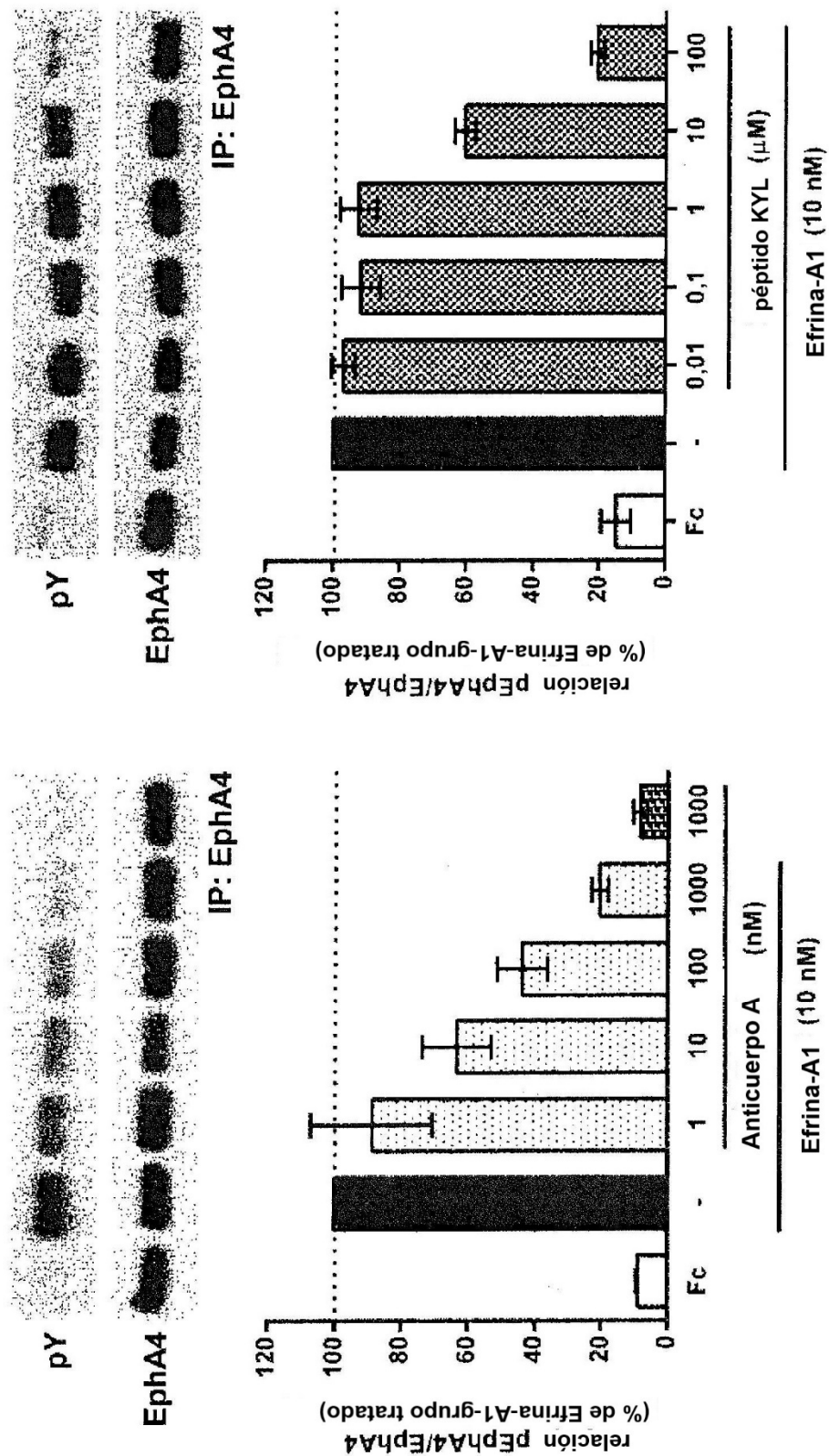
[FIG. 6]



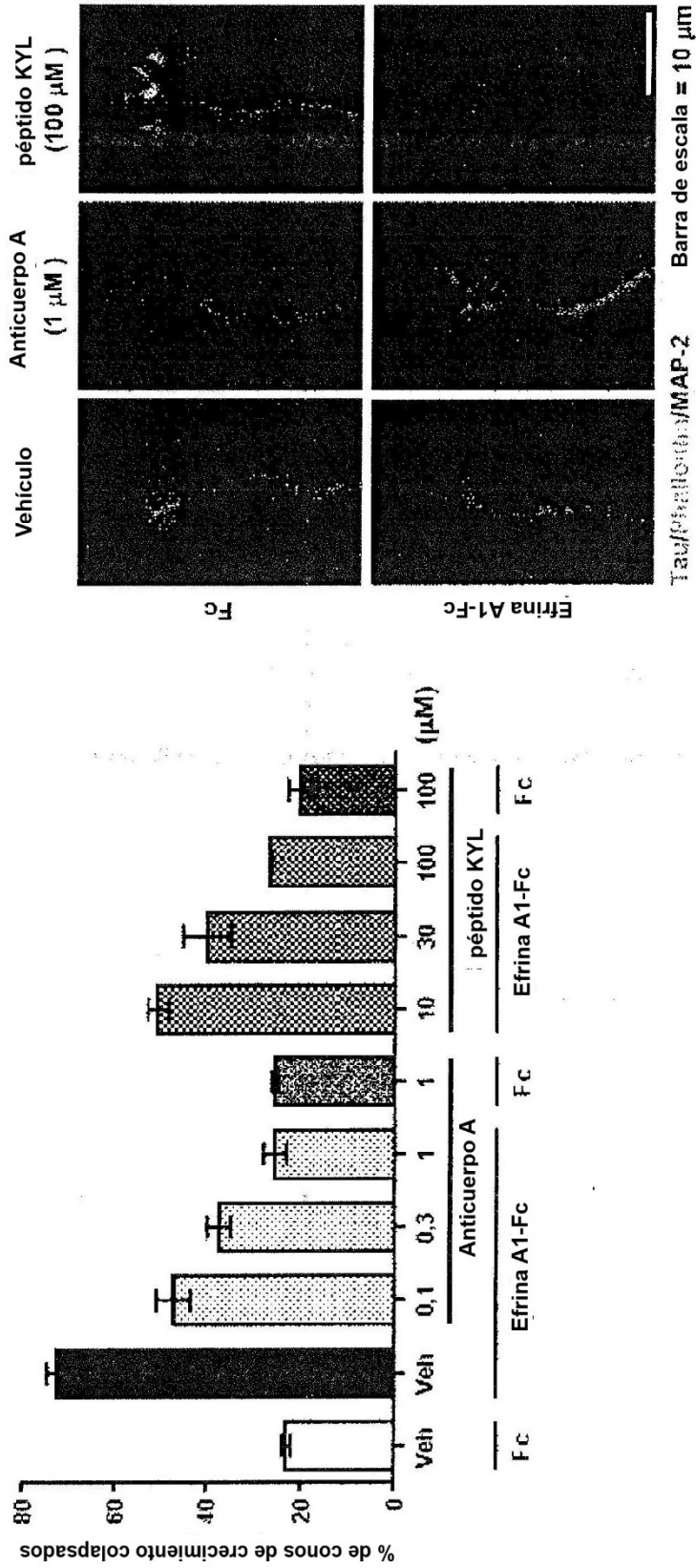
[FIG. 7]



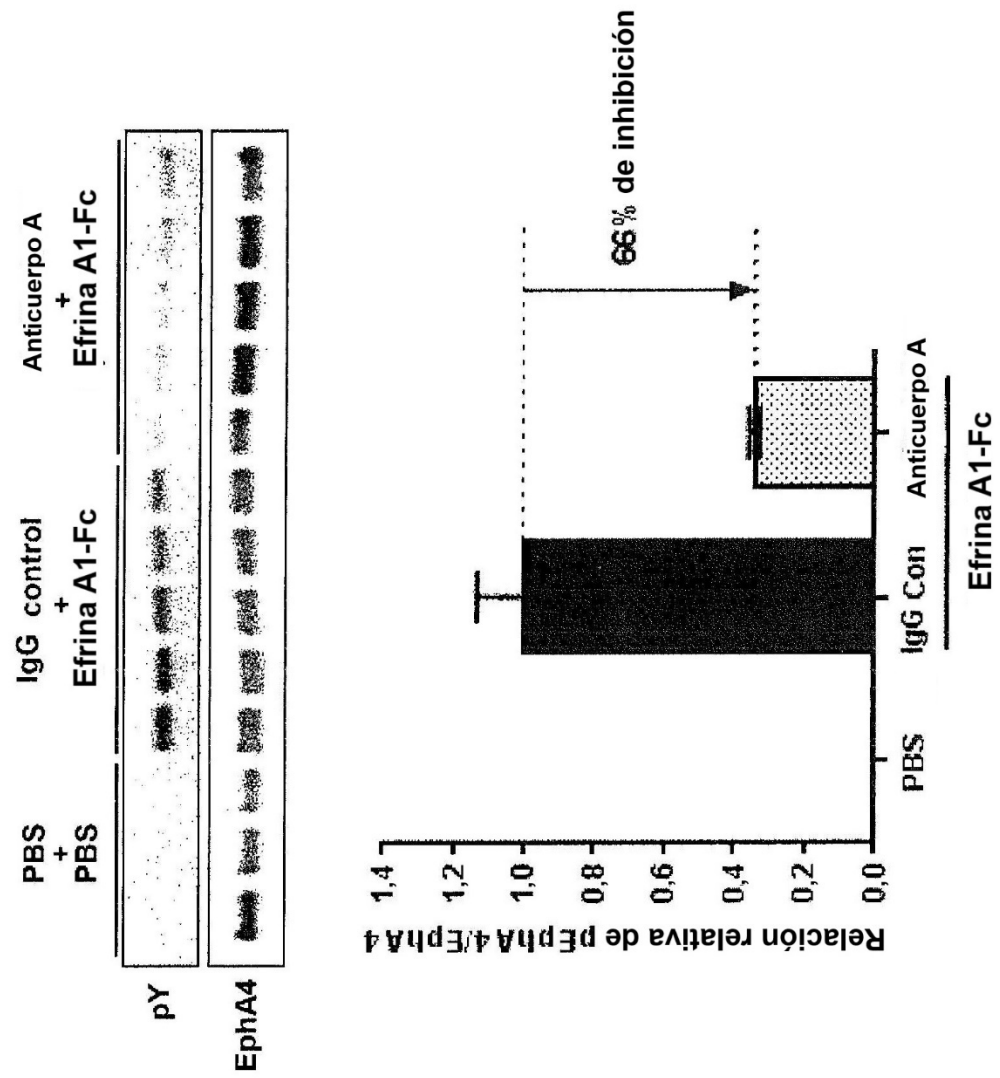
[FIG. 8]



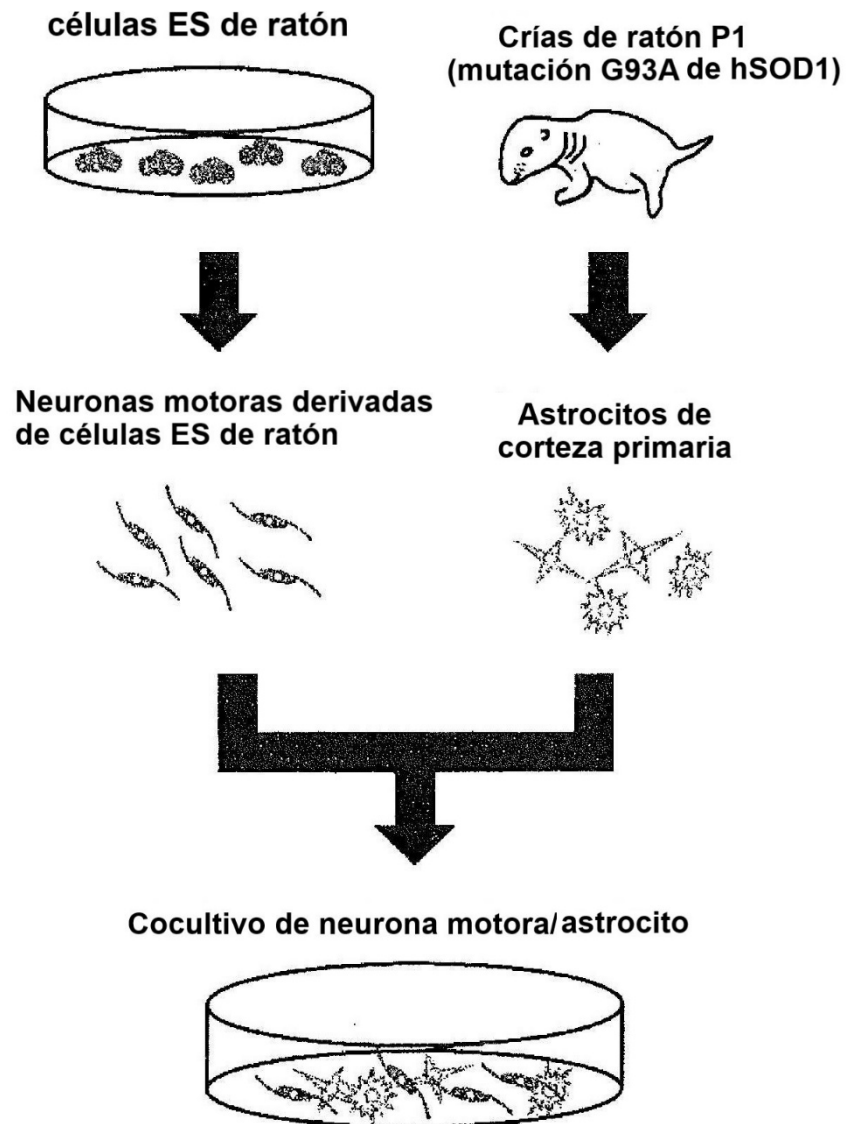
[FIG. 9]



[FIG. 10]

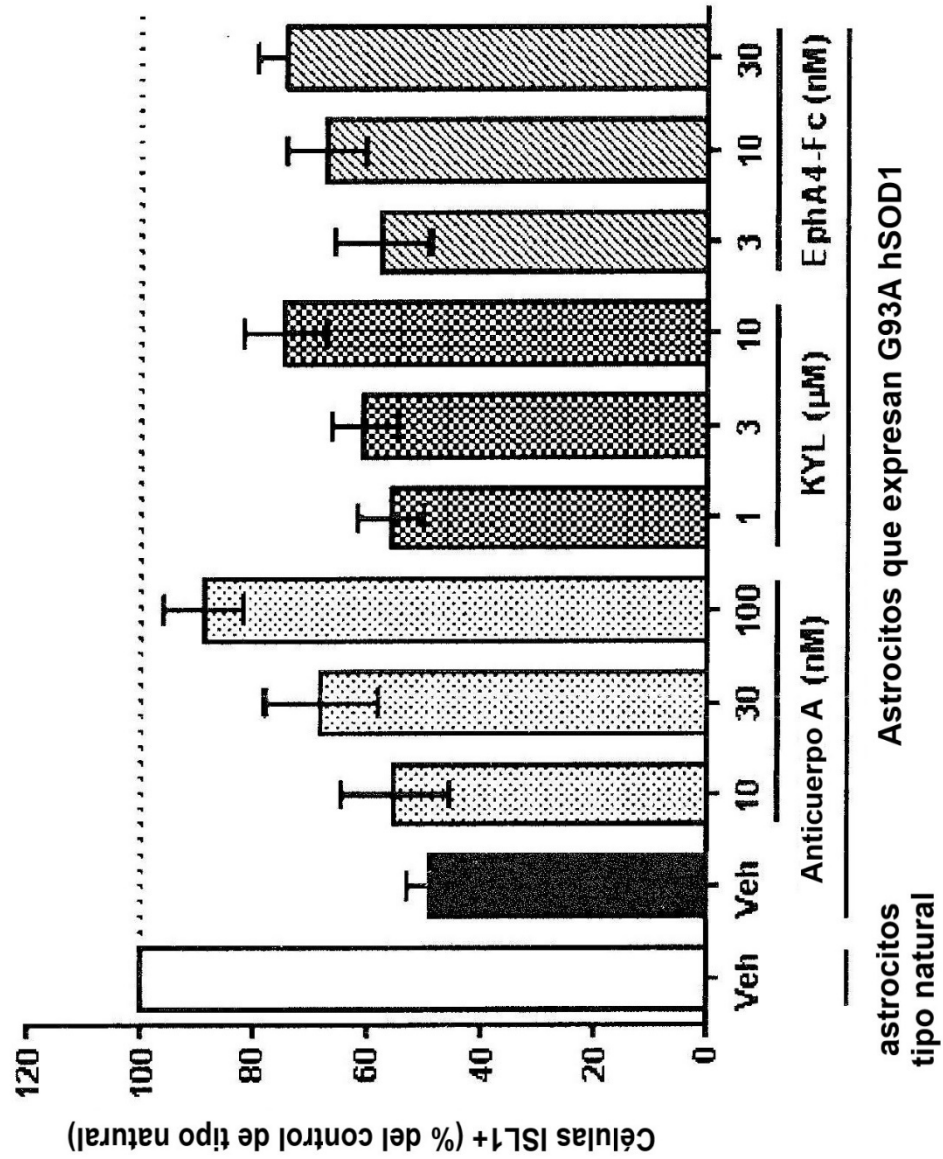


[FIG. 11]

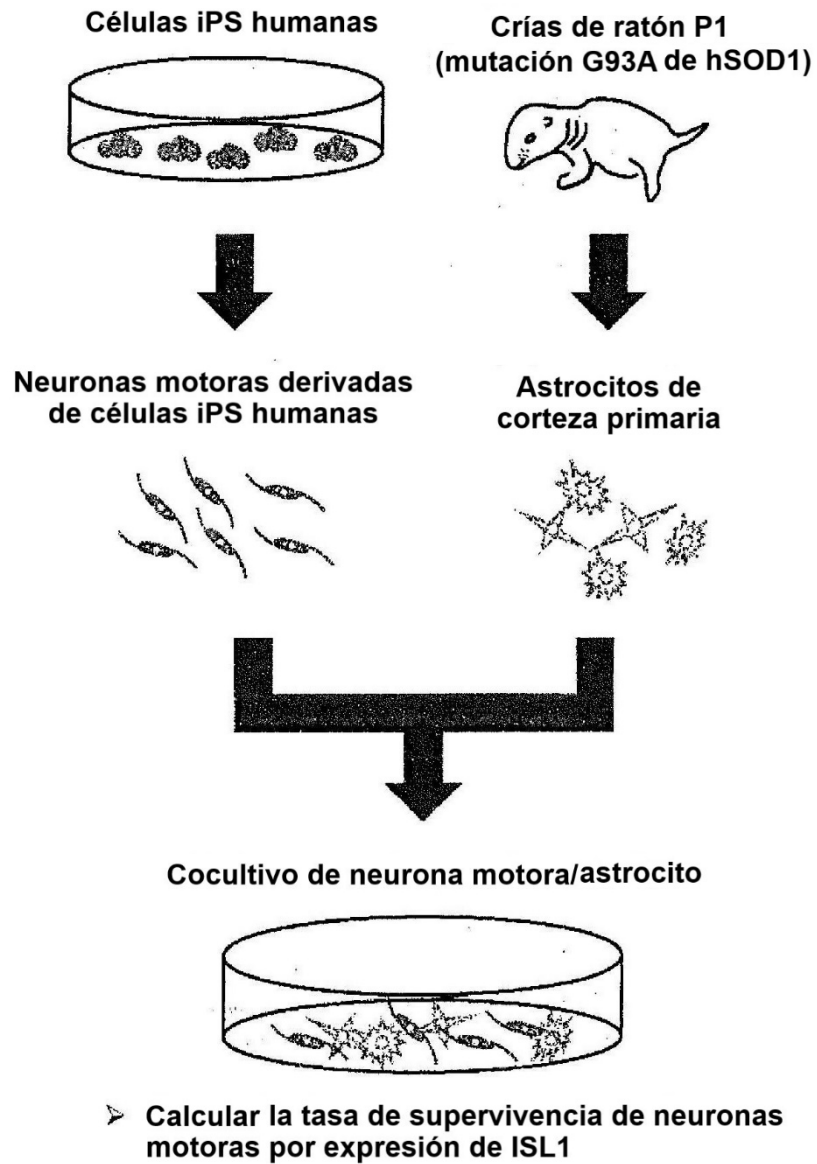


- Calcular la tasa de supervivencia de neuronas motoras por expresión de ISL1

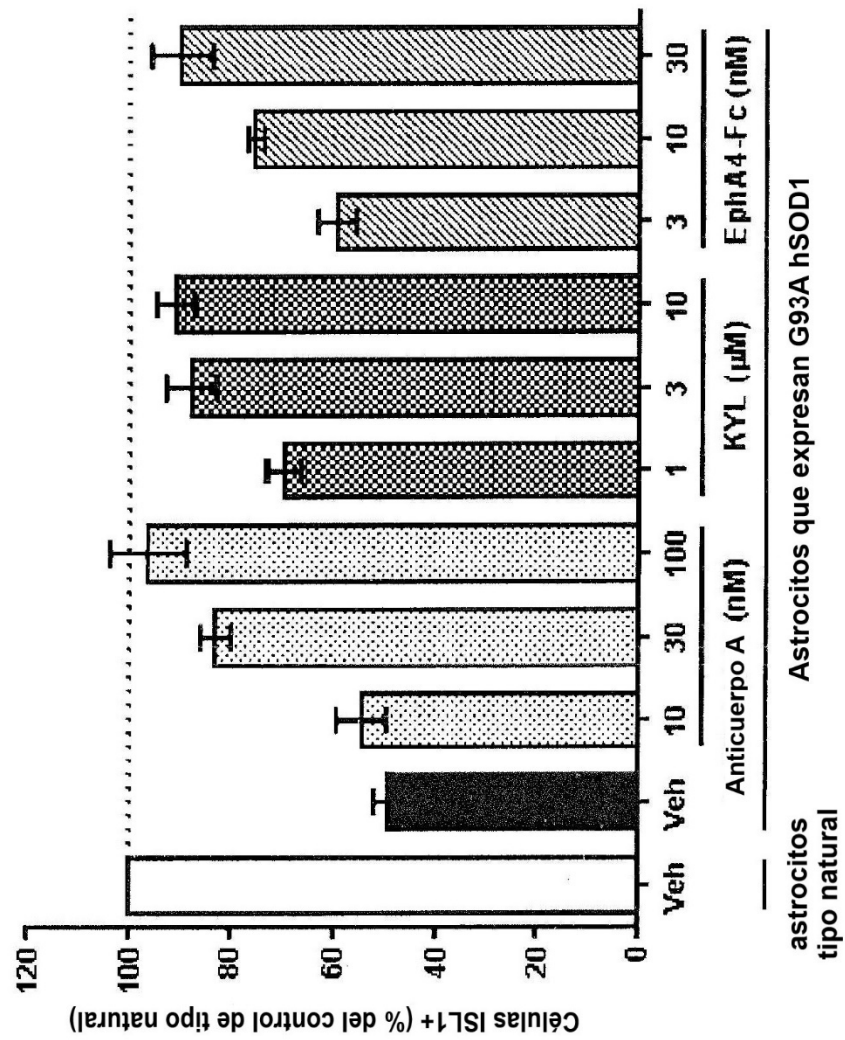
[FIG. 12]



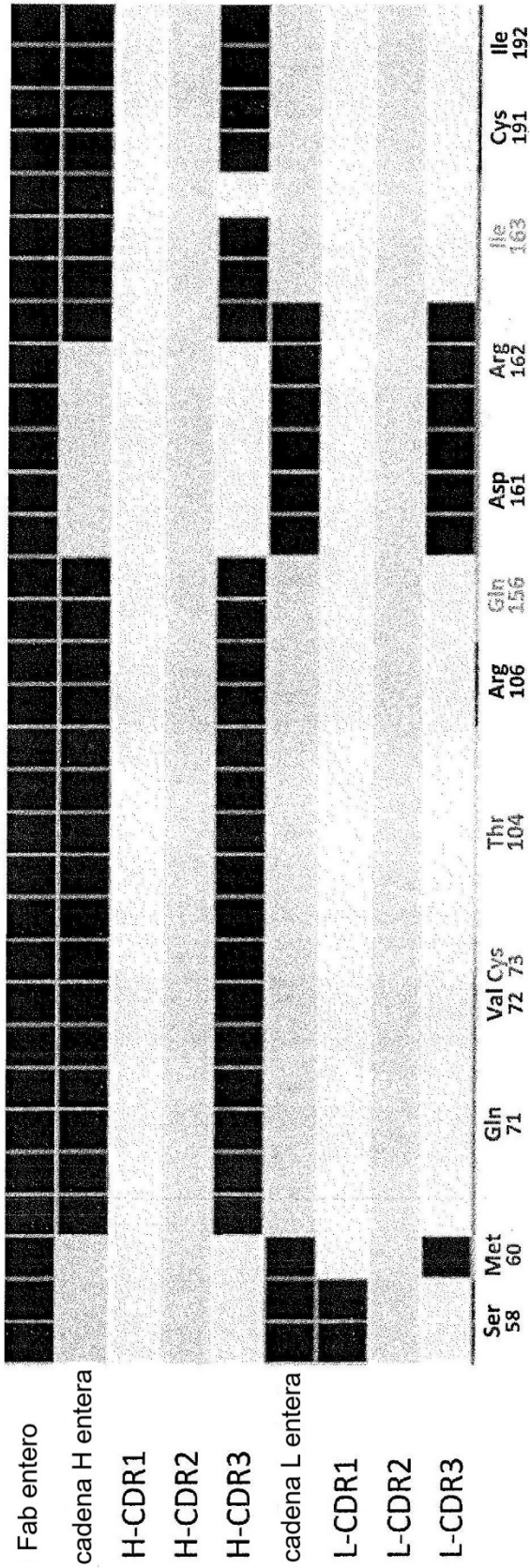
[FIG. 13]



[FIG. 14]



[FIG. 15]



[FIG. 16]

