



No. 11-162444- -00000-0000

Fecha: 2011-11-25 17:06:51 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 166

DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

ENTRADA EN FASE NACIONAL

21. **EXPEDIENTE No.** _____

ANTICUERPOS ANTI CXCR4 PARA EL TRATAMIENTO DEL VIH

54. **TITULO** _____

51. **CLASIFICACION INTERNACIONAL** _____

PIERRE FABRE MEDICAMENT

71. **SOLICITANTE** _____

BOULOGNE-BILLANCOURT, FRANCIA

DOMICILIO _____

74. **APODERADO** _____

JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

22. **BOGOTÁ, D.C.** _____

AS: 118.879

PETITORIO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-162444-00000-0000

ión

Fecha: 2011-11-25 17:06:51 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 166

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

1

SOLICITUD DE:



Patente de Invención.



Patente de Modelo de Utilidad.



Capítulo I.



Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)Nombre: **PIERRE FABRE MEDICAMENT**Dirección: 45, place Abel Gance, F-92100
Boulogne-Billancourt, Francia.Nacionalidad o Domicilio: Francia.
Lugar de Constitución: Francia.

Teléfono:

Fax:

E-mail

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐NIT ☐C.E. ☐Otro ☐Cual
Número

3

REPRESENTANTE
O APODERADO
(74)Nombre: **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO**

Dirección: Calle 70 A #4-41, Bogotá, Colombia.

Teléfono: 744-2200

Fax: 742-2200

E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒NIT ☐C.E. ☐Otro ☐Cual
Número 80.410.337 TP 57492

En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sirvase indicar el número de radicación (del poder).

4

INVENTOR (ES)
(72)Nombre: **KLINGUER-HAMOUR, Christine**

Dirección: 73, route de chez Dios-saz, Les Gottalles, F-74570 Groisy, Francia

Nacionalidad o Domicilio: Francia

5 PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2010/055863Fecha 29.04.2010Publicación Internacional No. WO 2010/125162 A1Fecha 04.11.20106 Título (54): ANTICUERPOS ANTI CXCR4 PARA EL TRATAMIENTO DEL VIH

7 Clasificación Internacional (51):

8 Prioridad

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

SI ☒NO ☐

EP

29.04.2009

09159076.0

US

29.04.2009

61/173,680

9 Comprobante de pago No. 11-102893, 11-93116, 11-90601, 11-93113 Fecha 24.11.2011

11-93114, 1186156

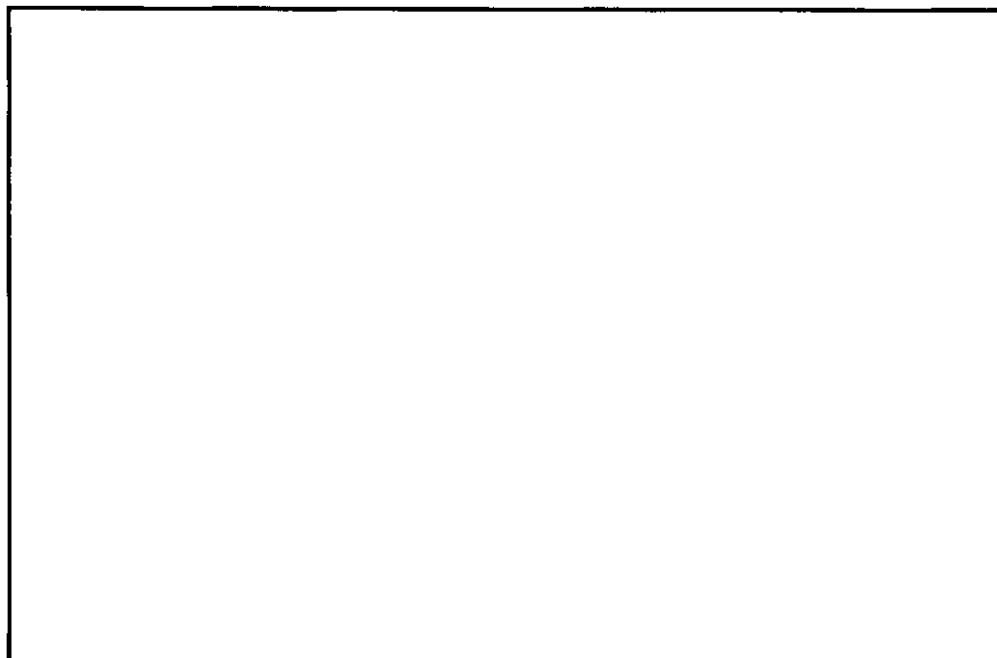
Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

10

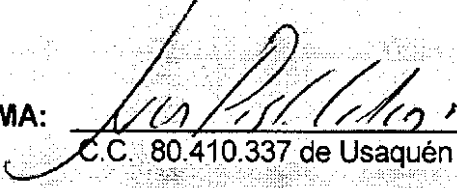
ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. \$ 571.000
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal de la persona jurídica peticionaria, en cuanto no esté inscrita en alguna Cámara de Comercio Colombiana.
- ☒ Poderes, si fuere el caso. Fotocopia autenticada.
- ☒ Declaración bajo la Regla 4.17
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al español (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción de examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional bajo el Art. 19.
- ☒ Otros: Comprobante(s) de pago de la tasa por concepto de reivindicaciones adicionales \$ 459.000 (17*\$27.000).

11 FIGURA CARACTERÍSTICA:



12 Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: JUAN PABLO CADENA SARMIENTOFIRMA: 

C.C. 80.410.337 de Usaquén TP 57492 del C.S.J.

AS.118.879³

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 11 - 102893
		Bogotá D.C., Octubre 20 de 2011 - 16:50:48

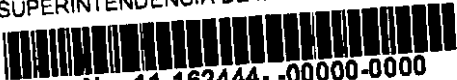
RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A.	NI 860.047.372
-------------------------------------	----------------

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	456032231	19/10/2011	34.749.500.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	7 TRAMITES DE SOL. DE DISENOS INDUSTRIALES	571.000.00 571.000.00
			\$571.000.00

SON: **QUINIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 11-162444- -00000-0000
Fecha: 2011-11-25 17:06:51 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 166

AS. 118.879⁴

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 11 - 0093116
		Bogotá D.C., Septiembre 21 de 2011 - 16:46:40

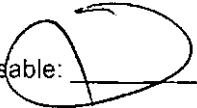
RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A. NI 860.047.372

RE

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	391971672	20/09/2011	1.485.039.00
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	411764636	21/09/2011	31.002.961.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	
			Vr.UNDITARIO Vr.CONCEPTO
			270.000.00 270.000.00
			\$270.000.00
			=====

SON: **DOSCIENTOS SETENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: 
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-162444- -00000-0000

Fecha: 2011-11-25 17:06:51 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eva: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 166

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Septiembre 21 de 2011 - 16:46:49

As. 118.879⁶

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 11 - 0090601
		Bogotá D.C., Septiembre 14 de 2011 - 16:23:58

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A.	NI 860.047.372
-------------------------------------	----------------

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	411762595	14/09/2011	36.617.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	VR. CONCEPTO
1 50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	54.000.00
			54.000.00
			\$54.000.00

SON: **CINCUENTA Y CUATRO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: 

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-162444- 00000-0000

Fecha: 2011-11-25 17:06:51 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 166

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Septiembre 14 de 2011 - 16:24:05

AS. 118.879⁶

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0093113

Bogotá D.C., Septiembre 21 de 2011 - 16:46:40

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A.

NI 860.047.372

RE

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	391971672	20/09/2011	1.485.039.00
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	411764636	21/09/2011	31.002.961.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	54.000.00	54.000.00
				\$54.000.00

SON: **CINCUENTA Y CUATRO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable:

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-162444-00000-0000

Fecha: 2011-11-25 17:06:51 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eva: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 166

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Septiembre 21 de 2011 - 16:46:49

AS. 118.879

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 11 - 0093114
		Bogotá D.C., Septiembre 21 de 2011 - 16:46:40

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A. NI 860.047.372

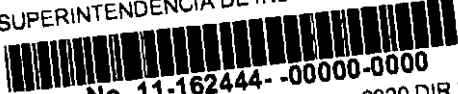
RE

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	391971672	20/09/2011	1.485.039.00
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	411764636	21/09/2011	31.002.961.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	
			Vr.UNDITARIO Vr.CONCEPTO
			54.000.00 54.000.00
			\$54.000.00
			=====

SON: **CINCUENTA Y CUATRO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: [Signature]
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 11-162444-00000-0000
Fecha: 2011-11-25 17:08:51 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 168

As. 118.879^o

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 11 - 0086156
		Bogotá D.C., Septiembre 05 de 2011 - 08:04:49

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A.	NI 860.047.372
-------------------------------------	----------------

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	391971650	01/09/2011	63.528.100.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO Vr. CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	54 INFORMACION DETALLADA DE UN TRAMITE	27.000.00 27.000.00
			\$27.000.00
			=====

SON: **VEINTISIETE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-162444-00000-0000

Fecha: 2011-11-25 17:06:51 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 166

- (51) International Patent Classification:
C07K 16/28 (2006.01) *A61P 31/18* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/EP2010/055863

(22) International Filing Date:
29 April 2010 (29.04.2010)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
09159076.0 29 April 2009 (29.04.2009) EP
61/173,680 29 April 2009 (29.04.2009) US

(71) Applicant (for all designated States except US):
PIERRE FABRE MEDICAMENT [FR/FR]; 45, place
Abel Gance, F-92100 Boulogne-Billancourt (FR).

(72) Inventor; and

(75) Inventor/Applicant (for US only): KLINGUER-
HAMOUR, Christine [FR/FR]; 73, route de chez Dios-
saz Les Gottalles, F-74570 Groisy (FR).

(74) Agent: WARCOIN, Jacques; Cabinet Regimbeau, 20,
rue de Chazelles, F-75847 Paris Cedex 17 (FR).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,
- DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM,
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

 - as to applicant's entitlement to apply for and be granted
a patent (Rule 4.17(ii))
 - as to the applicant's entitlement to claim the priority of
the earlier application (Rule 4.17(iii))
 - of inventorship (Rule 4.17(iv))

Published:

 - with international search report (Art. 21(3))
 - with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

WO 2010/125162 A1

(54) Title: ANTI CXCR4 ANTIBODIES FOR THE TREATMENT OF HIV

(57) Abstract: The present invention relates to novel isolated antibodies, or the derived compounds or functional fragments of same, capable of binding to CXCR4 but also of inducing conformational changed of the CXCR4 homodimers and able to inhibit HIV-1 primary isolate replication in PBMC. More particularly, the present invention relates to the 515H7 and 301aE5 monoclonal antibodies, specific to the CXCR4 protein, as well as their use for the treatment of HIV infection. Pharmaceutical compositions composed of such antibodies and a process for the selection of such antibodies are also covered.

ANTICUERPOS ANTI CXCR4 PARA EL TRATAMIENTO DEL VIH

La presente invención se relaciona con anticuerpos novedosos, en particular anticuerpos monoclonales de murino, quiméricos y humanizados, capaces de unirse específicamente a los receptores quimioquina (CXCR) así como también las secuencias de ácido nucleico y aminoácido que codifican tales anticuerpos. Desde un aspecto, la invención se relaciona con anticuerpos novedosos, fragmentos o derivados funcionales, capaces de unirse específicamente al CXCR4 y que tienen actividad fuerte contra infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH). La invención también comprende el uso de tales anticuerpos, fragmentos o derivados funcionales como un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o preventivo de la infección por VIH.

Las quimioquinas son péptidos secretados, pequeños, que controlan la migración de leucocitos a lo largo de un gradiente químico del ligando, conocido como gradiente de quimioquina, especialmente durante las reacciones inmunes (Zlotnick A. et al., 2000). Ellas se dividen en dos subfamilias principales, CC y CXC, con base en la posición de sus residuos cisteína de termina NH_2 , y se unen a los receptores acoplados a la proteína G, cuyos dos subfamilias principales se designan CCR y CXCR. Se han descubierto más de 50 quimioquinas humana y 18 receptores de quimioquina.

Diversos miembros de la familia del receptor de quimioquina funcionan como co-receptores con el receptor CD4 principal para permitir la entrada de diversas cepas de VIH tipo 1 dentro de las células, los co-receptores principales son CCR5 y CXCR4. El VIH-1 X4 trófico de célula T utiliza CD4 y CXCR4 para la entrada dentro de las células, mientras que el VIH R5 trófico de macrófago utiliza CD4 y CCR5. Las cepas tróficas duales pueden utilizar CXCR4 y CCR5 como co-receptores. CCR3, CCR2, CCR8, CXCR6, CXCR7, CX3CR1 entre otros receptores quimioquina pueden funcionar como co-receptores mediante el subconjunto más restringido de cepas de VIH.

SDF-1, el ligando natural de CXCR4 así como también los ligandos CCL3, CCL4, CCL4-L1, y CCL5 para CCR5 son capaces de inhibir la fusión celular y la infección mediante diversas cepas de VIH-1. Estos hallazgos han alentado el desarrollo de los receptores quimioquina que van dirigidos a los terapéuticos anti-

VIH que conduce a la aprobación de maraviroc (CELSENTRI®), un antagonista de molécula pequeña de CCR5 en combinación con otros agentes anti-VIH-1 en pacientes infectados por VIH-1 trófico CCR5. No obstante, ni se utiliza maraviroc en pacientes infectados por VIH-1 trófico dual ni en pacientes infectados por VIH-1 trófico CXCR4 (VIDAL 2009). Debido a que existe una necesidad médica clara para extender este tipo de terapia en pacientes infectados con VIH trófico dual y trófico X4 al identificar los antagonistas CXCR4 capaces de inhibir la replicación de VIH trófica X4.

El receptor de quimioquina 4 (también conocido como fusina, CD 184, LESTR o HUMSTR) existe como dos isoformas que comprende 352 o 360 aminoácidos. El residuo Asn11 se glucosila, el residuo Tyr21 se modifica mediante la adición de un grupo de sulfato y se unen el Cys 109 y 186 con un puente de disulfuro en la parte extracelular del receptor (Juarez J. et al, 2004).

Este receptor se expresa mediante diferentes tipos de tejidos normales, células T sin memoria, células nultitradas, células T reguladoras, células B, neutrófilos, células endoteliales, monocitos primarios, células dendríticas, células Asesinas Naturales, células madre hematopoyéticas CD34+ y en un bajo nivel en el corazón, colon, hígado, riñones y cerebro. El CXCR4 cumple una función principal en tráfico de leucocitos, linfopoyesis y mielopoyesis de célula B.

El ligando único del receptor CXCR4 descrito es el Factor 1 Derivado de célula Estromal (SDF-I) o CXCL12. Se secreta SDF-I en gran cantidad en el ganglio linfático, médula ósea, hígado, pulmón y en un grado extendido por los riñones, cerebro y piel. El CXCR4 también se reconoce mediante una quimioquina antagónica, la proteína II inflamatoria de macrófago vírico (vMIP-II) codificada por el virus del herpes humano tipo III.

Como se mencionó previamente, el receptor CXCR4 es el co-receptor principal para los aislados de VIH-1 trófico de célula T (virus X4). La interferencia con este receptor debe inhibir la replicación de los virus X4 en una forma muy eficiente.

Uno de los aspectos inventivos de la presente invención es la generación de anticuerpos monoclonales de ratón (Mab) que inhiben la replicación del VIH. La

invención abarca un Mab 515H7 CXCR4 (o fragmentos del mismo) capaces de unirse a los homodímeros CXCR4, y que tienen actividades fuertes contra la infección por VIH. La invención también abarca un Mab 301aE5 CXCR4 (o fragmentos del mismo) capaz de unirse a los homodímeros CXCR4, y que tienen actividades fuertes contra la infección por VIH.

De forma sorprendente, los inventores han manejado la generación de los anticuerpos monoclonales capaces de unirse al CXCR4 sino también son capaces de inducir los cambios conformacionales de los homodímeros CXCR4 y capaces de inhibir la replicación de VIH-1 X4 aislada principal en PBMC. Más particularmente, los anticuerpos de la invención también pueden ser capaces de inhibir la replicación de VIH-1 X4/R5 aislado principal en PBMC.

Preferiblemente, el compuesto CXCR4 es una de las dos isoformas CXCR4 humanas seleccionas del grupo que consiste de:

- la isoforma b del receptor 4 de quimioquina (motivo C-X-C) [Homo sapiens] que tiene la secuencia como se describe bajo el número de acceso Genbank NP 003458 SEQ ID No. 27:

```
MEGISIYTS DNYTEEMGSGDYDSMKEPCFREENANFNKIFLPTIYSIIFLTGIVGN
GLVILVMGYQKKLRSM TDKYRLHLSVADLLFVITLPFWAVDAVANWYFGNFL
CKAVHVIYTVNLYSSVLILAFISLDRYLAIVHATNSQRPRKLLAEKV VYVGWVI
PALLLTIPDFIFANVSEADDRYICDRFY PNDLWVVVFQFQHIMVGLILPGIVILSC
YCIISKLSHSGHGHQKRKALKTTVILILAFFACWLPYYIGISIDSFILLEIKQGCEFE
NTVHKWISITEALAFFHCCLNPILYAFLGAKFKTSAQHALTSVSRGSSLKILSKG
KRGGHSSVSTESESSSFHSS;
```

- la isoforma a del receptor 4 de quimioquina (motivo C-X-C) [Homo sapiens] que tiene la secuencia como se describe bajo el número de acceso Genbank NP _ 001008540 SEQ ID No. 28:

```
MSIPLPLLQIYTS DNYTEEMGSGDYDSMKEPCFREENANFNKIFLPTIYSIIFLTGI
VGNGLVILVMGYQKKLRSM TDKYRLHLSVADLLFVITLPFWAVDAVANWYFG
NFLCKAVHVIYTVNLYSSVLILAFISLDRYLAIVHATNSQRPRKLLAEKV VYVG
VWIPALLLTIPDFIFANVSEADDRYICDRFY PNDLWVVVFQFQHIMVGLILPGIVI
LSCYCIISKLSHSGHGHQKRKALKTTVILILAFFACWLPYYIGISIDSFILLEIKQGC
EFENTVHKWISITEALAFFHCCLNPILYAFLGAKFKTSAQHALTSVSRGSSLKILS
KGKRGGHSSVSTESESSSFHSS;
```

- una variante de división transcripcional alterna o una variante natural de la misma que tiene por lo menos 95 % de identidad con una de estas isoformas b o a que tienen la SEQ ID No. 27 o 28; y
- un fragmento del mismo capaz de ser reconocido específicamente por el factor 1 derivado de célula estromal de ligando natural (SDF-1) y que tiene preferiblemente por lo menos 100, 150 y 200 aminoácidos de longitud.

El CXCR2 se selecciona del grupo que consiste de:

- el receptor beta de interleuquina 8 [Homo sapiens] que tiene la secuencia como se describe bajo el número de acceso Genbank NP_ 001548 SEQ ID No. 29:

```
MEDFNMESDSFEDFWKGEDLSNYSYSTLPPFLDDAAPCEPESLEINKYFVVIY
ALVFLSLLGNSLVMLVILYSRVGRSVTDVYLLNLALADLLFALTLPWAASKV
NGWIFGTFLCKVVSLLKEVNFYSGILLACISVDRLAIVHATRLTQKRYLVKF
ICLSIWGLSLLLALPVLLFRRTVYSSNVSPACYEDMGNNTANWRMLLRJLPQSF
GFIVPLLIMLFCYGFTLRTLFAHMGQKHRAMRVIFAVVLIFLLCWLPLYNLVLL
ADTLMRTQVIQETCERRNHIDRALDATEILGILHSCLNPLIYAFIQKFRHGLLKI
LAIHGLISKDSLKDSRPSFVGSSSGHTSTTL;
```

- Una variante de división transcripcional alterna o una variante natural de la misma que tiene por lo menos 95 % de identidad con este receptor beta de interleuquina 8 que tiene la SEQ ID No. 29; y
- un fragmento de la misma capaz de ser reconocido específicamente por IL-8 y que tiene preferiblemente por lo menos 100, 150 y 200 aminoácidos de longitud.

La invención también comprende un método para seleccionar un compuesto que tiene una actividad anti-VIH o que se puede utilizar para la preparación de una composición para el tratamiento de infección por VIH, caracterizado porque dicho método comprende la etapa de:

En un primer aspecto, un objeto de la presente invención es un proceso para la generación y la selección de los anticuerpos de acuerdo con la invención.

Más particularmente, la invención se relaciona con un proceso para la selección de un anticuerpo anti CXCR4, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, capaces de inhibir la replicación de VIH que comprende las siguientes etapas:

i) detectar los anticuerpos generados y seleccionar anticuerpos capaces de unirse específicamente a CXCR4;

ii) probar los anticuerpos seleccionados de la etapa i) y seleccionar anticuerpos capaces de unirse células mononucleares de sangre periférica (PBMC),

iii) probar los anticuerpos seleccionados de la etapa ii) y seleccionar anticuerpos capaces de unirse al homodímero CXCR4, y luego

iv) probar los anticuerpos seleccionados de la etapa iii) y seleccionar anticuerpos capaces de inhibir la replicación de VIH-1 trófica X4 aislada principal en PBMC.

En otra realización, la invención se relaciona con un proceso para la selección de un anticuerpo anti CXCR4, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, capaces de inhibir la replicación de VIH que comprende las siguientes etapas:

i) detectar los anticuerpos generados y seleccionar anticuerpos capaces de unirse específicamente a CXCR4;

ii) probar los anticuerpos seleccionados de la etapa i) y seleccionar anticuerpos capaces de unir las células mononucleares de sangre periférica (PBMC),

iii) probar los anticuerpos seleccionados de la etapa ii) y seleccionar anticuerpos capaces de unirse al homodímero CXCR4, y luego

iv) probar los anticuerpos seleccionados de la etapa iii) y seleccionar anticuerpos capaces de inhibir la replicación de VIH-1 trófica X4 aislada principal en PBMC y/o capaces de inhibir la replicación de VIH-1 trófica X4/R5 aislada principal en PBMC.

La generación de los anticuerpos se puede realizar mediante cualquier método conocido por el experto en la técnica, tal como por ejemplo, fusión de una célula de mieloma con células de bazo de ratones inmunizados u otras especies

compatibles con las células de mieloma seleccionadas [Kohler & Milstein, 1975, Nature, 256:495-497]. Los animales inmunizados pueden incluir ratones transgénicos con locus de inmunoglobulina humana que luego producen directamente anticuerpos humanos. Otra realización posible puede consistir en utilizar tecnologías de exhibición de fago para detectar colecciones.

Las etapas de detección i) y ii) se puede realizar mediante cualquier método o proceso conocido por el experto en la técnica. Como ejemplos no limitativos, se pueden mencionar ELISA, BIAcore, inmunohistoquímica, análisis western blot utilizando extractos de membrana celular que expresan CXCR4 o CXCR4 purificado, análisis FACS y detecciones funcionales. Un proceso preferido consiste de una detección mediante análisis FACS en el transfectante CXCR4 (etapa 1) y en por lo menos PBMC (etapa 2) para asegurar que los anticuerpos producidos serán capaces de reconocer también la conformación del receptor CXCR4 natural en la superficie celular objetivo. Este proceso se describirá más precisamente en los siguientes ejemplos.

La etapa de detección iii) se puede realizar mediante cualquier método o proceso conocido por el experto en la técnica. Como ejemplos no limitantes pero preferidos, se pueden mencionar técnicas de western blot y/o inmuno-precipitación utilizando los anticuerpos de interés en el extracto de membrana de células transfectadas CXCR4 o PBMC.

La etapa de detección iv) se puede realizar mediante cualquier método o proceso conocido por el experto en la técnica. Como ejemplo no limitante pero preferido, se puede mencionar un proceso que consiste en la detección de anticuerpos por su capacidad de inhibir la replicación de los aislados VIH-1 principal X4 y/o VIH-1 principal X4/R5 en PBMC al utilizar un protocolo descrito por Holl et al. (J. Immunol. 2004, 173, 6274-83).

En una realización preferida de la etapa iii) de la selección del proceso de la invención, dicha etapa iii) consiste en evaluar anticuerpos mediante análisis BRET en células que expresan CXCR4-RLuc/CXCR4-YFP y seleccionar anticuerpos capaces de inhibir por lo menos 40 %, preferiblemente 45 %, 50 %, 55 % y más preferiblemente 60 % de la señal BRET. La tecnología BRET es una tecnología

conocida como representativa de la dimerización de proteína [Angers et al, PNAS, 2000, 97:3684-89].

La tecnología BRET, utilizada en la etapa iii) del proceso, es bien conocida por el experto en la técnica y se detallará en los siguientes ejemplos. Más particularmente, BRET (Transferencia de Energía de Resonancia de Bioluminiscencia) es una transferencia de energía no radiactiva que ocurre entre un donante bioluminiscente (Renilla Luciferase (Rluc)) y un receptor fluorescente, un mutante de GFP (Proteína Fluorescente Verde) o YFP (Proteína fluorescente amarilla). En el presente caso se utiliza EYFP (Proteína Fluorescente Amarilla Mejorada). La eficacia de transferencia depende de la orientación y la distancia entre el donante y el receptor. Luego, la transferencia de energía solo puede ocurrir si las dos moléculas están en proximidad cercana (1-10 nm). Esta propiedad se utiliza para generar ensayos de interacción proteína-proteína. De hecho, con el fin de estudiar la interacción entre los dos patrones, el primero se fusiona genéticamente a la Renilla Luciferasa y el segundo al mutante amarillo del GFP. Las proteínas de fusión de manera general, pero no obligatoriamente, se expresan en células de mamífero. En la presencia de su sustrato permeable a la membrana (coelenterazina), Rluc emite luz azul. Si el mutante GFP está más cerca de 10 nm del Rluc, puede ocurrir una transferencia de energía y se puede detectar una señal amarilla adicional. La señal BRET se mide como la relación entre la luz emitida por el receptor y la luz emitida por el donante. Debido a que la señal BRET aumentará cuando las dos proteínas de fusión se ponen proximidad o si un cambio conformacional acerca más al mutante Rluc y GFP.

Si el análisis BRET consiste en una realización preferida, se puede utilizar cualquier conocido por el experto en la técnica para medir los dímeros CXCR4 de cambios conformacionales. Sin limitación, se pueden mencionar las siguientes tecnologías: FRET (Transferencia de Energía de Resonancia de Fluorescencia), HTRF (Fluorescencia que resulta de Tiempo Homogéneo), FLIM (Microscopía de Formación de Imágenes de Tiempo de Vida de Fluorescencia) o espectroscopía de correlación cruzada de fluorescencia de longitud de onda única SW-FCCS).

También se pueden utilizar otras tecnologías clásicas, tal como co-inmunoprecipitación, detección Alfa, reticulación Química, Doble Híbrido, Cromatografía de Afinidad, ELISA o western blot Far.

En un aspecto particular del proceso de acuerdo con la invención, etapa iii) consiste en evaluar anticuerpos mediante análisis BRET en células que expresan CXCR4-RLuc/CXCR4-YFP y seleccionar anticuerpos capaces de inhibir por lo menos 40 %, de la señal BRET.

En un segundo aspecto, un objeto de la invención es aislar anticuerpos, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, que se obtienen mediante dicho proceso. Dichos anticuerpos o uno de sus dichos fragmentos o derivados, son capaces de unirse específicamente al CXCR4 humano, dichos anticuerpos también son capaces de inducir los cambios conformacionales de los homodímeros CXCR4.

Se conoce a partir de la literatura que los Mab CXCR4 como, por ejemplo el clon A120, son capaces de inhibir la cepa de laboratorio de entrada de VIH-1 (X4HIV-1 NL4-3) en PBMC (Tanaka R. et al, J. Virol. 2001, 75, 11534-11543). Adicionalmente, también se sabe que los Mab CXCR4 son capaces de inhibir los aislados principales X4 VIH-1 dentro de estirpes celulares que expresan CXCR4. Por el contrario, nunca se han descrito anticuerpos capaces de inhibir tales virus en su ambiente natural, es decir no solo en virus de laboratorio o estirpes celulares. No obstante, es un aspecto no obvio y novedoso de la invención que los Mab CXCR4 sean capaces de inhibir los aislados principales X4 VIH-1 en PBMC.

Las expresiones "fragmentos y derivados funcionales" se definirán en los detalles después en la presente especificación. Se puede entender aquí que la invención no se relacione con los anticuerpos en forma natural, es decir ellos no están en su ambiente natural pero que ellos son capaces de ser aislados u obtenidos mediante la purificación de las fuentes naturales, o además obtenidos mediante recombinación genética, o mediante síntesis química, y que ellos pueden entonces contener aminoácidos no naturales como se describirá adicionalmente. Más particularmente, de acuerdo con otro aspecto de la invención, se reivindican los anticuerpos aislados, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, dichos anticuerpos se caracterizan porque comprenden por lo menos una región CDR determinante de complementariedad seleccionada de los CDR que comprenden la secuencia de aminoácido SEQ ID Nos. 1 a 6 y 30 a 33 como se define mediante el sistema de numeración IMGT.

De acuerdo con un primer aspecto, la invención se relaciona con un anticuerpo aislado, o un fragmento funcional o derivado del mismo, que comprende por lo menos un CDR seleccionado entre los CDR de las secuencias SEQ ID Nos. 1 a 6, como se define de acuerdo con el sistema de numeración IMGT, o por lo menos un CDR cuya secuencia tiene por lo menos 80%, preferiblemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad después de la alineación óptima con las secuencias SEQ ID Nos. 1 a 6.

De acuerdo con un segundo aspecto, la invención se relaciona con un anticuerpo aislado, o un fragmento funcional o derivado del mismo, que comprende por lo menos un CDR seleccionado entre los CDR de las secuencias SEQ ID Nos. 1, 2 y 30 a 33, como se define de acuerdo con el sistema de numeración IMGT, o por lo menos un CDR cuya secuencia tiene por lo menos 80%, preferiblemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad después de alineación óptima con las secuencias SEQ ID Nos. 1, 2 y 30 a 33.

Un "fragmento funcional" de un anticuerpo significa en particular un fragmento de anticuerpo, tal como los fragmentos Fv, scFv (sc= cadena sencilla), Fab, F(ab')₂, Fab', scFv-Fc o diacuerpos, o cualquier fragmento cuya vida útil se ha aumentado. Tales fragmentos funcionales se describirán en detalla adelante en la presente descripción.

Un "compuesto derivado" o "derivado" de un anticuerpo significa en particular una proteína de unión compuesta de un andamio de péptido y por lo menos uno de los CDR del anticuerpo original con el fin de conservar su capacidad para reconocer el CXCR4. Tales compuestos derivados, bien conocidos para una persona experta en la técnica, se describirán adelante en más detalle en la presente descripción.

Más preferiblemente, la invención comprende los anticuerpos, sus compuestos derivados o sus fragmentos funcionales, de acuerdo con la presente invención, notablemente anticuerpos quiméricos o humanizados, obtenidos mediante recombinación genética o síntesis química.

De acuerdo con una realización preferida, el anticuerpo de acuerdo con la invención, o sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, se caracteriza porque este consiste de un anticuerpo monoclonal.

"Anticuerpo monoclonal" se entiende que significa un anticuerpo que surge de una población de anticuerpo casi homogénea. Más particularmente, los anticuerpos individuales de una población son idénticos excepto para unas pocas mutaciones que ocurren en la naturaleza posibles que se pueden encontrar en proporciones mínimas. En otras palabras, un anticuerpo monoclonal consiste de un anticuerpo homogéneo que surge del crecimiento de un clon celular único (por ejemplo un hibridoma, una célula anfitriona eucariótica transfectada con una molécula de ADN que codifica el anticuerpo homogéneo, una célula anfitriona procariótica transfectada con una molécula de ADN que codifica el anticuerpo homogéneo, etc.) y se caracteriza de manera general por las cadenas pesadas de una y solo una clase y subclase, y las cadenas ligeras de solo un tipo. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos y están dirigidos contra un antígeno único. Adicionalmente, en contraste con las preparaciones de los anticuerpos policlonales que incluyen típicamente varios anticuerpos dirigidos contra diversos determinantes, o epítomos, cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un epítomo único del antígeno.

Más particularmente, de acuerdo con una primera realización preferida de la invención, el anticuerpo, o sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, se caracteriza porque este comprende una cadena ligera que comprende por lo menos un CDR seleccionado de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, en donde:

- CDR-L1 comprende la secuencia de aminoácido SEQ ID No. 1,
- CDR-L2 comprende la secuencia de aminoácido SEQ ID No. 2,
- CDR-L3 comprende la secuencia de aminoácido SEQ ID No. 3.

De acuerdo con otra realización, los anticuerpos de la invención, o uno de sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, se caracterizan porque ellos comprenden una cadena ligera que comprende por lo menos uno de los tres CDR de las secuencias SEQ ID Nos. 1, 2 o 3, o por lo menos una secuencia con por lo menos 80%, preferiblemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad después de alineación óptima con las secuencias SEQ ID Nos. 1, 2 o 3.

El anticuerpo de la invención, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, también se caracteriza porque este comprende una cadena ligera que comprende CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, en donde CDR-L1 comprende la secuencia de aminoácido SEQ ID No. 1, CDR-L2 comprende la secuencia de aminoácido SEQ ID No. 2 y CDR-L3 comprende la secuencia de aminoácido SEQ ID No. 3.

En otra realización, el anticuerpo de la invención, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, se caracteriza porque este comprende una cadena ligera de la secuencia que comprende la secuencia de aminoácido SEQ ID No. 7, o por lo menos una secuencia con por lo menos 80%, preferiblemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad después de alineación óptima con las secuencias SEQ ID No. 7.

De acuerdo con una segunda realización preferida de la invención, el anticuerpo, o sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, se caracteriza porque este comprende una cadena ligera que comprende por lo menos un CDR seleccionado en CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, en donde:

- CDR-L1 comprende la secuencia de aminoácido SEQ ID No. 1,
- CDR-L2 comprende la secuencia de aminoácido SEQ ID No. 2,
- CDR-L3 comprende la secuencia de aminoácido SEQ ID No. 30.

De acuerdo con otra realización, los anticuerpos de la invención, o uno de sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, se caracterizan porque ellos comprenden una cadena ligera que comprende por lo menos uno de los tres CDR de las secuencias SEQ ID Nos. 1, 2 o 30, o por lo menos una secuencia con por lo menos 80%, preferiblemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad después de la alineación óptima con las secuencias SEQ ID Nos. 1, 2 o 30.

El anticuerpo de la invención, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, también se caracteriza porque este comprende una cadena ligera que comprende CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, en donde CDR-L1 comprende la secuencia de aminoácido SEQ ID No. 1, CDR-L2 comprende la secuencia de aminoácido SEQ ID No. 2 y CDR-L3 comprende la secuencia de aminoácido SEQ ID No. 30.

En otra realización, el anticuerpo de la invención, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, se caracteriza porque este comprende una cadena ligera de la secuencia que comprende la secuencia de aminoácido SEQ ID No. 34, o por lo menos una secuencia con por lo menos 80%, preferiblemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad después de alineación óptima con las secuencias SEQ ID No. 34.

Más particularmente, los anticuerpos de la invención, o uno de sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, se caracterizan porque ellos comprende una cadena pesada que comprende por lo menos un CDR seleccionado de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, en donde:

- CDR-H1 comprende la secuencia de aminoácido SEQ ID No. 4,
- CDR-H2 comprende la secuencia de aminoácido SEQ ID No. 5,
- CDR-H3 comprende la secuencia de aminoácido SEQ ID No. 6.

De acuerdo con otra realización, los anticuerpos de la invención, o uno de sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, se caracterizan porque ellos comprenden una cadena pesada que comprende por lo menos uno de los tres CDR de las secuencias SEQ ID Nos. 4, 5 o 6, o por lo menos una secuencia con por lo menos 80%, preferiblemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad después de alineación óptima con las secuencias SEQ ID Nos. 4, 5 o 6.

De acuerdo con otra realización particular, los anticuerpos, o uno de sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, se caracterizan porque ellos comprenden una cadena pesada que comprende CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, en donde CDR-H1 comprende la secuencia de aminoácido SEQ ID No. 4, CDR-H2 comprende la secuencia de aminoácido SEQ ID No. 5 y el CDR-H3 comprende la secuencia de aminoácido SEQ ID No. 6.

En otra realización, el anticuerpo de la invención, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, se caracteriza porque este comprende una cadena pesada de la secuencia que comprende la secuencia de aminoácido SEQ ID No. 8, o por lo menos una secuencia con por lo menos 80%, preferiblemente 85%,

90%, 95% y 98% de identidad después de alineación óptima con las secuencias SEQ ID No. 8.

Más particularmente, los anticuerpos de la invención, o uno de sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, se caracterizan porque ellos comprenden una cadena pesada que comprende por lo menos un CDR seleccionado de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, en donde:

- CDR-H1 comprende la secuencia de aminoácido SEQ ID No. 31,
- CDR-H2 comprende la secuencia de aminoácido SEQ ID No. 32,
- CDR-H3 comprende la secuencia de aminoácido SEQ ID No. 33.

De acuerdo con otra realización, los anticuerpos de la invención, o uno de sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, se caracterizan porque ellos comprenden una cadena pesada que comprende por lo menos uno de los tres CDR de las secuencias SEQ ID Nos. 31, 32 o 33, o por lo menos una secuencia con por lo menos 80%, preferiblemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad después de alineación óptima con las secuencias SEQ ID Nos. 31, 32 o 33.

De acuerdo con otra realización particular, los anticuerpos, o uno de sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, se caracterizan porque ellos comprenden una cadena pesada que comprende CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, en donde CDR-H1 comprende la secuencia de aminoácido SEQ ID No. 31, CDR-H2 comprende la secuencia de aminoácido SEQ ID No. 32 y el CDR-H3 comprende la secuencia de aminoácido SEQ ID No. 33.

En otra realización, el anticuerpo de la invención, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, se caracteriza porque este comprende una cadena pesada de la secuencia que comprende la secuencia de aminoácido SEQ ID No. 35, o por lo menos una secuencia con por lo menos 80%, preferiblemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad después de alineación óptima con las secuencias SEQ ID No. 35.

El anticuerpo de la invención, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, se caracteriza porque este comprende una cadena ligera que comprende CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 que comprende respectivamente la

secuencia de aminoácido SEQ ID Nos. 1, 2 y 3; y una cadena pesada que comprende CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 que comprende respectivamente la secuencia de aminoácido SEQ ID Nos. 4, 5 y 6.

Por último, el anticuerpo de la invención, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, también se pueden caracterizar porque este comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido SEQ ID No. 7 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido SEQ ID No. 8.

El anticuerpo de la invención, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, se caracteriza porque este comprende una cadena ligera que comprende CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 que comprende respectivamente la secuencia de aminoácido SEQ ID Nos. 1, 2 y 30; y una cadena pesada que comprende CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 que comprende respectivamente la secuencia de aminoácido SEQ ID Nos. 31, 32 y 33.

Por último, el anticuerpo de la invención, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, también se puede caracterizar porque este comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido SEQ ID No. 34 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido SEQ ID No. 35.

En la presente descripción, los términos "polipéptidos", "secuencias de polipéptido", "péptidos" y "proteínas adheridas a los compuestos de anticuerpo o a sus secuencias" son intercambiables.

Se puede entender aquí que la invención no se relaciona con los anticuerpos en forma natural, es decir, ellos no toman su ambiente natural pero se aíslan o se obtiene mediante la purificación de fuentes naturales o se obtienen mediante recombinación genética o síntesis química y así ellos pueden llevar aminoácidos no naturales como se describirá adelante.

En una primera realización, la región determinante de complementariedad, o CDR, significa las regiones hipervariables de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulinas como se define mediante Kabat et al. (Kabat et al., Sequences of proteins of immunological interest, 5th Ed., U.S. Department of Health and Human Services, NIH, 1991, y últimas ediciones). Existen tres CDR de cadena

pesada y tres CDR de cadena ligera. Aquí, los términos "CDR" y los "CDR" se utilizan para indicar, dependiendo del caso, una o más, o aún todas, las regiones que contienen la mayoría de los residuos de aminoácido responsables de la afinidad de unión del anticuerpo para el antígeno o epítipo que este reconoce.

En una segunda realización, mediante las regiones CDR o CDR, esto está destinado a indicar las regiones hipervariables de las cadenas pesada y ligera de las inmunoglobulinas como se define mediante IMGT.

La numeración única IMGT se ha definido para comparar los dominios variables de cualquier receptor de antígeno, el tipo de cadena, o las especies [Lefranc M. -P., *Immunology Today* 18, 509 (1997) / Lefranc M.-P., *The Immunologist*, 7, 132-136 (1999) / Lefranc, M.-P., Pommie, C, Ruiz, M., Giudicelli, V., Foulquier, E., Truong, L., Thouvenin-Contet, V. y Lefranc, Dev. Comp. Immunol, 27, 55-77 (2003)]. En la numeración única IMGT, los aminoácidos conservados siempre tienen la misma posición, por ejemplo cisteína 23 (1er-CYS), triptofan 41 (CONSERVADO-TRP), aminoácido hidrófobo 89, cisteína 104 (2do-CYS), fenilalanina o triptofan 118 (J-PHE o J-TRP). La numeración única IMGT proporciona una delimitación estandarizada de las regiones de estructura principal (FR1-IMGT: posiciones 1 a 26, FR2-IMGT: 39 a 55, FR3-IMGT: 66 a 104 y FR4-IMGT: 118 a 128) y de las regiones determinantes de complementariedad: CDR1-IMGT: 27 a 38, CDR2-IMGT: 56 a 65 y CDR3-IMGT: 105 a 117. Cuando los espacios representan posiciones no ocupadas, las longitudes CDR-IMGT (mostradas entre paréntesis y separadas por puntos, por ejemplo [8.8.13]) llegan a ser información crucial. La numeración única IMGT se utiliza en representaciones gráficas en 2D, designadas como IMGT Colliers de Perles [Ruiz, M. and Lefranc, M.-P., *Immunogenetics*, 53, 857-883 (2002) / Kaas, Q. y Lefranc, M.-P., *Current Bioinformatics*, 2, 21-30 (2007)], y en estructuras en 3D en IMGT/estructura 3D-DB [Kaas, Q., Ruiz, M. and Lefranc, M.-P., *T cell receptor and MHC structural data. Nucl. Acids. Res.*, 32, D208-D210 (2004)].

Existen tres CDR de cadena pesada y 3 CDR de cadena ligera. El término CDR o los CDR se utiliza aquí con el fin de indicar, de acuerdo con el caso, una de estas regiones o varias, o aún completo, de estas regiones que contienen la mayoría de los residuos de aminoácido responsables para la unión mediante afinidad del anticuerpo para el antígeno o el epítipo que este reconoce.

Para más claridad, se puede entender que en la siguiente descripción, y más particularmente en las tablas 2 y 3, los CDR se definirán mediante el sistema de numeración IMGT y mediante el sistema de numeración de Kabat.

El sistema de numeración IMGT define los CDR de acuerdo con el sistema IMGT como se definió anteriormente mientras que el sistema de numeración Kabat define los CDR de acuerdo con el sistema Kabat como se definió anteriormente.

Más particularmente, con relación al anticuerpo denominado como 515H7, CDR-L1 consiste de SEQ ID No. 1 en el sistema de numeración IMGT y de la SEQ ID No. 9 en el sistema de numeración Kabat. Con relación al CDR-L2, esto consiste de la SEQ ID No. 2 en el sistema de numeración IMGT y de la SEQ ID No. 10 en el sistema de numeración Kabat. El CDR-L3 consiste de la SEQ ID No. 3 para cada uno de los dos sistemas de numeración. Para la cadena pesada, el CDR-H1 consiste de la SEQ ID No. 4 en el sistema de numeración IMGT y de la SEQ ID No. 11 en el sistema de numeración kabat. El CDR-H2 consiste de la SEQ ID No. 5 en el sistema de numeración IMGTs y de la SEQ ID No. 12 en el sistema de numeración kabat. Por último, el CDR-H3 consiste en la SEQ ID No. 6 en el sistema de numeración IMGT mientras que este consiste de la SEQ ID No. 13 en el sistema de numeración kabat.

Luego, con relación al anticuerpo denominado como 301aE5, CDR-L1 consiste de la SEQ ID No. 1 en el sistema de numeración IMGT y de la SEQ ID No. 9 en el sistema de numeración kabat. Con relación al CDR-L2, este consiste de la SEQ ID No. 2 en el sistema de numeración IMGT y de la SEQ ID No. 36 en el sistema de numeración kabat. El CDR-L3 consiste de la SEQ ID No. 30 en el sistema de numeración IMGTs y de la SEQ ID No. 37 en el sistema de numeración kabat. Para la cadena pesada, el CDR-H1 consiste de la SEQ ID No. 31 en el sistema de numeración IMGT y de la SEQ ID No. 38 en el sistema de numeración kabat. El CDR-H2 consiste de la SEQ ID No. 32 en el sistema de numeración IMGTs y de la SEQ ID No. 39 en el sistema de numeración kabat. Por último, el CDR-H3 consiste en la SEQ ID No. 33 en el sistema de numeración IMGT mientras que este consiste de la SEQ ID No. 40 en el sistema de numeración kabat.

En el sentido de la presente invención, el "porcentaje de identidad" entre las dos secuencias de los ácidos nucleicos o aminoácidos significa el porcentaje de nucleótidos idénticos o residuos de aminoácido entre las dos secuencias que se van a comparar, obtenidas después de alineación óptima, este porcentaje es puramente estadístico y las diferencias entre las dos secuencias se distribuyen aleatoriamente a lo largo de su longitud. La comparación de las dos secuencia de aminoácido o ácido nucleico se lleva a cabo tradicionalmente al comparar las secuencias después que se han alineado óptimamente, dicha comparación es capaz de ser conducida mediante el segmento o al utilizar una "ventana de alineación". Se puede llevar a cabo la alineación óptima de las secuencias para comparación, además de comparación manual, por medio del algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1981) [Ad. App. Math. 2:482], por medio del algoritmo de homología local de Neddleman y Wunsch (1970) [J. Mol. Biol. 48:443], por medio del método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman (1988) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444] o por medio del software de procesador utilizando estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Paquete de Software Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI, o mediante el software de comparación BLAST NR o BLAST P).

El porcentaje de identidad entre las dos secuencias de ácido nucleico o aminoácido se determina al comparar las dos secuencias óptimamente alienadas en las que la secuencia de ácido nucleico o de aminoácido para comparar pueden tener adiciones o eliminaciones comparadas con la secuencia de referencia para alineación óptima entre las dos secuencias. El porcentaje de identidad se calcula al determinar el número de posiciones en las que el nucleótido o residuo de aminoácido es idéntico entre las dos secuencias, preferiblemente entre las dos secuencias completas, dividiendo el número de posiciones idénticas mediante el número total de posiciones en la ventana de alineación y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad entre las dos secuencias.

Por ejemplo, el programa BLAST, "secuencias BLAST 2" (Tatusova et al, "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", FEMS Microbiol, 1999, Lett. 174:247-250) disponible en el sitio <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>, se puede utilizar con los parámetros predeterminados (notablemente para los parámetros "penalidad de espacio

abierto": 5, y "penalidad de extensión de espacio": 2; la matriz seleccionada es por ejemplo la matriz "BLOSUM 62" propuesta por el programa); el porcentaje de identidad entre las dos secuencias para comparar se calcula directamente mediante el programa.

Para la secuencia de aminoácido que exhibe por lo menos 80%, preferiblemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad con una secuencia de aminoácido de referencia, ejemplos preferidos incluyen aquellos que contienen la secuencia de referencia, ciertas modificaciones, notablemente una eliminación, adición o sustitución de por lo menos un aminoácido, truncación o extensión. En el caso de la sustitución de uno o más aminoácidos consecutivos o no consecutivos, se prefieren sustituciones en las que los aminoácidos sustituidos se reemplazan por los aminoácidos "equivalentes". Aquí, la expresión "aminoácidos equivalentes" significa que indica cualesquier aminoácidos que se sustituyen probablemente por uno de los aminoácidos estructurales sin modificar sin embargo las actividades biológicas de los anticuerpos correspondientes y de aquellos de los ejemplos específicos definidos adelante.

Se pueden determinar aminoácidos equivalentes en su homología estructural con los aminoácidos para los que ellos se sustituyen o en los resultados de las pruebas comparativas de la actividad biológica entre los varios anticuerpos que probablemente se generen. Como un ejemplo no limitante, la tabla 1 adelante resume las posibles sustituciones que se pueden llevar a cabo probablemente sin resultar en una modificación significativa de la actividad biológica del anticuerpo modificado correspondiente; las sustituciones inversas son posibles naturalmente bajo las mismas condiciones.

Tabla 1

Residuo Original	Sustituciones
Ala (A)	Val, Gly, Pro
Arg (R)	Lys, His
Asn (N)	Gln
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (G)	Asp
Gly (G)	Ala
His (H)	Arg
Ile (I)	Leu
Leu (L)	Ile, Val, Met
Lys (K)	Arg
Met (M)	Leu
Phe (F)	Tyr
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr, Cys
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Phe, Trp
Val (V)	Leu, Ala

En una realización específica, la presente invención se relaciona con anticuerpos de murino, o compuestos derivados o los fragmentos funcionales de los mismos.

Como se vio anteriormente, la invención también se relaciona con cualquier compuesto derivado de los anticuerpos como se describe en la invención.

Más particularmente, un anticuerpo de la invención, o sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, se caracteriza porque dicho compuesto derivado consiste de una proteína de unión que comprende un andamio de péptido en el que se injerta por lo menos un CDR en tal forma para conservar todo o parte de las propiedades reconocimiento de paratope del anticuerpo inicial.

También se pueden presentar una o más secuencias entre las secuencias de CDR descritas en la presente invención en los varios andamios de proteína de inmunoglobulina. En este caso, la secuencia de proteína hace posible recrear un esqueleto de péptido favorable en el plegamiento de los CDR injertados, que les permite conservar sus propiedades de reconocimiento de antígeno paratope.

De manera general, un experto en la técnica sabe cómo determinar el tipo de andamio de proteína en el que se injerta por lo menos uno de los CDR que

surgen del anticuerpo original. Más particularmente, se sabe que seleccionar tales andamios pueden cumplir con el mayor número de criterios como sigue (Skerra A., J. Mol. Recogn., 2000, 13:167-187):

- buena conservación filogenética;
- la estructura tridimensional conocida (como, por ejemplo, mediante cristalografía, espectroscopía de RMN o cualquier otra técnica conocida por un experto en la técnica);
- tamaño pequeño;
- pocas o sin modificaciones post-transcripcionales; y/o
- fácil de producir, expresar y purificar.

El origen de tales andamios de proteína puede ser, pero no se limita a, las estructuras seleccionadas entre: fibronectina y preferiblemente el dominio 10 de fibronectina tipo III, lipocalina, anticalina (Skerra A., J. Biotechnol., 2001, 74(4):257-75), proteína Z que surge del dominio B de la proteína A de *Staphylococcus aureus*, tioredoxina A o proteínas con un motivo repetido tal como la "repetición anquirina" (Kohl et al., PNAS, 2003, vol. 100, No. 4, 1700-1705), la "repetición armadillo", la "repetición rica en leucina" y la "repetición tetratricopéptido".

Andamios derivados de las toxinas tal como, por ejemplo, toxinas de escorpiones, insectos, plantas, moluscos, etc., y también se deben mencionar los inhibidores de proteína de la sintasa neuronal NO (PIN).

Un ejemplo, sin vía de limitación, de tales construcciones de híbrido, es la inserción del CDR-H1 (cadena pesada) de un anticuerpo anti-CD4, a saber 13B8.2, en uno de los bucles en el PIN, la nueva proteína de unión así obtenida que conserva las mismas propiedades de unión como el anticuerpo original (Bes et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 2006, 343(1), 334-344). Sobre una base puramente ilustrativa, también se puede mencionar el injerto del CDR-H3 (cadena pesada) de un anticuerpo de VIH anti-lisozima en uno de los bucles de neocarzinostatina (Nicaise et al., Protein Science, 2004, 13(7):1882-1891).

Finalmente, como se describió anteriormente, tal andamios de péptido puede comprender por lo menos uno de los CDR que surgen del anticuerpo

original. Preferiblemente, pero no es un requerimiento, una persona experta en la técnica seleccionará por lo menos un CDR de la cadena pesada, el último se conoce que principalmente responsable para la especificidad del anticuerpo. La selección de uno o más CDR relevantes es obvia para una persona experta en la técnica, quien luego seleccionará las técnicas conocidas adecuadas (Bes et al, FEBS letters 508, 2001, 67-74).

Un aspecto específico de la presente invención se relaciona con un método para seleccionar un compuesto derivado de un anticuerpo de acuerdo con la invención, dicho compuesto derivado es capaz de inhibir in vitro y/o in vivo la entrada de células de VIH y dicho compuesto derivado que comprende un andamios de péptido en el que se injerta por lo menos un anticuerpo CDR, caracterizado porque este comprende las siguientes etapas:

a) La colocación en contacto in vitro de un compuesto que se compone de un andamios de péptido en el que se injerta por lo menos un anticuerpo CDR con una muestra biológica que contiene VIH tipo 1 y PBMC; y

b) la selección de dicho compuesto si dicho compuesto es capaz de inhibir la replicación de VIH-1, y caracterizado porque dicho por lo menos un CDR injertado se selecciona entre los siguientes CDR de la secuencia SEQ ID No. 1 a 6 y 30 a 33 o una secuencia con por lo menos 80%, preferiblemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad después de alineación óptima con la secuencia SEQ ID Nos. 1 a 6 y 30 a 33.

De acuerdo con un modo preferido, el método puede incluir en la etapa a) la colocación en contacto in vitro de un compuesto que comprende un andamio de péptido en el que se injerta por lo menos dos o tres CDR de anticuerpo.

De acuerdo con un modo aún más preferido de este método, el andamio de péptido se selecciona entre los andamios o proteínas de unión cuyas estructuras se mencionaron anteriormente.

Obviamente, estos ejemplos no están en forma limitante, y cualquier otra estructura conocida u obvia para una persona experta en la técnica se debe

considerar que se cubre mediante la protección conferida por la presente solicitud de patente.

La presente invención así se relaciona con un anticuerpo, o sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, caracterizado porque los andamios de péptido se selecciona entre las proteínas que son a) filogenéticamente bien conservadas, b) de arquitectura robusta, c) con una organización molecular en 3-D bien conocida, d) de tamaño pequeño y/o e) que comprende las regiones que se pueden modificar mediante inserción y/o eliminación sin modificar las propiedades de estabilidad.

De acuerdo con una realización preferida, el anticuerpo de la invención, o sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, se caracteriza porque dicho andamio péptido se selecciona entre i) andamios que surgen de fibronectina, preferiblemente el dominio de fibronectina tipo 3 10, lipocalina, anticalina, proteína Z que surge del dominio B de la proteína A de *Staphylococcus aureus*, tioredoxina A o proteínas con un motivo repetido tal como la "repetición anquirina" (Kohl et al, PNAS, 2003, vol. 100, No. 4, 1700-1705), la "repetición armadillo", la "repetición rica en leucina" y la "repetición de tetratricopéptido" o iii) inhibidores de proteína de sintasa neuronal NO (PIN).

Otro aspecto de la invención se relaciona con los fragmentos funcionales del anticuerpo descrito anteriormente.

Más particularmente, la invención objetiva un anticuerpo, o sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, caracterizado porque dicho fragmento funcional se selecciona entre los fragmentos Fv, Fab, (Fab')₂, Fab', scFv, scFv-Fc y diacuerpos, o cualquier fragmento cuya vida útil se ha aumentado tal como los fragmentos PEGilados.

Tales fragmentos funcionales del anticuerpo de acuerdo con la invención consisten, por ejemplo, de los fragmentos Fv, scFv (sc= cadena sencilla), Fab, F(ab')₂, Fab', scFv-Fc o diacuerpos, o cualquier fragmento cuya vida útil se ha aumentado mediante modificación química, tal como la adición de polialquilenglicol tal como polietilenglicol (PEGilación) (los fragmentos PEGilados se denominan como Fv-PEG, scFv-PEG, Fab-PEG, F(ab')₂-PEG y Fab'-PEG), o mediante la

incorporación en una liposoma, microesferas o PLGA, dichos fragmentos poseen por lo menos uno de los CDR característicos de la invención que es notablemente capaz de ejercer una actividad de manera general, aún parcial, del anticuerpo del que este surge.

Preferiblemente, dichos fragmentos funcionales comprenderá o incluirá una secuencia parcial de la cadena ligera o pesada variable del anticuerpo del que ellos se derivan, dicha secuencia parcial es suficiente para retener la misma especificidad de unión como el anticuerpo del cual surge y suficiente afinidad, preferiblemente por lo menos igual a 1/100, más preferiblemente por lo menos 1/10 de aquellos del anticuerpo del cual este surge.

Tal fragmento funcional contendrá por lo menos cinco aminoácidos, preferiblemente 6, 7, 8, 10, 15, 25, 50 o 100 aminoácidos consecutivos de la secuencia del anticuerpo del que este surge.

Preferiblemente, estos fragmentos funcionales serán de los tipos Fv, scFv, Fab, F(ab')₂, F(ab'), scFv-Fc o diacuerpos, que tienen de manera general la misma especificidad de unión como el anticuerpo del cual ellos resultan. De acuerdo con la presente invención, los fragmentos del anticuerpo de la invención se pueden obtener de los anticuerpos descritos anteriormente por métodos tales como digestión de enzima, que incluyen pepsina o papaína, y/o mediante división de los puentes de disulfuro mediante reducción química. Los fragmentos de anticuerpo también se pueden obtener mediante técnicas genéticas recombinantes también conocidas por una persona experta en la técnica o mediante síntesis de péptido por medio, por ejemplo, de sintetizadores de péptido automáticos tal como aquellos vendidos por Applied BioSystems, etc. Para más claridad, la tabla 2 adelante resume las varias secuencias de aminoácido que corresponden a los anticuerpos de la invención.

Tabla 2 (en donde Mu. = murino)

Anticuerpo	Numeración CDR	Cadena pesada	Cadena Ligera	SEQ ID NO.
515H7	IMGT		CDR-L1	1
			CDR-L2	2
			CDR-L3	3
		CDR-H1		4
		CDR-H2		5
		CDR-H3		6
	Kabat		CDR-L1	9
			CDR-L2	10
			CDR-L3	3
		CDR-H1		11
		CDR-H2		12
		CDR-H3		13
			dominio variable Mu.	7
301aE5	IMGT		CDR-L1	1
			CDR-L2	2
			CDR-L3	30
		CDR-H1		31
		CDR-H2		32
		CDR-H3		33
	Kabat		CDR-L1	9
			CDR-L2	36
			CDR-L3	37
		CDR-H1		38
		CDR-H2		39
		CDR-H3		40
			dominio variable Mu.	34
		dominio variable Mu.		35

Un aspecto adicional importante particular de los anticuerpos objeto de la presente invención es que ellos no exhiben funciones efectoras, tal como citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) y/o citotoxicidad dependiente de complemento (CDC).

Más particularmente, como un ejemplo, los anticuerpos de la invención, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, no tienen afinidad para el FcγR (I, II o III) o para el C1q, o para ambos.

Estructuralmente, esto significa para la persona experta en la técnica que los anticuerpos de la invención, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, se evitan de la porción Fc o su porción Fc no presenta una glucosilación correcta capaz de conferir las funciones efectoras.

Las consecuencias de esto es que los anticuerpos de la invención se seleccionan preferiblemente de los isotipos IgG4 o IgG2, más preferiblemente IgG4.

De forma similar, los fragmentos preferidos son fragmentos que se evitan de ADCC tal como Fv, scFv (sc para cadena sencilla), Fab, F(ab')₂, Fab', los fragmentos scFv-Fc o diacuerpos, o cualquier fragmento de los cuales el tiempo de vida útil se habría aumentado por modificación química, tal como la adición de polo (alquilen) glicol tal como poli (etilen) glicol ("PEGilación") (fragmentos pegilados llamados Fv-PEG, scFv-PEG, Fab-PEG, F(ab')₂-PEG o Fab'-PEG) ("PEG" para Poli(Etilen) Glicol), o mediante la incorporación en una liposoma.

Más particularmente, un fragmento funcional preferido de la invención derivado del anticuerpo 515H7 es un scFv, denominado aquí adelante como fragmento scFv-Ck 515H7, comprende la secuencia de aminoácido SEQ ID No. 54

La secuencia de nucleótido que corresponde a dicho scFv comprende la secuencia SEQ ID No. 55.

Otro aspecto específico de la presente invención se relaciona con anticuerpos quiméricos, o sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, caracterizado porque dichos anticuerpos también comprenden las regiones constantes de cadena pesada y de cadena ligera derivadas de un anticuerpo de una especie heteróloga con el ratón, notablemente el hombre.

Todavía otro aspecto específico de la presente invención se relaciona con anticuerpos humanizados, o sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, caracterizado porque las regiones constantes de la cadena ligera y la cadena pesada derivada de un anticuerpo humano son, respectivamente, la región lambda o kappa y la región gama-2 o preferiblemente gama-4.

El anticuerpo de la invención también comprende anticuerpos humanizados o quiméricos.

Un anticuerpo quimérico es uno que contiene una región variable natural (cadena ligera y cadena pesada) derivada de un anticuerpo de una especie dada en combinación con regiones constantes de la cadena ligera y la cadena pesada de un anticuerpo de una especie heteróloga a dicha especie dada.

Los anticuerpos, o fragmentos quiméricos de los mismos, se pueden preparar al utilizar las técnicas de genéticas recombinantes. Por ejemplo, el anticuerpo quimérico se puede producir al clonar el ADN recombinante que contiene un promotor y una secuencia que codifica la región variable de un anticuerpo monoclonal no humano de la invención, notablemente murino, y una secuencia que codifica una región constante de anticuerpo humana. Un anticuerpo quimérico de acuerdo con la invención codificado por tal gen recombinante puede ser, por ejemplo, una quimera de ratón-humano, la especificidad de este anticuerpo se determina mediante la región variable derivada del ADN de murino y su isotipo determinado por la región constante derivada del ADN humano. Con referencia a Verhoeyn et al. (BioEssays, 8:74, 1988) para métodos para preparar anticuerpos quiméricos.

La tabla 3 aquí resumen las secuencias de aminoácidos de las diversas cadenas pesada y ligera del anticuerpo quimérico 515H7 (denominado como c515H7 o C515H7) de acuerdo con la invención.

Tabla 3 (en donde c = quimérico)

Anticuerpo c515H7	Cadena pesada	Cadena ligera	SEQ ID NO.
Secuencias completas (sin el péptido de señal)	cVH (G4wt)	-	56
	cVH (G4PRO)	-	57
	cVH (G2 wt)	-	58
	-	cVL-Ck	59

La secuencia de nucleótido que corresponde a dichas cadenas pesada del Anticuerpo c515H7 SEQ ID Nos. 56 a 58 y cadena ligera SEQ ID No. 59 corresponde respectivamente a las secuencias SEQ ID Nos. 60 a 63 (cadena pesada) y SEQ ID No. 64 (cadena ligera).

En una realización preferida, las secuencias de cadena pesada se eliminan de su residuo lisina de terminal C (como se encuentra en el vector original pConPlus serie de Lonza: pConPlusy4ΔK, pConPlusy4PROΔK & pConPlusy2ΔK).

Más aún, la cadena pesada G4PRO corresponde a un isotipo humano IgG4 que lleva una mutación en la región Bisagra para evitar la formación de la mitad de los anticuerpos. Esta mutación se encuentra en el pConPlusy4PROΔK parental de

Lonza [Angal S, King DJ, Bodmer MW, Turner A, Lawson AD, Roberts G, Pedley B, Adair JR. Una sustitución de aminoácido única abole la heterogeneidad del anticuerpo quimérico de ratón/humano (IgG4). Mol Immunol. (1993); 30(1): 105-108].

Más particularmente, la invención se relaciona con una cadena pesada de anticuerpo quimérico caracterizado porque este comprende los CDR homólogos a los CDR correspondientes de un anticuerpo derivado de una especie de mamífero diferente, en donde dichos CDR, de acuerdo con IMGT, consisten de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 que comprenden respectivamente las secuencias SEQ ID Nos. 4, 5 y 6.

Más particularmente, la invención se relaciona con una cadena ligera de anticuerpo quimérico caracterizado porque este comprende los CDR homólogos a los CDR correspondientes de un anticuerpo derivado de una especie diferente de mamífero, en donde dichos CDR, de acuerdo con IMGT, consisten de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 que comprende respectivamente las secuencias SEQ ID Nos. 1, 2 y 3.

Más particularmente, la invención se relaciona con un anticuerpo quimérico, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, caracterizado porque este comprende las cadenas pesada y ligera cada una tiene los CDR homólogos a los CDR correspondientes de un anticuerpo derivado de una especie diferente de mamífero, en donde dichos CDR, de acuerdo con IMGT, consisten de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de la cadena pesada que comprende respectivamente las secuencias SEQ ID Nos. 4, 5 y 6, y CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de la cadena ligera que comprende respectivamente las secuencias SEQ ID Nos. 1, 2 y 3.

En otra realización, la invención se relaciona con un anticuerpo quimérico, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, que comprende una región variable de cadena pesada de la secuencia que consiste de SEQ ID No. 8, y una región variable de cadena ligera de la secuencia SEQ ID No. 7.

En todavía otra realización, la invención se relaciona con un anticuerpo quimérico, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, que comprende una cadena pesada de la secuencia seleccionada del grupo que

consiste de la SEQ ID Nos. 56, 57 o 58, y una cadena ligera de la secuencia de la SEQ ID No. 59.

En una realización preferida, el anticuerpo quimérico c515H7 VH(G4wt)/VL-Ck, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, de acuerdo con la invención comprende una región variable de cadena pesada de la secuencia SEQ ID No. 56, y una región variable de cadena ligera de la secuencia SEQ ID No. 59.

En una realización preferida, el anticuerpo quimérico c515H7 VH(G4PRO)/VL-Ck, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, de acuerdo con la invención comprende una región variable de cadena pesada de la secuencia SEQ ID No. 57, y una región variable de cadena ligera de la secuencia SEQ ID No. 59.

En una realización preferida, el anticuerpo quimérico c515H7 VH(G2wt)/VL-Ck, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, de acuerdo con la invención comprende una región variable de cadena pesada de la secuencia SEQ ID No. 58, y una región variable de cadena ligera de la secuencia SEQ ID No. 59.

"Anticuerpos humanizados" significa un anticuerpo que contiene las regiones CDR derivadas de un anticuerpo de origen no humano, las otras partes de la molécula de anticuerpo se derivan de un (o varios) anticuerpos humanos. Adicionalmente, algunos de los residuos de segmento de esqueleto (llamado FR) se pueden modificar para conservar la afinidad de unión (Jones et al., Nature, 321:522-525, 1986; Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536, 1988; Riechmann et al., Nature, 332:323-327, 1988).

Los anticuerpos humanizados de la invención o fragmentos de los mismos se pueden preparar mediante técnicas conocidas por una persona experta en la técnica (tal como, por ejemplo, aquellos descritos en los documentos Singer et al., J. Immun., 150:2844-2857, 1992; Mountain et al., Biotechnol. Genet. Eng. Rev., 10:1-142, 1992; y Bebbington et al., Bio/Technology, 10:169-175, 1992). Tales anticuerpos humanizados se prefieren para su uso en métodos que involucran los diagnósticos in vitro o el tratamiento preventivo y/o terapéutico in vivo. Otras técnicas de humanización, también conocidas por una persona experta en la técnica, tal como, por ejemplo, la técnica "injerto de CDR" descrita por PDL en las

patentes EP 0 451 261, EP 0 682 040, EP 0 939 127, EP 0 566 647 o US 5,530,101, US 6,180,370, US 5,585,089 y US 5,693,761. También se pueden citar las patentes US 5,639,641 o 6,054,297, 5,886,152 y 5,877,293.

Adicionalmente, la invención también se relaciona con anticuerpos humanizados que surgen del anticuerpo de murino descrito anteriormente.

De una forma preferida, las regiones constantes de la cadena ligera y la cadena pesada derivadas de un anticuerpo humano son, respectivamente, la región lambda o kappa y la región gama-2 o preferiblemente gama-4.

Más particularmente, la invención se relaciona con una cadena pesada de anticuerpo humanizado caracterizado porque este comprende i) una región de estructura homóloga a la región de estructura principal correspondiente de una cadena pesada de anticuerpo humano, y ii) los homólogos de CDR a los CDR correspondientes de un anticuerpo derivado de una especie de mamífero diferente, en donde dichos CDR, de acuerdo con IMGT, consiste de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 que comprende respectivamente las secuencias SEQ ID Nos. 4, 5 y 6.

En otra realización, la invención se relaciona con una cadena pesada de anticuerpo humanizado que comprende una región variable de la secuencia que consiste de la SEQ ID No. 64.

En todavía otra realización, la invención se relaciona con una cadena pesada de anticuerpo humanizado que comprende la secuencia completa seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID Nos. 67, 68 y 69.

Más particularmente, la invención se relaciona con una cadena ligera de anticuerpo humanizado caracterizado porque este comprende i) una región de estructura principal homóloga a la región de estructura principal correspondiente de una cadena ligera de anticuerpo humano, y ii) los CDR homólogos a los CDR correspondientes de un anticuerpo derivado de una especie de mamífero diferente, en donde dichos CDR, de acuerdo con IMGT, consisten de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 que comprende respectivamente las secuencias SEQ ID Nos. 1, 2 y 3.

En otra realización, la invención se relaciona con una cadena ligera de anticuerpo humanizado que comprende una región variable de la secuencia seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID Nos. 65, 66, 82 o 83.

En todavía otra realización, la invención se relaciona con una cadena ligera de anticuerpo humanizado que comprende la secuencia completa seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID Nos. 70, 71, 84 o 85.

Más particularmente, la invención se relaciona con un anticuerpo humanizado, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, caracterizado porque este comprende las cadenas ligera y pesada cada una tiene i) regiones de estructura principales homólogas a la región de estructura principal correspondientes de un anticuerpo humano, y ii) los CDR homólogos a los CDR correspondientes de un anticuerpo derivado de una especie de mamífero diferente, en donde dichos CDR, de acuerdo con IMGT, consisten de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de la cadena pesada que comprende respectivamente las secuencias SEQ ID Nos. 4, 5 y 6, y CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de la cadena ligera que comprende respectivamente las secuencias SEQ ID Nos. 1, 2 y 3.

En otra realización, la invención se relaciona con un anticuerpo humanizado, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, que comprende una región variable de cadena pesada de la secuencia que consiste de la SEQ ID No. 64, y una región variable de cadena ligera de la secuencia seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID Nos. 65, 66, 82 o 83.

En todavía otra realización, la invención se relaciona con un anticuerpo humanizado, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, que comprende una cadena pesada de la secuencia seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID Nos. 67, 68 o 69, y una cadena ligera de la secuencia seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID Nos. 70, 71, 84 o 85.

En una realización preferida, el anticuerpo humanizado Hz515H7 VIH D76N (G4wt)/VL2-Ck, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, de acuerdo con la invención comprende una cadena pesada de la secuencia SEQ ID No. 67, y una cadena ligera de la secuencia SEQ ID No. 70.

En otra realización preferida, el anticuerpo humanizado Hz515H7 VIH D76N (G4PRO)/VL2-Ck, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, de acuerdo con la invención comprende una cadena pesada de la secuencia SEQ ID No. 68, y una cadena ligera de la secuencia SEQ ID No. 70. En otra realización preferida, el anticuerpo humanizado Hz515H7 VIH D76N (G2wt) / VL2-Ck, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, de acuerdo con la invención comprende una cadena pesada de la secuencia SEQ ID No. 69, y una cadena ligera de la secuencia SEQ ID No. 70.

En otra realización preferida, el anticuerpo humanizado Hz515H7 VIH D76N (G4wt) VL2.1-Ck, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, de acuerdo con la invención comprende una cadena pesada de la secuencia SEQ ID No. 67, y una cadena ligera de la secuencia SEQ ID No. 71.

En otra realización preferida, el anticuerpo humanizado Hz515H7 VIH D76N (G4PRO)/VL2.1-Ck, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, de acuerdo con la invención comprende una cadena pesada de la secuencia SEQ ID No. 68, y una cadena ligera de la secuencia SEQ ID No. 71.

En otra realización preferida, el anticuerpo humanizado Hz515H7 VIH D76N (G2wt)/VL2.1-Ck, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, de acuerdo con la invención comprende una cadena pesada de la secuencia SEQ ID No. 69, y una cadena ligera de la secuencia SEQ ID No. 71.

En otra realización preferida, el anticuerpo humanizado Hz515H7 VIH I D76N (G4wt)/VL2.2-Ck, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, de acuerdo con la invención comprende una cadena pesada de la secuencia SEQ ID No. 67, y una cadena ligera de la secuencia SEQ ID No. 84.

En otra realización preferida, el anticuerpo humanizado Hz515H7 VIH D76N (G4PRO)/VL2.2-Ck, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, de acuerdo con la invención comprende una cadena pesada de la secuencia SEQ ID No. 68, y una cadena ligera de la secuencia SEQ ID No. 84.

En otra realización preferida, el anticuerpo humanizado Hz515H7 VIH D76N (G2wt)/VL2.2-Ck, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, de acuerdo con la invención comprende una cadena pesada de la secuencia SEQ ID No. 69, y una cadena ligera de la secuencia SEQ ID No. 84.

En otra realización preferida, el anticuerpo humanizado Hz515H7 VIH D76N (G4wt)/VL2.3-Ck, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, de acuerdo con la invención comprende una cadena pesada de la secuencia SEQ ID No. 67, y una cadena ligera de la secuencia SEQ ID No. 85.

En otra realización preferida, el anticuerpo humanizado Hz515H7 VIH D76N (G4PRO)/VL2.3-Ck, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, de acuerdo con la invención comprende una cadena pesada de la secuencia SEQ ID No. 68, y una cadena ligera de la secuencia SEQ ID No. 85.

En otra realización preferida, el anticuerpo humanizado Hz515H7 VIH D76N (G2wt)/VL2.3-Ck, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, de acuerdo con la invención comprende una cadena pesada de la secuencia SEQ ID No. 69, y una cadena ligera de la secuencia SEQ ID No. 85.

La tabla 4 aquí resume las secuencias de aminoácido de los diversas dominios variables de las cadenas pesada y ligera (o completo), respectivamente, del anticuerpo humanizado 515H7 de acuerdo con la invención.

Tabla 4 (en donde Hz = humanizado)

Anticuerpo Hz515H7	Cadena pesada	Cadena ligera	SEQ ID NO.
Dominios variables	VH1 D76N	-	64
	-	VL2	65
	-	VL2.1	66
	-	VL2.2	82
	-	VL2.3	83
Secuencias completas (sin el péptido de señal)	VH1 D76N (G4wt)	-	67
	VH1 D76N (G4PRO)	-	68
	VH1 D76N (G2 wt)	-	69
	-	VL2-Ck	70
	-	VL2.1-Ck	71
	-	VL2.2-Ck	84
	-	VL2.3-Ck	85

En una realización preferida, las secuencias de cadena pesada se eliminan de su residuo de lisina de terminal C (como se encuentra en el vector original pConPlus serie de Lonza: pConPlusy4ΔK, pConPlusy4PROΔK & pConPlusy2ΔK).

Más aún, la cadena pesada G4PRO corresponde a un isotipo IgG4 humano que lleva una mutación en la región Bisagra para evitar la formación de la mitad de los anticuerpos. Esta mutación se encuentra en el pConPlusy4PROΔK parental de Lonza [Angal S, King DJ, Bodmer MW, Turner A, Lawson AD, Roberts G, Pedley B, Adair JR. Una sustitución única de aminoácido abole la heterogeneidad del anticuerpo quimérico de ratón/humano (IgG4). Mol Immunol. (1993);30(1): 105-108].

Como un ejemplo, para evitar dudas, la expresión "VIH" es similar a las expresiones "Variante 1 de VH", "variante VH 1", "Var 1 VH " o "VH var 1).

Cabe entender que las combinaciones VH / VL ejemplificadas anteriormente no son limitativas. La persona experta en la técnica por supuesto puede, sin costos excesivos y sin aplicar la experticia de la invención, redistribuir todo el VH y VL descrito en la presente especificación.

Un aspecto novedoso de la presente invención se relaciona con un ácido nucleico aislado caracterizado porque este se selecciona entre los siguientes ácidos nucleicos (que incluyen cualquier código genético degenerado):

a) un ácido nucleico, ADN o ARN, que codifica un anticuerpo, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, de acuerdo con la invención;

b) un ácido nucleico que comprende una secuencia de ADN seleccionada del grupo de las secuencias que consisten de SEQ ID Nos. 14 a 19 y 41 a 45;

c) un ácido nucleico que comprende una secuencia de ADN seleccionada del grupo de las secuencias que consisten de las SEQ ID Nos. 20, 21, 46 y 47;

d) los ácidos nucleicos de ARN correspondientes de los ácidos nucleicos como se define en b) o c);

e) los ácidos nucleicos complementarios de los ácidos nucleicos como se define en a), b) y c); y

f) un ácido nucleico de por lo menos 18 nucleótidos capaz de hibridar bajo condiciones de alta exigencia con por lo menos uno de los CDR de la secuencia SEQ ID Nos. 14 a 19 y 41 a 45.

La Tabla 5 adelante resume las diversas secuencias de nucleótido que se relacionan con los anticuerpos de la invención.

Tabla 5 (en donde Mu. = murino)

Anticuerpo	Numeración CDR	Cadena pesada	Cadena ligera	SEQ ID NO.
5J5H7	IMGT		CDR-L1	14
			CDR-L2	15
			CDR-L3	16
		CDR-H1		17
		CDR-H2		18
		CDR-H3		19
	Kabat		CDR-L1	22
			CDR-L2	23
			CDR-L3	16
		CDR-H1		24
		CDR-H2		25
		CDR-H3		26
301aE5	IMGT		dominio variable Mu.	20
		dominio variable Mu.		21
			CDR-L1	41
			CDR-L2	15
			CDR-L3	42
		CDR-H1		43
	Kabat	CDR-H2		44
		CDR-H3		45
			CDR-L1	48
			CDR-L2	49
			CDR-L3	50
	IMGT	CDR-H1		51
		CDR-H2		52
		CDR-H3		53
			dominio variable Mu.	46
		dominio variable Mu.		47

Los términos "ácido nucleico", "secuencia nucleica", "secuencia de ácido nucleico", "polinucleótido", "oligonucleótido", "secuencia de polinucleótido" y "secuencia de nucleótido", se utilizan intercambiabilmente en la presente descripción, significa una secuencia precisa de nucleótidos, modificada o no, que define un fragmento o una región de un ácido nucleico, que contiene nucleótidos

no naturales o no, y es un ADN de doble hebra, un ADN de hebra sencilla o productos de transcripción de dichos ADN.

También se debe incluir aquí que la presente invención no se relaciona con las secuencias de nucleótido en su ambiente cromosómico natural, es decir, en un estado natural. Las secuencias de la presente invención se han aislado y/o purificado, es decir, ellas se muestrean directamente o indirectamente, por ejemplo mediante una copia, su ambiente se ha modificado por lo menos parcialmente. Los ácidos nucleicos aislados obtenidos mediante genéticas recombinantes, por medio, por ejemplo, de células anfitrionas, u obtenidos mediante síntesis química también se debe mencionar aquí.

"Las secuencias nucleicas que exhiben un porcentaje de identidad de por lo menos 80%, preferiblemente 85%, 90%, 95% y 98%, después de alineación óptima con una secuencia preferida" significa secuencias nucleicas que exhiben, con respecto a la secuencia nucleica de referencia, ciertas modificaciones tal como, en particular, una eliminación, una truncación, una extensión, una fusión quimérica y/o una sustitución, notablemente puntual. Preferiblemente, estas son secuencias que codifican las mismas secuencias de aminoácido como la secuencia de referencia, esto se relaciona con la degeneración del código genético, o las secuencias de complementariedad que probablemente hibridan específicamente con las secuencias de referencia, preferiblemente bajo condiciones altamente exigentes, notablemente aquellas definidas adelante.

La hibridación bajo condiciones altamente exigentes significa que las condiciones relacionadas con temperatura y resistencia iónica se seleccionan en tal forma que permite que se mantenga la hibridación entre los dos fragmentos de ADN de complementariedad. Sobre una base puramente ilustrativa, las condiciones altamente exigentes de la etapa de hibridación para el propósito de definir los fragmentos de polinucleótido descritos anteriormente son ventajosamente como sigue.

La hibridación de ADN-ADN o ADN-ARN se lleva a cabo en dos etapas: (1) prehibridación a 42° C durante tres horas en regulador de fosfato (20 mM, pH 7.5) que contiene 5X SSC (1X SSC que corresponde a una solución de 0.15 M NaCl + 0.015 M citrato de sodio), 50% de formamida, 7% de dodecil sulfato de sodio

(SDS), 10X de Denhardt, 5% de sulfato de dextrano y 1% de ADN de esperma de salmón; (2) hibridación principal durante 20 horas en una temperatura dependiendo de la longitud de la sonda (es decir: 42° C para una sonda >100 nucleótidos en longitud) seguido por dos lavados de 20 minutos a 200C en 2X SSC + 2% de SDS, un lavado de 20 minutos a 200C en 0.1X SSC + 0.1% de SDS. El último lavado se lleva a cabo en 0.1X SSC + 0.1% de SDS durante 30 minutos a 60° C para una sonda >100 nucleótidos en longitud. Las condiciones de hibridación altamente exigentes descritas anteriormente para un polinucleótido de tamaño definido se puede adaptar por una persona experta en la técnica para oligonucleótidos más largos o más cortos, de acuerdo con los procedimientos descritos en Sambrook, et al. (Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory; 3ra edición, 2001).

La invención también abarca una molécula de ácido nucleico aislado caracterizado porque este se selecciona entre los siguientes ácidos nucleicos:

a) un ácido nucleico, ADN o ARN, que codifica una cadena pesada de anticuerpo humanizado, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, de acuerdo con la invención;

b) un ácido nucleico, ADN o ARN, que codifica una cadena ligera de anticuerpo humanizado o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, de acuerdo con la invención;

c) un ácido nucleico, ADN o ARN, que codifica un anticuerpo humanizado, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, de acuerdo con la invención;

d) un ácido nucleico complementario con un ácido nucleico como se define en a), b) o c);

e) un ácido nucleico de por lo menos 18 nucleótidos capaz de hibridar bajo condiciones altamente exigentes con por lo menos una cadena pesada que comprende las secuencias de ácido nucleico SEQ ID No. 72 o 75 a 77;

f) un ácido nucleico de por lo menos 18 nucleótidos capaz de hibridar bajo condiciones altamente exigentes con por lo menos una cadena ligera que comprende las secuencias de ácido nucleico SEQ ID No. 73, 74, 86, 87 o 78, 79, 88, 89.

La tabla 6 adelante resume las secuencias de nucleótido de los diversos dominios variables de las cadenas pesada y ligera y de longitud completa (o completo), respectivamente, del anticuerpo humanizado 515H7 de acuerdo con la invención.

Tabla 6 (en donde Hz = humanizado)

Anticuerpo Hz515H7	Cadena pesada	Cadena ligera	SEQ ID NO.
Dominios Variables	VH1 D76N	-	72
	-	VL2	73
	-	VL2.1	74
	-	VL2.2	86
	-	VL2.3	87
Secuencias completas (sin el péptido de señal)	VH1 D76N (G4wt)	-	75
	VH1 D76N (G4PRO)	-	76
	VH1 D76N (G2 wt)	-	77
	-	VL2-Ck	78
	-	VL2.1-Ck	79
	-	VL2.2-Ck	88
	-	VL2.3-Ck	89

La tabla 7 aquí resume las secuencias de nucleótido de las diversas cadenas pesada y ligera del anticuerpo quimérico 515H7 de acuerdo con la invención.

Tabla 7 (en donde c = quimérico)

Anticuerpo c515H7	Cadena pesada	Cadena ligera	SEQ ID NO.
Secuencias completas (sin el péptido de señal)	cVH (G4wt)	-	60
	cVH (G4PRO)	-	61
	cVH (G2 wt)	-	62
	-	cVL-Ck	63

En otras palabras, la invención trata con un ácido nucleico aislado, caracterizado porque este se selecciona con los siguientes ácidos nucleicos:

a) un ácido nucleico, ADN o ARN, que codifica un anticuerpo, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, de acuerdo con la invención;

b) un ácido nucleico que comprende una secuencia de ADN seleccionada del grupo de las secuencias de los CDR que consiste de las SEQ ID Nos. 14 a 19 y 41 a 45;

c) un ácido nucleico que comprende una secuencia de ADN seleccionada del grupo de las secuencias de los dominios variables pesado y ligero que consiste de la SEQ ID Nos. 20, 21, 46, 47, 72, 73, 74, 86 y 87;

d) un ácido nucleico que comprende una secuencia de ADN seleccionada del grupo de las secuencias de las cadena pesada y ligera que consiste de la SEQ ID Nos. 60 a 63, 75 a 79, 88 y 89;

e) un ácido nucleico que comprende una secuencia de ADN que consiste de la SEQ ID No. 55;

f) los ácidos nucleicos de ARN correspondientes de los ácidos nucleicos como se define en b), c), d) o e);

g) los ácidos nucleicos complementarios de los ácidos nucleicos como se define en a), b), c), d) y e); y

h) un ácido nucleico de por lo menos 18 nucleótidos capaz de hibridar bajo condiciones de alta exigencia con por lo menos uno de los CDR de la secuencia SEQ ID Nos. 14 a 19 y 41 a 45.

La invención también se relaciona con un vector que comprende un ácido nucleico como se describe en la invención.

La invención objetiva notablemente la clonación y/o los vectores de expresión que contienen tal una secuencia de nucleótido.

Los vectores de la invención preferiblemente contienen elementos que permiten la expresión y/o la secreción de las secuencias de nucleótido en una

célula anfitriona dada. El vector así puede contener un promotor, iniciación de traducción y señales de terminación, así como también regiones de regulación de transcripción adecuadas. Este puede ser capaz de mantenerse en una forma estable en la célula anfitriona y puede tener opcionalmente señales específicas que secretan específicamente la proteína traducida. Estos varios elementos se seleccionan y se optimizan por una persona experta en la técnica de acuerdo con la célula anfitriona utilizada. Para este propósito, se pueden insertar secuencias de nucleótido en vectores de auto-replicación dentro del anfitrión seleccionado o ser vectores integradores del anfitrión seleccionado.

Tales vectores se preparan mediante los métodos típicamente utilizados por una persona experta en la técnica y se pueden introducir los clones resultantes dentro de un anfitrión adecuado mediante métodos estándar tal como lipofección, electroporación, choque por calor o métodos químicos. Los vectores son, por ejemplo, vectores de origen de plásmido o vírico. Ellos se utilizan para transformar las células anfitrionas con el fin de clonar o expresar las secuencias de nucleótido de la invención.

La invención también comprende células anfitrionas transformadas por o que comprenden un vector como se describe en la presente invención.

La célula anfitriona se puede seleccionar entre sistemas procarióticos o eucarióticos tal como células bacterianas, por ejemplo, pero también células de levadura o células de animal, notablemente células de mamífero. También se pueden utilizar células de planta o insecto.

La invención también se relaciona con animales, diferentes al hombre, que tienen una célula transformada de acuerdo con la invención.

Otro aspecto de la invención se relaciona con un método para la producción de un anticuerpo de acuerdo con la invención, o uno de sus fragmentos funcionales, caracterizado porque dicho método comprende las siguientes etapas:

a) el cultivo en un medio de y las condiciones de cultivo adecuadas para una célula anfitriona de acuerdo con la invención; y

b) la recuperación de dicho anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, producidos así desde el medio de cultivo o de dichas células cultivadas.

Las células transformadas de acuerdo con la invención son de uso en métodos para la preparación de polipéptidos recombinantes de acuerdo con la invención. Los métodos para la preparación del polipéptido de acuerdo con la invención en forma recombinante, caracterizado porque dichos métodos utilizan un vector y/o una célula transformada por un vector de acuerdo con la invención, también están comprendidos en la presente invención. Preferiblemente, una célula transformada por un vector de acuerdo con la invención se cultiva bajo condiciones que permite la expresión del polipéptido mencionado anteriormente y la recuperación de dicho péptido recombinante.

Como ya se mencionó, la célula anfitriona se puede seleccionar entre sistemas procarióticos o eucarióticos. En particular, es posible identificar las secuencias de nucleótido de la invención que facilitan la secreción en tal sistema procariótico o eucariótico. Un vector de acuerdo con la invención que lleva tal secuencia así se puede utilizar ventajosamente para la producción de las proteínas recombinantes que se van a secretar. De hecho, la purificación de estas proteínas recombinantes de interés se facilitará por el hecho que ellas están presentes en el sobrenadante del cultivo celular a diferencia de las células anfitrionas.

Los polipéptidos de la invención también se pueden preparar mediante síntesis química. Un tal método de preparación también es un objeto de la invención. Una persona experta en la técnica conoce métodos para la síntesis química, tal como técnicas de fase sólida (ver notablemente Steward et al., 1984, Solid phase peptides synthesis, Pierce Chem. Company, Rockford, 111, 2nd ed.) o las técnicas de fase sólida parcial, mediante la condensación de los fragmentos o mediante síntesis convencional en la solución. Los polipéptidos obtenidos mediante síntesis química y capaces de contener los aminoácidos no naturales correspondientes también están comprendidos en la invención.

Los anticuerpos, o los compuestos derivados o los fragmentos funcionales de los mismos, que se van a obtener probablemente por el método de la invención también están comprendidos en la presente invención.

De acuerdo con todavía otro aspecto, la presente invención se relaciona con anticuerpos como se describió anteriormente, caracterizado porque ellos son, adicionalmente, capaces de unirse específicamente a un receptor de la familia de quimioquina humana y/o capaz de inhibir específicamente la replicación de VIH trófica X4.

De acuerdo con todavía otro aspecto, la presente invención se relaciona con anticuerpos como se describió anteriormente, caracterizado porque ellos son, adicionalmente, capaces de unirse específicamente a un receptor de la familia de quimioquina humana y/o capaz de inhibir específicamente la replicación de VIH trófica X4/R5.

De acuerdo con una realización novedosa, la invención se relaciona con anticuerpos, o sus compuestos derivados o fragmentos funcionales, que consisten del anticuerpo que son biespecíficos en el sentido que ellos comprenden un segundo motivo capaz de interactuar con cualquier receptor implicado en la célula de entrada a VIH, tal como, por ejemplo, CCR5, CD4, CXCR4 (diferente al anticuerpo de la presente invención, es decir objetivar otro epítipo) o CCR3, CCR2, CCR8, CXCR6, CXCR7, CX3CR1.

Los anticuerpos bifuncionales o biespecíficos constituyen una segunda generación de anticuerpos monoclonales en los que dos regiones variables diferentes se combinan en la misma molécula (Hollinger and Bohlen, 1999, Cancer and metastasis, rev. 18:411-419). Su utilidad se demuestra en los dominios diagnóstico y terapéutico con relación a su capacidad de objetivar varias moléculas sobre la superficie de las células; se pueden obtener tales anticuerpos mediante métodos químicos (Glennie MJ et al., 1987, J. Immunol. 139, 2367-2375; Repp R. et al., 1995, J. Hemat., 377-382) o métodos somáticos (Staerz U.D. y Bevan M.J., 1986, PNAS 83, 1453-1457; Suresh M.R. et al., 1986, Method Enzymol, 121:210-228) pero también, preferiblemente, mediante técnicas de ingeniería genética que hacen posible forzar la heterodimerización y así facilita la

purificación del anticuerpo buscado (Merchand et al., 1998, Nature Biotech., 16:677-681).

Estos anticuerpos biespecíficos se pueden constituir como IgG completo, Fab'2 biespecífico, Fab 'PEG, diacuerpos o scFv biespecífico, pero también como un anticuerpo biespecífico tetravalente en el que están presentes dos sitios de unión para cada antígeno objetivado (Park et al, 2000, Mol. Immunol, 37(18): 1123-30) o los fragmentos de los mismos descritos anteriormente.

Además de una ventaja económica dada que la producción y administración de un anticuerpo biespecífico es más barata que la producción de dos anticuerpos específicos, el uso de tales anticuerpos biespecíficos tiene la ventaja de reducir la toxicidad del tratamiento. De hecho, el uso de un anticuerpo biespecífico hace posible reducir la cantidad general de los anticuerpos circulantes y, posteriormente, la posible toxicidad.

En una realización preferida de la invención, los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos bivalentes o tetravalentes.

Finalmente, la presente invención se relaciona con los anticuerpos descritos anteriormente, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, como un medicamento.

La invención también se relaciona con una composición farmacéutica que comprende como un ingrediente activo un compuesto que consiste de un anticuerpo de la invención, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales. Preferiblemente, dicho anticuerpo se complementa mediante un excipiente y/o un portador farmacéuticamente aceptable.

La invención también se relaciona con la composición como se describió anteriormente como un medicamento.

En un aspecto particular de la invención, el anticuerpo, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, inhibe la replicación aislada principal de KON VIH-1 en PBMC con un IC₉₀ de por lo menos 5 µg/ml, preferiblemente por lo menos 10 µg/ml.

La presente invención también comprende el uso de un anticuerpo o la composición de acuerdo con la invención para la preparación de un fármaco y/o medicamento para la prevención o el tratamiento de infección por VIH.

Más particularmente, como un ejemplo no limitante, dicha infección por VIH es una infección por VIH trófica X4.

En otra realización, como un ejemplo no limitante, dicha infección por VIH es una infección por VIH trófica X4/R5.

La presente invención también se relaciona con el uso de un anticuerpo, o un fragmento funcional o derivado del mismo, preferiblemente humanizado, y/o de una composición de acuerdo con la invención para la preparación de un fármaco para inhibir la replicación del VIH. De manera general, la presente invención se relaciona con el uso de un anticuerpo, o un fragmento funcional o derivado del mismo, preferiblemente humanizado, y/o de una composición, para la preparación de un fármaco para la prevención o tratamiento de la enfermedad de VIH.

En la presente descripción, "vehículo farmacéutico" significa un compuesto, o una combinación de compuestos, que entran en una composición farmacéutica que no provoca reacciones secundarias y que, por ejemplo, facilita la administración de los compuestos activos, aumenta su duración de vida y/o efectividad en el organismo, aumenta su solubilidad en la solución o mejora su almacenamiento. Tales portadores farmacéuticos son bien conocidos y se adaptarán por una persona experta en la técnica de acuerdo con la naturaleza y la ruta de administración de los compuestos activos seleccionados.

Preferiblemente, se administrarán tales compuestos mediante la ruta sistémica, notablemente mediante ruta intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, intravaginal u oral. Más preferiblemente, la composición compuesta del anticuerpo de acuerdo con la invención se administrará en diversas dosis igualmente separadas durante el tiempo.

Sus rutas de administración, esquemas de dosificación y formas galénicas óptimas se pueden determinar de acuerdo con los criterios tomados generalmente

en cuenta cuando se establece un tratamiento adecuado para un paciente tal como, por ejemplo, la edad o peso corporal del paciente, la seriedad de su estado general, su tolerancia para el tratamiento y los efectos colaterales experimentados.

La invención también se relaciona con una composición que comprende, adicionalmente, como un producto de combinación para uso en una forma simultánea, separada o extendida, un anticuerpo anti-VIH o un anticuerpo de entrada de células anti-VIH o un anticuerpo de replicación anti-VIH diferente al un anticuerpo dirigido contra CXCR4.

De acuerdo con todavía otra realización, la presente invención también se relaciona con una composición farmacéutica como se describió anteriormente que comprende por lo menos un segundo compuesto anti-VIH seleccionado entre los compuestos capaces de inhibir específicamente la entrada de VIH y/o la replicación tal como anti-CCR5, los compuestos anti-CD4 y los compuestos anti-CXCR4 diferentes a aquellos descritos en esta invención, o cualquier otro compuesto anti-VIH conocido por una persona experta en la técnica.

Otra realización complementaria a la invención consiste de una composición como se describió anteriormente comprendida, adicionalmente, como un producto de combinación o de conjugación para uso simultáneo, separado o extendido, un compuesto anti-VIH.

"Uso simultáneo" significa la administración de ambos compuestos de la composición comprendidos en una forma de dosificación única.

"Uso separado" significa la administración, al mismo tiempo, de ambos compuestos de la composición, comprendidos en formas de dosificación distintas.

"Uso extendido" significa la administración sucesiva de ambos compuestos de la composición, cada uno comprendido en una forma de dosificación distinta.

De manera general, la composición de acuerdo con la invención aumenta considerablemente la efectividad del tratamiento de VIH. En otras palabras, el efecto terapéutico del anticuerpo de la invención se mejora en una forma inesperada mediante la administración de un agente anti-VIH. Otra ventaja

posterior principal producida por una composición de la invención se relaciona con la posibilidad de utilizar dosis efectivas inferiores del ingrediente activo, haciendo así posible evitar o reducir los riesgos de la aparición de efectos colaterales, en particular el efecto del agente anti-VIH. Más aún, esta composición hace posible lograr el efecto terapéutico deseado más rápidamente.

"Agente anti-VIH terapéutico" significa una sustancia que, cuando se administra a un paciente, trata o evita la replicación del VIH en el paciente. Ejemplos no limitantes de tales agentes incluyen "fármacos antiretrovíricos tales como inhibidores de proteasa de VIH (PI), inhibidores de transcriptasa inversa de nucleósido/nucleótido de VIH (NRTI/NtRTI) inhibidores de transcriptasa inversa de VIH sin nucleósido (NNRTI), inhibidores de entrada de VIH, inhibidores de integrasa de VIH".

Tales agentes, por ejemplo, se citan en VIDAL, en las páginas dedicadas a los compuestos relacionados con los "compuestos anti-VIH"; los anticuerpos anti-VIH citados por referencia para este documento se citan aquí como agentes anti-VIH preferidos no limitantes.

El inhibidor de proteasa de VIH se refiere a cualquier sustancia que puede inhibir la actividad de proteasa de VIH. Ejemplos de tales inhibidores de proteasa de VIH incluyen, pero no se limitan a mesilato Saquinavir o SQV (Invirase®), Indinavir o IDV (Crixivan®), Ritonavir o RTV (Norvir®), Nelfinavir o NFV (Viracept®), Amprenavir (Agenerase®, Prozei®), Lopinavir/ritonavir o LPV/r (Kaletra®, Aluvia®), Atazanavir o ATV (Reyataz®, Zrivada®), Fosamprenavir o FPV (Lexiva®, Telzir®), Tipranavir o TPV (Aptivus®), Darunavir o DRV (Prezista®), Nucleosida de VIH o inhibidor de transcriptasa inversa de nucleótido (NRTI) se refiere a una sustancia que es una nucleosida o análogo de nucleótido que bloquea la transcripción inversa del ARN de VIH. Ejemplos de NRTI incluyen, pero no se limitan a Zidovudina o AZT5ZDV (Retrovir/combivir/trixivir®), Didanosina o ddi (Videx®), Zalcitabina (HIVID®), Stavudina o d4T (Zerit®), Lamivudina o 3TC (Epivir/combivir/epzicom/trixivir®), Abacavir o ABC (Ziagen/trixivir/epzicom®), disoproxil fumarato Tenofovir o TDF (Viread/atrilpa/truvada®), Emtricitabina o FTC (Emtriva/atrilpa/truvada®).

Inhibidor de transcriptasa inversa de VIH sin nucleosida (NNRTI) se refiere a una sustancia que no es una nucleosida o análogo de nucleótido que bloquea la transcripción inversa del ARN de VIH. Ejemplos de NNRTI incluyen, pero no se limitan a Nevirapina o NVP (Viramune®), Efavirenz o EFV (Sustiva/atrilpa®, Stocrin®), Delavirdina o DLV (Rescriptor®) y Etravirina o ETR (Intelence®).

El inhibidor de entrada de VIH se refiere a una sustancia que bloquea la entrada de células de VIH. Ejemplos de inhibidores de entrada de VIH incluyen, pero no se limitan a Enfuvirtida o T20 (Fuzeon®), Maraviroc o MVC (Celsentri®, Celzentry®).

El inhibidor de integrasa de VIH se refiere a una sustancia que inhibe la actividad de integrasa de VIH. Ejemplo del inhibidor integrasa incluye, pero no se limita a Raltegravir o RAL (Isentress®).

Tales agentes, por ejemplo, también son compuestos que pertenecen a las mismas clases de fármacos descritas en VIDAL, que están actualmente en ensayos clínicos tal como pero no limitado a Vicriviroc, PRO 140, TNX-355, AMD070, Racivir, Apricitabina, Elvucitabina, Flosalvudina, Rilpivirina, Elvitegravir.

Tales agentes, por ejemplo, también son compuestos que pertenecen a otras clases potenciales de fármacos tal como pero no limitado a inhibidores de maduración (Bevirimat), análogos de glicosida de β -galactosil-ceramida, agentes de unión a carbohidrato, inhibidores RNasaH, inhibidores de expresión de gen de VIH, estimuladores de la liberación de VIH de células T latentes (ácido valproico ...).

En una realización particularmente preferida, dicha composición de la invención como un producto de combinación se caracteriza porque dicho agente anti-VIH se une químicamente a dicho anticuerpo para uso simultáneamente.

Con el fin de facilitar la unión entre dicho agente anti-VIH y el anticuerpo de acuerdo con la invención, las moléculas espaciadoras se pueden introducir entre los dos compuestos para unión, tal como el poli(alquilen)glicol polietilenglicol o los aminoácidos; o, en otra realización, se pueden utilizar dichos derivados activos de los agentes anti-VIH, en los que se han introducido funciones capaces de

reaccionar con dicho anticuerpo. Estas técnicas de unión son bien conocidas por una persona experta en la técnica y no se discutirán en más detalle en la presente descripción.

También preferiblemente, dicho anticuerpo de la invención que formad dicho conjugado se selecciona entre sus fragmentos funcionales, notablemente fragmentos que han perdido su componente Fc, tal como los fragmentos scFv.

La invención también se relaciona con una composición como un producto de combinación o con un conjugado de fármaco anti-CXCR4 Mab/anti-VIH, de acuerdo con la invención, utilizado como fármaco.

Preferiblemente, dicha composición como un producto de combinación o dicho conjugado se complementará mediante un excipiente y/o un vehículo farmacéutico.

Así, la invención se relaciona con el uso de un anticuerpo, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, para la preparación de un fármaco para el objetivo específico de un compuesto que es biológicamente activo hacia la replicación del VIH.

Como se demostró previamente, los Mabs 515H7 y 301aE5 CXCR4 tienen actividades fuertes contra la replicación del VIH-1 en PBMC, ya que tales anticuerpos se pueden utilizar en ensayos de detección para la identificación de agentes antivíricos del antagonista CXCR4 para tratar infección por VIH-1. En la primera etapa de estos ensayos, las células que expresan CXCR4 se incuban con Mabs 515H7 y/o 301aE5 y luego se pueden evaluar las moléculas por su potencial para inhibir la unión de los Mabs 515H7 y/o 301aE5. Las células utilizadas en este tipo de ensayos pueden ser estirpes celulares transfectadas tal como estirpes celulares humanas transfectadas CHO-CXCR4, NIH3T3-CXCR4 o CXCR4 tal como U373-MAGI-CXCR4, estirpes celulares humanas que expresan CXCR4 tal como NALM6 o células primarias tal como PBMC. El método utilizado para detectar los antagonistas de CXCR4 que inhibe la unión de los Mabs 515H7 y/o 301aE5 en células que expresan CXCR4 puede ser Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima competitivo basado en célula Assay (ELISA) como se describe por Zhao Q. et al. (AIDS Research and Human Retroviruses, 2003, 19, pp947-955) o

protocolos utilizando clasificación de célula Activada por Fluorescencia (FACS) tal como se describe por Juarez J. et al. (Leukemia 2003, 17, ppl294-1300).

Así, en un aspecto particular de la invención, se considera un proceso para la detección y/o la identificación de moléculas como agentes antivíricos del antagonista CXCR4 que comprende las etapas de:

- a) seleccionar células que expresan CXCR4,
- b) incubar dichas células con un anticuerpo, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, de la invención, y
- c) evaluar las moléculas probadas por su inhibición potencial de la unión entre el anticuerpo, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, a CXCR4, y
- d) seleccionar moléculas capaces de dicha inhibición.

En otra realización particular, se puede agregar la siguiente etapa e):

- e) probar estas moléculas en un ensayo de replicación de VIH-1.

Otras características y ventajas de la invención aparecen adicionalmente en la descripción con los ejemplos y figuras cuyas leyendas se presentan adelante.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Las Figuras 1A y 1B muestran la estrategia de activación para la expresión CXCR4 en monocitos y linfocitos.

Figura 1A: tñido de célula T con el anticuerpo CD3-PE.

Figure 1B: tñido de monocitos con el anticuerpo CD 14-PE.

Las Figuras 2 A y 2B muestran la unión de los MAb anti-CXCR4 515H7 y 301aE5 en monocitos y linfocitos T.

Las Figuras 3 A y 3B muestran la modulación del dímero del receptor CXCR4 mediante los Mab 515H7 y 301aE5 SDF-I y anti-CXCR4, respectivamente,

por medio de un método de transferencia de energía de resonancia de bioluminiscencia (BRET) en células HEK293.

Las Figuras 4A y 4B y la Figura 5 muestran la capacidad de anti-CXCR4 Mab 515H7 y 301aE5 para inhibir la replicación del KON aislado de VIH-1 (virus X4) en PBMC humano.

Las Figuras 6 A, 6B y 6C muestran la inhibición de la liberación de calcio inducida por SDF-1 en células CHO-CXCR4 mediante los Mab 515H7 (figura 6A), 301aE5 (figura 6B) y c515H7 (figura 6C).

Las Figuras 7 y 8 muestran la capacidad de los Mab 515H7, c515H7 y 301aE5 anti-CXCR4 para inhibir la replicación de MN aislada principal del virus VIH-1 X4 (figura 7) y 92UG024 (figura 8) en el PBMC humano.

La Figura 9 muestra la capacidad de los Mab 515H7, c515H7 y 301aE5 anti-CXCR4 para inhibir la replicación KON, MN y 92UGO24 de aislados primarios del virus VIH-1 X4 en el PBMC humano.

Las Figuras 10 y 11 muestran la capacidad de los Mab 515H7, c515H7 y 301aE5 anti-CXCR4 para inhibir la replicación 89.6 aislada principal del virus VIH-1 X4/R5 dual en el PBMC humano.

La Figura 12 muestra el efecto benéfico de combinar Mab c515H7 con Maraviroc para inhibir la replicación 89.6 del aislado principal de VIH-1 (virus dual X4/R5) en el PBMC humano.

La Figura 13 muestra el efecto benéfico de combinar Mab c515H7 con Maraviroc para inhibir la replicación UG93067 de aislado principal de VIH-1 (virus dual X4/R5) en el PBMC humano.

La Figura 14 muestra la capacidad de los Mab 515H7, c515H7 y 301aE5 anti-CXCR4 para inhibir la replicación KON aislada principal del virus de VIH-1 X4 en PBMC.

La Figura 15 ilustra la especificidad de unión del Mab c515H7 mediante análisis FACS.

La Figura 16 ilustra el efecto del Mab c515H7 en el homodímero CXCR4, mediante el método de transferencia de energía de resonancia de bioluminiscencia (BRET).

La Figura 17: Secuencias de aminoácido alineadas del dominio variable de cadena pesada 515H7 con la línea germinal humana IGHV3-49*04 y IGHJ4*01. La secuencia de aminoácido 515H7 VH se alinea con las secuencias de estructura principal de receptor humano seleccionado. Las secuencias VH Var1 (VH1) corresponden a las variantes humanizadas de los dominios 515H7 VH. La retro mutación única en la posición 76 se describe en negrilla.

La Figura 18: Alineación de las secuencias de aminoácido de la cadena ligera 515H7 con la línea germinal humana IGKV4-I*01 y IGKJ 1*01. La secuencia de aminoácido 515H7 VL se alinea con las secuencias de estructura principal de receptor humano seleccionadas. Las secuencias VL Var2.1, Var2.2 y Var2.3 corresponden a las variantes humanizadas implementadas del 515H7 VL Var2 humanizado, con los residuos mutados en negrilla. Var2.1 y Var2.2 lleva 4 residuos más humanizados mientras que el Var2.3 contiene 5 residuos más humanos.

La Figura 19: Bloqueo cruzado del anticuerpo de murino biotinilado 515H7 mediante las variantes quiméricas 515H7 y diferentes variantes del 515H7 humanizado. La actividad de las variantes humanizadas de 515H7 (hz515H7) para bloquear en forma cruzada el anticuerpo de murino parental 515H7 se evalúa mediante citometría de flujo utilizando las células NIH3T3 transfectadas CXCR4. La actividad de las variantes humanizadas se compara con el 515H7 quimérico. La actividad de bloqueo cruzado de la variante VIH combinada con el VL quimérico (cVL) es muy similar a aquel del quimérico (A). No se determina la reducción en la actividad de la variante 1 VH 1 (VH1, la variante sin retro mutaciones) cuando se combina con la variante 2 de VL (B).

La Figura 20: Inhibición de la unión de SDF-1 biotinilado mediante el 515H7 quimérico y diferentes variantes del 515H7 humanizado. La capacidad de la

variante humanizada de 515H7 (hz515H7) para inhibir la unión de SDF-1 se evalúa mediante citometría de flujo utilizando la estirpe celular RAMOS. La capacidad de inhibición de las variantes humanizadas se compara con el 515H7 quimérico. La variante humanizada hz515H7 VIH D76N VL2 tiene una capacidad similar para inhibir la unión de SDF-1 como el anticuerpo quimérico. El fragmento del anticuerpo humanizado hz515 VIH VL2 es completamente activo en inhibir la unión de las células SDF-1 a RAMOS.

La Figura 21 muestra la unión específica de los Mab humanizados 515H7 (hz515H7 VIH D76N VL2, hz515H7 VIH D76N VL2.1, hz515H7 VIH D76N VL2.2 y hz515H7 VIH D76N VL2.3) a CXCR4 en NIH3T3-CXCR4.

La Figura 22 muestra el efecto de los Mab humanizados 515H7 (hz515H7 VIH D76N VL2, hz515H7 VIH D76N VL2.1, hz515H7 VIH D76N VL2.2 y hz515H7 VIH D76N VL2.3) en el homodímero CXCR4, mediante el método de transferencia de energía de resonancia de bioluminiscencia (BRET).

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Generación de anticuerpos monoclonales (Mab) contra el CXCR4 humano

Para generar los anticuerpos monoclonales a CXCR4, se inmunizan ratones Balb/c con células recombinantes NIH3T3-CXCR4 y/o los péptidos que corresponden un terminal N extracelular CXCR4 y los bucles. Se inmunizan ratones de 6-16 semanas de edad una vez con el antígeno en adyuvante de Freund completo subcutáneamente (s.c.) seguido por 2 a 6 inmunizaciones con el antígeno en adyuvante de Freund incompleto s.c. Se supervisa la respuesta inmune mediante sangrados retroorbitales. El suero se detecta mediante ELISA (como se describe adelante) y se utilizan ratones con los títulos mayores de anticuerpos anti-CXCR4 para fusiones. Los ratones se refuerzan intravenosamente con los antígenos dos días antes de sacrificio y se retira el bazo.

- ELISA

Para seleccionar los ratones que producen anticuerpos anti-CXCR4, se prueba el suero de ratones inmunizados mediante ELISA. En resumen, se cubren las placas de microtítulo con el péptido de terminal N [1-41] conjugado con BSA en 5 µg de péptido equivalente/mL, se incuban 100 µL/pozo a 4° C durante la noche, luego se bloquean con 250 µL/pozo de 0.5% de gelatina en PBS. Las diluciones de plasma de los ratones inmunizados con CXCR4 se agregan a cada pozo y se incuban 2 horas a 37° C. Las placas se lavan con PBS y luego se incuban con un anticuerpo IgG antiratón de cabra conjugado con HRP (Jackson Laboratories) durante 1 hora a 37° C. Después de lavado, las placas se desarrollan con sustrato TMB, la reacción se detiene 5 min después mediante la adición de 100 µL/pozo IM H₂SO₄. Los ratones que desarrollan los títulos mayores de anticuerpos anti-CXCR4 se utilizan para la generación del anticuerpo.

- Generación de hibridomas que producen los Mab a CXCR4

Los esplenocitos de ratón, aislados de un ratón Balb/c que desarrollan los títulos mayores de anticuerpos anti-CXCR4 se fusionan con PEG a una estirpe celular de mieloma de ratón Sp2/0. Las células se colocan en placas en aproximadamente 1×10^5 /pozo en placas de microtítulo seguido por la incubación de dos semanas en medio selectivo que contiene medio de ultra cultivo + 2 mM L-glutamina + 1 mM piruvato de sodio + 1x HAT. Los pozos luego se detectan mediante ELISA para los anticuerpos IgG monoclonales anti-CXCR4. El anticuerpo que secreta los hibridomas luego se subclonan por lo menos dos veces mediante dilución limitante, Se cultiva in vitro para generar el anticuerpo para análisis adicional.

Ejemplo 2: Caracterización de la especificidad de unión a Mab 515H7 y 301aE5 anti-CXCR4 (transfectante NIH3T3-CXCR4) mediante análisis FACS

En este experimento, la unión específica al CXCR4 humano (hCXCR4) de los Mab 515H7 y 301aE5 anti- CXCR4 se examina mediante análisis FACS. Se incuban células transfectadas NIH3T3 y NIH3T3-hCXCR4 con 10 µg/ml de anticuerpos monoclonales 515H7 y 301aE5. Las células luego se lavan con 1% de BSA/PBS/0.01% de NaN₃. Luego, se agregan anticuerpos secundarios marcados con Alexa a las células y se les permite incuban a 4° C durante 20 min. Las células luego se lavan de nuevo dos veces. Siguiendo el segundo lavado, se realiza

análisis FACS. Los resultados de estos estudios de unión se proporciona en la siguiente Tabla 8 que muestra [Intensidad de Fluorescencia Media (MFI) obtenida mediante FACS] que los Mab 515H7 y 301aE5 anti-CXCR4 se unen específicamente al CXCR4-NIH3T3 humano que transfecta la estirpe celular mientras no existe reconocimiento de las células NIH3T3 progenitoras.

Tabla 8

	NIH3T3 (MFI)	NIH3T3-CXCR4 (MFI)
Clon : 515H7 (10 µg/ml)	16	2752
Clon : 301aE5 (10 µg/ml)	21	1367

Ejemplo 3: Caracterización de la unión a Mab 515H7 y 301aE5 anti-CXCR4 a células mononucleares de sangre periférica (PBMC) mediante análisis FACS

Se recolecta sangre como capa leucocitaria de donante saludable. Se incuba 100 µl de sangre completa con anticuerpos CXCR4 anti-humanos (clones 515H7 y 301aE5) en la concentración indicada durante 20 minutos a 4° C. La sangre se lava tres veces en PBS-BSA 1%-NaN₃ 0.01% y se incuba con IgG Alexa 488 antihumano de cobre diluido 1 :500 (Invitrogen) durante 20 minutos a 4° C. Las células luego se lavan y se incuban con CD14-PE (Caltag) o CD3-PE (Caltag) durante 10 minutos a 4° C y se lava tres veces. Los glóbulos rojos se lisan con solución de lisado de Alto Rendimiento (Caltag) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las células se analizan inmediatamente utilizando Facscalibur (Becton-Dickinson). La expresión de CXCR4 en monocitos se hace en células positivas CD14 y la expresión CXCR4 en célula T se hace en células positivas CD3 (figura 1). Los resultados se expresan en la Capacidad de Unión a Antígeno (ABC).

Como se muestra en las figuras 2A y 2B, los clones 515H7 y 301aE5 anti-humanos CXCR4 tiñen ambos linfocitos T (Figura 2A) y monocitos (Figura 2B) que indica que los Mab 515H7 y 301aE5 son capaces de conocer la forma natural del CXCR4 expresado en la superficie celular de los monocitos y los linfocitos T.

Ejemplo 4: Efecto de los Mab 515H7 y 301aE5 en el homodímero CXCR4, mediante el método de transferencia de energía de resonancia de bioluminiscencia (BRET)

Este ensayo funcional permite evaluar los cambios conformacionales inducidos luego de la unión de Mab SDF-1 y/o 515H7 al receptor CXCR4 en el nivel del homodímero CXCR4.

Los vectores de expresión para los patrones de interacción investigados se construyen como proteínas de fusión con el tinte correspondiente (luciferasa *Renilla reniformis*, proteína fluorescente Amarilla y Azul, YFP) al aplicar técnicas de biología molecular convencionales. Dos experimentos BRET desarrollados en los días anteriores, las células HEK293 se transfectan transitoriamente con los vectores de expresión que codifican los patrones BRET correspondientes: [CXCR4/Rluc + CXCR4/YFP] para estudiar la homodimerización de CXCR4. El día después, las células se distribuyen en placas 96 MW blancas precubiertas con poli-lisina en medio de cultivo completo [DMEM complementado con 10 % de FBS]. Las células primero se cultivan en 37° C con CO₂ al 5 % con el fin de permitir la adhesión celular a la placa. Las células luego se sacrifican por inanición con 200 µl de DMEM/pozo durante la noche. Inmediatamente antes del experimento BRET, se retira el DMEM y las células se lavan rápidamente con PBS. Las células luego se incuban en PBS en la presencia o ausencia del anticuerpo, 10 min a 37° C antes de la adición de coelenterazina H 5 µM con o sin SDF-1 300 nM en un volumen final de 50 µl. Después de incubación durante 10 minutos adicionales a 37° C, la adquisición de emisión de luz a 485 nm y 530 nm se inicia utilizando el lector multimarca Mithras LB940 (Berthold) (ls/longitud de onda/pozo repetido 15 veces a temperatura ambiente).

El cálculo de la relación de BRET se realiza como se describió previamente (Angers et al., 2000): $[(\text{emisión}_{530 \text{ nm}}) - (\text{emisión}_{485 \text{ nm}}) \times Cf] / (\text{emisión}_{485 \text{ nm}})$, en donde $Cf = (\text{emisión}_{530 \text{ nm}}) / (\text{emisión}_{485 \text{ nm}})$ para células que expresan la proteína de fusión Rluc solo bajo las mismas condiciones experimentales. Simplificando esta ecuación muestra que la relación BRET corresponde a la relación 530/485 nm obtenido cuando están presentes los dos patrones BRET, corregido mediante la relación 530/485 nm obtenida bajo las mismas condiciones experimentales, cuando solo el patrón fusionado a Rluc está presente en el ensayo. Para facilitar la lectura, los resultados se expresan en unidades miliBRET (mBU); mBU corresponde a la relación BRET multiplicada por 1000.

El SDF1 (300 nM) aumenta mediante aproximadamente 20 % de la señal BRET que resulta de la proximidad espacial de las proteínas receptoras y adaptadoras fusionadas al receptor CXCR4, es probable indicar la formación de homodímeros CXCR4/CXCR4 o los cambios conformacionales de los dímeros preexistentes (Figuras 3 A y B). Los Mab 515H7 y 301aE5 son capaces de modular los cambios conformacionales inducidos por SDF-1 para los homodímeros CXCR4 (69 % de inhibición del BRET inducido por el SDF-1 que aumenta para 515H7 y 301aE5, Figuras 3A y B). Los Mab 515H7 y 301aE5 también son capaces de modular por sí mismos la proximidad espacial CXCR4/CXCR4, que indica una influencia de los Mab 515H7 y 301aE5 en la conformación de homodímero CXCR4/CXCR4. (Figuras 3A y 3B).

Ejemplo 5: Inhibición de la replicación KON aislada principal de VIH-1 (virus X4) en el PBMC humano mediante los Mab anti-CXCR4 515H7 y 301aE5

El PBMC de los donantes normales seronegativos para VIH-1 se aíslan de capas leucocitarias o citaféresis mediante la centrifugación del gradiente Ficoll-Hypaque. Se activan los PBMC en la presencia de PHA en medio de cultivo celular RPMI 1640 que contiene 25 mM HEPES, 5 ml de penicilina (10000 U/ml) - estreptomicina (10000 µg/ml) 2 mM L-glutamina, complementado con 10% de FCS inactivado por calor y se utilizan como objetivos celulares en un ensayo de neutralización de ciclo único. La replicación de VIH-1 en el PBMC humano principal se realiza al analizar el teñido intracelular del antígeno vírico p24 mediante análisis FACS. En resumen, se incuban 25 µl por pozo de varias diluciones de los Mab 515H7, 301aE5 y 12G5 (R&D Systems) o el medio de cultivo como control (RPMI 1640, 10% de FCS, 0.1% de IL-2), durante 1 h a 37° C con 25 µl por pozo de dilución aislada principal de VIH-1 KON X4, en duplicado. El PBMC humano activado por PHA (25 µl/pozo) a 20×10^6 células/ml se agregan a la mezcla de Mab/virus en una placa de 96 pozos (fondo en U, Costar 3599) y se cultivan durante 24 a 36 horas a 37° C en RPMI 1640 10% de FCS y 0.1% de IL-2. Se introduce el control que consiste de PBMC no infectado en medio sin Mab. Para detectar el PBMC infectado por VIH, el teñido intracelular del antígeno vírico p24 se realiza y se analiza mediante citometría de flujo. Las células se fijan y se permeabilizan utilizando el equipo Citofix/Citoperm (Becton Dickinson) de acuerdo con los protocolos del fabricante y teñidos con un Mab fluorescente anti-p24 (clon KC57 - Coulter Beckman) utilizado en dilución 1/160 incubado durante 10 min a 4°

C en la oscuridad. Después de lavado en PBS-3% de medio FCS, se diluyen los PBMC en PBS antes de análisis de citometría de flujo. El porcentaje de células positivas p24 en las diferentes muestras se determina al activar 20,000 eventos en una población de células vivas. Los subconjuntos de células vivas se analizan durante expresión p24 con relación al teñido de fondo de células no infectadas. Se obtiene el valor positivo del antígeno p24 después de sustracción de los eventos de fondo en células infectadas simuladas. El porcentaje de neutralización se define como la reducción de células positivas p24 comparado con los pozos infectados de control sin Mab. El título neutralizante se define como la dilución de Mab que permite una reducción de 90% en el porcentaje de las células infectadas. Los Mab 515H7 y 301aE5 anti-CXCR4 se comparan con el Mab 12G5 conocido como el Mab anti-CXCR4 de referencia para la aplicación del VIH. Como se muestra en las Figuras 4 A y B y 5, los Mab 515H7 y 301aE5 anti-CXCR4 son capaces de inhibir la replicación aislada principal de KON VIH-1 en PBMC con un IC_{90} de 10 μ g/ml (66 nM) y 150 μ g/ml (1 μ M), respectivamente, mientras que el Mab 12G5 falla en inhibir la replicación aislada principal de KON VIH-1 en PBMC (Figura 4A).

Ejemplo 6: Movilización mediada por el receptor CXCR4 de almacenamientos de calcio intracelulares

Este ensayo funcional se diseña para supervisar la señalización del receptor CXCR4 por medio de la estimulación de la ruta fosfo lipasa C, que induce la liberación de calcio de los almacenamientos intracelulares del retículo endoplásmico.

Las células CHO-K1, que expresan establemente y constitutivamente el receptor CXCR4 humano se obtienen luego de la transfección de células nultitradas CHO-K1 (ATCC CCL-61) con un vector de expresión de mamífero que lleva la secuencia codificante completa del receptor CXCR4 humano (RefSeq NM 003467). Las células se propagan en medio de cultivo completo [DMEM-F12 de Ham complementado con 5 % de suero de becerro fetal (FCS) y 500 μ g/ml de geneticina]. Las células se colocan en placas en placas negras 96MW en una densidad de 100,000 células/pozo en medio de cultivo apropiado. Las células se sacrifican dejándolas morir de hambre durante la noche antes de conducir los experimentos. Las células se cargan con el tinte de calcio fluorescente (Fluo-4 Sin

Lavado, Invitrogen US) en regulador de carga [HBSS 1x, HEPES 20 mM, ácido Probenicid 25 mM] durante 30 min. a 37° C seguido por 30 min. a 25° C. Se realiza la estimulación mediante SDF-1 mediante inyección directa en cada pozo. Para experimentos de antagonismo, se agregan 10 µl de solución Mab directamente en el regulador de carga por lo menos 10 min. antes del SDF-1. Se realizan mediciones de fluorescencia cinética en un lector de microplaca de fluorescencia multi-modo Mithras LB940 (Berthold) utilizando los siguientes parámetros: excitación a 485 nm, emisión a 535 nm, energía de excitación a 10000 unidades arbitrarias. Se registra la fluorescencia en cada pozo durante 0.1 segundo cada segundo y durante un periodo de 20 seg. antes de inyección de SDF-1 (señal basal). Luego 20 µl de SDF-1 se inyectan y los datos se registran durante un periodo de tiempo de 2 min. Cada condición experimental se realiza en duplicado. Los valores para cada pozo primero se corrigen al sustraer la fluorescencia basal y la fluorescencia emitida por el pozo de control sin las células. Los datos relativos se expresan como un porcentaje de la estimulación máxima obtenida por SDF-1 (100 nM).

El SDF1 (100 nM) induce una liberación rápida y fuerte de calcio intracelular en el CHO/CXCR4 recombinante, mientras no se detecta señal de fluorescencia en células nulttratadas CHO-K1. La intensidad máxima alcanza > 140 % sobre la fluorescencia basal y se observa a aproximadamente 40 seg. luego de la estimulación mediante SDF-1 (Figuras 6A, 6B y 6C). Los Mabs 515H7 (133 nM) (Figura 6A) y c515H7 (133nM) (Figura 6C) producen una inhibición fuerte del SDF-1 (100 nM) que induce la señal de calcio. El Mab 301aE5 (133 nM) (Figura 6B) produce una inhibición parcial de la señal de calcio inducida por SDF-1 (100 nM).

Ejemplo 7: Inhibición de la replicación KON, MN y 92UG024 aislada principal de VIH-1 (virus X4) en el PBMC humano mediante los Mab 515H7, c515H7 y 301aE5 anti-CXCR4

Ensayo de neutralización de ciclo único.

Este ensayo se realiza en 36 h utilizando KON, MN y 92UG024 de aislados principales concentrados y diluidos de acuerdo con lo anterior para permitir la detección de 2% de linfocitos T CD4 infectados después de 2 días de infección.

Se incuban veinticinco microlitros de diversas diluciones de los Mab 515H7, c515H7 y 301aE5 durante 1 h a 37° C con 25 µl del virus. El PBMC humano (25 µl) a 20×10^6 células/ml se agregan a la mezcla de Mab/virus en una placa de 96 pozos (fondo en U, Costar 3599) y se cultivan durante 36 h en RPMI 1640 10% de FCS y 20 U/ml IL-2 (R&D Systems, Minneapolis, MN).

Después de 2 días de cultivo, se detectan los linfocitos infectados con VIH mediante tñido intracelular de p24 Ag vírico. Las células se fijan y se permeabilizan utilizando los equipos Citofix/Citoperm y Perm/Wash (BD Biosciences) de acuerdo con el fabricante y se tiñen con un anti-p24 Mab fluorescente (FITC- o PE-anti-p24, clon KC57; Beckman Coulter/Immunotech, Hialeah, FL) utilizado en una dilución 1/160 en solución Perm/Wash agregado durante 15 min a 4°C. Después de lavado en PBS con 3% de FBS, se diluyen los PBMC en 300 µl de PBS antes de análisis de citometría de flujo (LSRII; BD Biosciences) con el software DIVA (BD Biosciences). El porcentaje de células positivas p24 en las diferentes muestras se determina al activar 20,000 eventos en una población de células vivas identificada mediante parámetros de dispersión lateral y delantera. Los subconjuntos de células vivas se analizan con el equipo de solución vivo/muerto (Invitrogen). Se obtiene el valor positivo p24 Ag después de la sustracción de los eventos de fondo en células simuladas que están infectadas.

El porcentaje de neutralización se define como la reducción de las células positivas p24 comparado con pozos infectados de control sin Mab. El título neutralizante se define como la concentración del anticuerpo (interpolado entre diluciones sucesivas realizadas en triplicado) que permite una reducción del 90% en el porcentaje de las células infectadas.

Como se muestra en las Figures 7, 8 y 9, los Mab 515H7, c515H7 y 301aE5 anti-CXCR4 son capaces de inhibir la replicación de los aislados principales VIH-I X4 MN, KON y 92UG024 en PBMC. Los resultados de los IC (en µg/ml) se resumen en la tabla 9.

Tabla 9

	KON			MN			92UG024		
	% Inhibición células infectadas			% Inhibición células infectadas			% Inhibición células infectadas		
	90	80	50	90	80	50	90	80	50
301aE5	>150	>150	150	>150	150	1	>150	150	50
515H7	15	8	1	10	1.5	<1.5	10	3	0.5
c515H7	20	10	1.5	15	1	<1.5	15	3	<1.5

Ejemplo 8: Inhibición de replicación de aislado principal de VIH-1 (virus dual X4/R5) en el PBMC humano mediante los Mab 515H7, c515H7 y 301aE5 anti-CXCR4

Ensayo de neutralización de ciclo único

Este ensayo se realiza en 36 h utilizando 89.6 aislado principal concentrado y diluido de acuerdo con lo anterior para permitir la detección de 2% de linfocitos T CD4 infectados después de 2 días de infección.

Se incuban veinticinco microlitros de diversas diluciones de los Mab 515H7, c515H7 y 301aE5 durante 1 h a 37° C con 25 µl de virus. El PBMC humano (25 µl) a 20 x 10⁶ células/ml se agrega a la mezcla de Mab/virus en una placa de 96 pozos (fondo en U, Costar 3599) y se cultiva durante 36 h en RPMI 1640 10% de FCS y 20 U/ml IL-2 (R&D Systems, Minneapolis, MN).

Después de 2 días de cultivo, se detectan linfocitos infectados con VIH mediante tinte intracelular de p24 Ag vírico. Las células se fijan y se permeabilizan utilizando los equipos Citofix/Citoperm y Perm/Wash (BD Biosciences) de acuerdo con el fabricante y se tiñen con un Mab anti-p24 fluorescente (FITC- o PE-anti-p24, clone KC57; Beckman Coulter/Immunotech, Hialeah, FL) se utilizan en una dilución 1/160 en solución Perm/Wash durante 15 min a 4° C. Después de lavado en PBS con 3% de FBS, se diluyen los PBMC en 300 µl de PBS antes de análisis de citometría de flujo (LSRII; BD Biosciences) con software DIVA (BD Biosciences). Se determina el porcentaje de células positivas p24 en las diferentes muestras al activar 20,000 eventos en una población celular viva identificada por parámetros de dispersión lateral y delantera. Los subconjuntos de células vivas se analizan con el equipo de solución vivo/muerto

(Invitrogen). Se obtiene el valor positivo p24 Ag después de sustracción de los eventos de fondo en células que simulan estar infectadas.

El porcentaje de neutralización se define como la reducción de células positivas p24 comparado con los pozos infectados de control sin Mab. El título neutralizante se define como la concentración del anticuerpo (interpolado entre diluciones sucesivas realizadas en triplicado) que permite una reducción del 90% en el porcentaje de células infectadas.

Como se muestra en las Figuras 10 y 11, los Mab 515H7, c515H7 y 301aE5 anti-CXCR4 son capaces de inhibir la replicación de aislado principal VIH-1 89.6 en PBMC. Los resultados de los IC (en µg/ml) se resumen en la tabla 10.

Tabla 10

	89.6		
	% inhibición células infectadas		
	90	80	50
301aE5	>150	150	20
515H7	15	1.5	<1.5
c515H7	10	1.5	<1.5

Ejemplo 9: Inhibición de la replicación 89.6 y UG93067 de asilados principales del VIH-1 (virus duales X4/R5) en el PBMC humano mediante el Mab c515H7 anti-CXCR4 combinado con la molécula anti-CCR5 Maraviroc

Ensayo de neutralización, que analiza múltiples rondas de replicación de aislado principal de VIH en el PBMC principal:

Este ensayo que combinas diluciones seriales de Mab c515H7 o Maraviroc o combinación de ambos con diluciones seriales de virus, analiza múltiples rondas de infección en PBMC (células mononucleares de sangre periférica). En resumen, las alícuotas en cuadruplicado de 25-µl de diluciones seriales (dos veces) de los Mab c515H7 o Maraviroc o combinación de ambos cada uno se incuban con 25 µl de diluciones seriales de virus en placas de filtro de 96 pozo prehidratadas (tamaño de poro 1.25-µm, Durapor Dv; Millipore, Molsheim, Francia). Una titulación de control del virus (25 µl de RPMI reemplaza los Mab c515H7 diluidos o Maraviroc) se realiza en la misma placa como las titulaciones en la presencia de diluciones de los Mab c515H7 o Maraviroc o combinación de ambos. Después de

1 h a 37° C, se agrega 25 µl de PBMC estimulado por PHA en una concentración de 4×10^6 células/ml (grupo de PBMC activado por PHA de cinco donantes saludables) para lograr un volumen de cultivo final 75-µl de RPMI, 10% de suero de becerro fetal (FCS), y 20 IU de interleuquina-2 (IL-2) por ml (R&D System). Después de 24 h a 37° C, se agrega 100 µl del mismo medio de cultivo. Se realizan dos lavados (200 µl de RPMI cada uno) mediante titulación en el día 4 para retirar los Mab c515H7 y Maraviroc, y se agrega 200 µl de medio de cultivo fresco. En el día 7, la presencia de p24 en los sobrenadantes de cultivo se mide mediante ELISA y se compara con aquel de los controles negativos (cultivos infectados con diluciones de virus y mantenidos en la presencia de 10^{-6} M zidovudina [AZT]) para determinar los pozos positivos. Se utilizan pozos en cuádruplicado para determinar el título vírico (50% de dosis infecciosa de cultivo de tejido [TCID₅₀]) en la ausencia (V_0) y en la presencia (V_n) de cada dilución de los Mab c515H7 o Maraviroc o combinación de ambos. El título neutralizante se define como la dilución de los Mab c515H7 o Maraviroc o combinación de ambos que resultan en una reducción de 90% del título vírico ($V_n/V_0 = 0.1$).

Como se muestra en la Figura 12, la replicación 89.6 del virus X4R5 trófico dual se inhibe mediante los Mab c515H7 con un IC₉₀ de 2 µg/ml (Figura 12). Maraviroc a 50 µg/ml no alcanza la actividad inhibidora IC₉₀ (Figura 12). Más aún, la adición de Maraviroc a 2 µg/ml al anticuerpo 515H7 aumenta la actividad inhibidora de los Mab c515H7 con un IC₉₀ de 0.2 µg/ml (Figura 12).

El efecto benéfico de los Mab c515H7 y la combinación de Maraviroc se evalúa utilizando diversas diluciones de las dos moléculas y otro virus UG93067 trófico dual. Como se muestra en la Figura 13, la actividad inhibidora de los Mab c515H7 y Maraviroc es similar. Estos resultados sugieren que es comparable la capacidad del virus UG93067 para utilizar el receptor CCR5 o CXCR4. Utilizando el virus UG93067, se puede evidenciar una actividad mejor, solo la combinación de estos inhibidores X4 (Mab c515H7) y R5 (Maraviroc) (10 µg/ml de cada uno) permite una reducción de 90 % del título de virus (Figura 13).

Ejemplo 10: Producción del Mab c515H7 quimérico anti-CXCR4

El formato quimérico del Mab 515H7 de murino se designa: este corresponde a los dominios variables de cadena pesada y ligera del anticuerpo de

murino de interés, genéticamente fusionado a los dominios constantes kappa y IgG1/IgG2/IgG4 humanos. Los Mab recombinantes se producen luego de transfección transitoria al utilizar el sistema HEK293/EBNA con un vector de expresión pCEP4 (InVitrogen, US). Se describen anteriormente las secuencias de nucleótido y aminoácido respectivas en la especificación. Más aún, como la tabla 3 anterior describe las secuencias de los isotipos IgG2 y 4 (que son isotipos preferidos), también se puede mencionar aquí la secuencia de la cadena pesada del isotipo IgG1, es decir c515H7 VH (Glwt) que corresponde a la secuencia de aminoácido SEQ ID No. 80 y la secuencia de nucleótido SEQ ID No.81.

Las secuencias de nucleótido completas que corresponden a los dominios variables de las cadenas pesada y ligera de los Mab 515H7 se sintetizan mediante síntesis de gen global (Genecust, Luxembourg). Ellas se subclonan en un vector pCEP4 (InVitrogen, US) que lleva la secuencia codificante completa del dominio constante de la cadena ligera [Ckappa] o la cadena pesada [CH1-Bisagra-CH2-CH3] de una inmunoglobulina humana IgG1/IgG2/IgG4. Se realizan todas las etapas de clonación de acuerdo con técnicas de biología molecular convencionales como se describe en el manual Laboratorio (Sambrook and Russel, 2001) o de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Cada construcción genética se valida completamente mediante secuenciamiento de nucleótido utilizando el equipo de secuenciamiento de ciclo terminador de Tinte Big (Applied Biosystems, US) y se analiza utilizando un Analizador Genético 3100 (Applied Biosystems, US).

Las células EBNA HEK293 adaptadas a la suspensión (InVitrogen, US) se hacen crecer rutinariamente en matraces de 250 ml en 50 ml de medio libre de suero Excell 293 (SAFC Biosciences) complementado con glutamina 6 mM en un agitador orbital (velocidad de rotación 110 rpm). Se realiza transfección transitoria con $2 \cdot 10^6$ células/ml utilizando polietilenoimina 25 kDa lineal (PEI) (Polysciences) preparado en agua en una concentración final de mezcla de 1 mg/ml y ADN de plásmido (concentración final de 1.25 µg/ml para la relación de plásmido de cadena ligera a pesada de 1:1). En las 4 horas post-transfección, el cultivo se diluye con un volumen de medio de cultivo fresco para lograr una densidad celular final de 10^6 células/ml. Se supervisa el proceso de cultivo sobre la base de viabilidad celular y producción de Mab. Típicamente, se mantienen cultivos durante 4 a 5 días. Se purifica el Mab utilizando un método de cromatografía

convencional en una resina de Proteína A (GE Healthcare, US). Se produce el Mab en niveles adecuados con evaluaciones funcionales. Los niveles de productividad varían típicamente entre 6 y 15 mg/l del Mab purificado.

Ejemplo 11: Caracterización de la especificidad de unión de Mab c515H7 quimérico anti-CXCR4 mediante análisis FACS

En este experimento, la unión específica al CXCR4 humano del Mab c515H7 quimérico anti-CXCR4 se examina mediante análisis FACS.

Se incuban células transfectadas NIH3T3-hCXCR4 con un rango de dosis de anticuerpo monoclonal c515H7 de 0 µg/ml a 10 µg/ml. Las células luego se lavan con 1% de BSA/PBS/0.01 % de NaN₃. Luego, se agregan anticuerpos secundarios marcados con Alexa a las células y se les permite incubarse a 4° C durante 20 min. Las células luego se lavan de nuevo dos veces. Luego del segundo lavado, se realiza análisis FACS. Los resultados de este estudio de unión se proporcionan en la Figura 15 que muestra que el Mab C515H7 quimérico anti-CXCR4 específicamente en la estirpe celular transfectada humana CXCR4-NIH3T3. No se detecta unión a células NIH3T3 wt (datos no mostrados).

Ejemplo 12: Efecto del Mab c515H7 en homodímero CXCR4, mediante el método de transferencia de energía de resonancia de bioluminiscencia (BRET)

Este ensayo funcional permite evaluar los cambios conformacionales inducidos luego de unión de Mab SDF-1 y/o c515H7 al receptor CXCR4 en el nivel del homodímero CXCR4.

Los vectores de expresión para los patrones de interacción investigados se construyen como proteínas de fusión con el tinte correspondiente (luciferasa *Renilla reniformis*, proteína fluorescente Rluc y Amarilla, YFP) al aplicar las técnicas de biología molecular convencionales. Dos días antes de realizar los experimentos de BRET, se transfectan transitoriamente células HEK293 con los vectores de expresión que codifican los patrones BRET correspondientes: [CXCR4/Rluc + CXCR4/YFP] para estudiar la homodimerización CXCR4. El día después, se distribuyen células en placas 96 MW blancas precubiertas con poli-

lisina en medio de cultivo completo [DMEM complementado con 10 % de FBS]. Las células primero se cultivan a 37° C con CO₂ al 5 % con el fin de permitir la adhesión celular a la placa. Las células luego se sacrifican dejándolas morir de hambre con 200 µl de DMEM/pozo durante la noche. Inmediatamente antes del experimento BRET, se retira el DMEM y las células se lavan rápidamente con PBS. Las células luego se incuban en PBS en la presencia o ausencia del anticuerpo, 10 min a 37° C antes de la adición de coelenterazina H 5 µM con o sin SDF-1 100 nM en un volumen final de 50 µl. Después de incubación de 10 minutos adicionales a 37° C, la adquisición de emisión de luz a 485 nm y 530 nm se inicia utilizando el lector multimarca Mithras LB940 (Berthold) (ls/longitud de onda/pozo repetido 15 veces a temperatura ambiente).

Se realiza el cálculo de la relación BRET como se describió previamente (Angers et al, 2000): $[(\text{emisión}_{530 \text{ nm}}) - (\text{emisión}_{485 \text{ nm}}) \times Cf] / (\text{emisión}_{485 \text{ nm}})$, en donde $Cf = (\text{emisión}_{530 \text{ nm}}) / (\text{emisión}_{485 \text{ nm}})$ para células que expresan la proteína de fusión Rluc sola bajo las mismas condiciones experimentales. Simplificando esta ecuación muestra que la relación BRET corresponde a la relación 530/485 nm obtenida cuando están presentes los dos patrones BRET, corregido mediante la relación 530/485 nm obtenida bajo las mismas condiciones experimentales, solo cuando el patrón fusionado a Rluc está presente en el ensayo. Para facilitar la lectura, los resultados se expresan en unidades miliBRET (mBU); mBU corresponde a la relación BRET multiplicado por 1000.

El SDF1 (100 nM) aumenta mediante aproximadamente 10 % de la señal BRET que resulta de la proximidad espacial de las proteínas donante y receptora fusionadas al receptor CXCR4, es probable indicar la formación de los homodímeros CXCR4/CXCR4 o los cambios conformacionales de los dímeros pre-existentes (Figura 16). El Mab c515H7 es capaz de modular los cambios conformacionales inducidos por SDF-1 para los homodímeros CXCR4 (96% de inhibición del aumento de BRET inducido por SDF-1, Figura 16). El Mab c515H7 también es capaz de modular por sí mismo la proximidad espacial CXCR4/CXCR4, que indica una influencia de este Mab en la conformación del homodímero CXCR4/CXCR4 (Figura 16).

Ejemplo 13: Evaluación In vitro de la actividad anti-VIH-1 Mab 515H7 utilizando células de osteosarcoma humano transducido por GFP (GHOST) que expresan CD4 y CXCR4 o CCR5.

Con el fin de determinar la especificidad del Mab CXCR4 515H7, evaluamos la actividad de anti-VIH-1 de este Mab utilizando células GHOST que expresan CD4 y CXCR4 o CCR5.

Este ensayo se realiza 48 h utilizando el virus X4 VIH-1 LAI (con células Fantasma que expresan CXCR4) o el virus R5 VIH-1 BaL (con células Fantasma que expresan CCR5). Se colocan en placas 500 µl de células Fantasma (2.5 10⁵ células/ml) durante 24h en medio de cultivo Dulbecco complementado con 10% de FCS. Se incuban diversas diluciones de Mab 515H7 durante 1 h a 37° C y luego de diluyen con el virus VIH-1 LAI (1/10) y el virus VIH-1 BaL (1/7) se agregan a las células durante 48h. Las células se someten a tripsina y se lavan con PBS IX. Se agregan 300 µL de 1.5% de paraformaldehído a los glóbulos celulares durante 2h a +4° C en la oscuridad, con el fin de fijar las células y de inactivar los virus. Se analizan células positivas GFP mediante citometría de flujo y se calcula la inhibición de la infección por VIH-1. El porcentaje de inhibición de las células infectadas se define como el comparado con los pozos infectados de control sin Mab. Los resultados de los IC (en µg/ml) se resumen en la tabla 11, el Mab 515H7 anti-CXCR4 es capaz de inhibir la infección del virus VIH-1 X4 Lai en células Fantasma que expresan CXCR4 pero es totalmente inactivo en la inhibición de la infección por el virus VIH-1 R5 BaL en células Fantasma que expresan CCR5.

	Virus CXCR4/LAI FANTASMA			Virus CCR5/BaL FANTASMA		
	% inhibición células infectadas			% inhibición células infectadas		
	90	80	50	90	80	50
515H7	0.5	0.1	0.08	>75	>75	>75

Tabla 11

Ejemplo 14: Humanización del anticuerpo de murino anti-CXCR4 515H7 y generación de un fragmento de dicho h515H7

- Procedimiento General

La humanización del anticuerpo anti-CXCR4 515H7 se realiza al aplicar las reglas globales de injerto de CDR. El análisis inmunogénico y la definición de CDR y las regiones de estructura principal (FR) se realizan al aplicar el esquema de numeración único IMGT así como también las colecciones y herramientas IMGT (Lefranc, 1997 - www.imgt.org).

La unión de las variantes humanizadas del 515H7 se determina en una estirpe celular NIH3T3 establemente transfectada con CXCR4 humano. La actividad de unión se evalúa mediante un ensayo de competición con el anticuerpo de ratón biotinilado. En un segundo intento, se evalúan los anticuerpos humanizados por su capacidad de inhibir la unión del SDF-1 biotinilado a células RAMOS. Las células RAMOS se seleccionan debido a su alta expresión de CXCR4 y baja expresión de CXCR7 y SDF-1.

Estos ensayos se utilizan para caracterizar las versiones humanizadas recombinantes de los anticuerpos anti-CXCR4. Se formatean los dominios variables con los dominios constantes IgG 1/k humanos y se clona en el vector de expresión de mamífero pCEP. Se expresan transitoriamente los anticuerpos derivados recombinantes IgG1/k en células HEK293. Los sobrenadantes de cultivo de expresión se filtran y se purifican los anticuerpos utilizando la sefarosa de proteína A. Los anticuerpos purificados se vuelven a regular en PBS y las concentraciones de anticuerpo se determinan mediante ELISA.

Se generan fragmentos de anticuerpo recombinantes mediante PCR utilizando oligonucleótidos específicos para los dominios variables del anticuerpo humanizado y se subclonan estos en un sistema E. coli. La purificación de los fragmentos de anticuerpo se hace mediante cromatografía de afinidad de ión inmobilizada (IMAC).

- Humanización de los dominios variables de 515H7

Las diferentes alineaciones de secuencia de los dominios variables de las cadenas ligera y pesada se ilustran en las Figuras 17 y 18.

En una primera serie de experimentos, se analizan las actividades de unión anti-CXCR4 de las tres primeras variantes humanizadas. Se combina la variante 1

VH (VH1) con el VL de murino y se evalúan estas construcciones en su capacidad para inhibir la unión de un anticuerpo parenteral 515H7 de murino biotinilado. La secuencia de aminoácido del dominio variable de VIH comprende la SEQ ID No. 90 mientras que la secuencia de nucleótido comprende la SEQ ID No. 91. La secuencia de aminoácido del VIH de longitud completa comprende la SEQ ID No. 92 mientras que la secuencia de nucleótido comprende la SEQ ID No. 93. Esta construcción muestra capacidad similar para competir con el anticuerpo de murino como el anticuerpo quimérico (Figura 19A). Esto indica que la variante VH más humana tiene la misma capacidad de unión como la quimérica. Por lo tanto, se combina el VIH con la variante 2 de VL (Figura 19B).

En experimentos adicionales, se ha determinado si las variantes humanizadas del anticuerpo 515H7 inhiben la unión del SDF-1 a las células que expresan CXCR4 (Figura 20). La capacidad inhibidora de las variantes humanizadas de hz515H7 se evalúa al detectar el SDF-1 biotinilado en citometría de flujo. El anticuerpo humanizado hz515H7 VIH D76N VL2 tiene una capacidad similar para inhibir la unión de SDF-1 como el C515H7 quimérico. Un fragmento de anticuerpo de la variante humanizada hz515H7 VIH VL2 también se ha probado y se ha determinado que dicho fragmento de anticuerpo es capaz de inhibir completamente la unión del SDF-1 (Figura 20).

Ejemplo 15: Caracterización mediante análisis FACS de la especificidad de unión de los Mab 515H7 anti-CXCR4 humanizados

En este experimento, la unión específica al CXCR4 humano de los Mab 515H7 humanizados anti-CXCR4 se examina mediante análisis FACS.

Se incuban NIH3T3, NIH3T3-hCXCR4 transfectados con 0 a 10 µg/mL de los Mab 515H7 humanizados (hz515H7 VIH D76N VL2, hz515H7 VIH D76N VL2.1, hz515H7 VIH D76N VL2.2, hz515H7 VIH D76N VL2.3) durante 20 min a 4°C en la oscuridad en 100 µl de regulador Facs. Después de 3 lavados en regulador Facs, las células se incuban con el anticuerpo secundario, un Alexa 488 antihumano de cabra (dilución 1/500), durante 20 minutos a 4° C en la oscuridad. Después de 3 lavados en regulador Facs, se agrega yoduro de propidio en cada pozo y solo se analizan células viables mediante Facs. Por lo menos se evalúan

5000 células viables para evaluar el valor medio de intensidad de fluorescencia para cada condición.

Los resultados de estos estudios de unión se proporcionan en la Figura 21 que muestra [Intensidad de Fluorescencia Media (MFI) obtenida mediante FACS] que los Mab hz515H7 humanizados anti-CXCR4 unidos específicamente a la estirpe celular transfectada humana CXCR4-NIH3T3 (MFI= 2.2 con células progenitoras NIH3T3).

Ejemplo 16: Efecto de los Mab hz515H7 en el homodímero CXCR4, mediante el método de transferencia de energía de resonancia de bioluminiscencia (BRET)

Este ensayo funcional permite evaluar los cambios conformacionales inducidos luego de SDF-1 y/o hz515H7 VIH D76N VL2, hz515H7 VIH D76N VL2.1, hz515H7 VIH D76N VL2.2, hz515H7 VIH D76N VL2.3 unidos al receptor CXCR4 en el nivel del homodímero CXCR4.

Se construyen los vectores de expresión para los patrones de interacción investigados como las proteínas de fusión con el tinte correspondiente (luciferasa *Renilla reniformis*, proteína fluorescente Rluc y Amarilla, YFP) al aplicar las técnicas de biología molecular convencionales. Dos días antes de realizar los experimentos BRET, se transfectan transitoriamente células HEK293 con los vectores de expresión que codifican los patrones BRET correspondientes: [CXCR4/Rluc + CXCR4/YFP] para estudiar la homodimerización CXCR4. El día después, las células se distribuyen en placas 96 MW blancas precubiertas con poli-lisina en medio de cultivo completo [DMEM complementado con 10 % de FBS]. Las células primero se cultivan a 37° C con CO₂ al 5 % con el fin de permitir la adhesión celular a la placa. Las células luego se sacrifican al dejarlas morir de hambre con 200 µl de DMEM/pozo durante la noche. Inmediatamente antes del experimento BRET, se retira el DMEM y las células se lavan rápidamente con PBS. Las células luego se incuban en PBS en la presencia o ausencia del anticuerpo, 10 min a 37° C antes de la adición de coelenterazina H 5 µM con o sin SDF-1 100 nM en un volumen final de 50 µl. Después de incubación durante 10 minutos adicionales a 37° C, la adquisición de emisión de luz a 485 nm y 530 nm

se inicia utilizando el lector multiplaca Mithras LB940 (Berthold) (ls/longitud de onda/pozo repetido 15 veces a temperatura ambiente).

Se realiza el cálculo de la relación BRET como se describió previamente (Angers et al., 2000): $[(\text{emisión}_{530 \text{ nm}}) - (\text{emisión}_{485 \text{ nm}}) \times C_f] / (\text{emisión}_{485 \text{ nm}})$, en donde $C_f = (\text{emisión}_{530 \text{ nm}}) / (\text{emisión}_{485 \text{ nm}})$ para células que expresan la proteína de fusión Rluc solo bajo las mismas condiciones experimentales. Simplificando esta ecuación muestra que la relación BRET corresponde a la relación 530/485 nm obtenida cuando están presentes los dos patrones BRET, corregidos por la relación 530/485 nm obtenida bajo las mismas condiciones experimentales, solo cuando está presente el patrón que se fusiona al Rluc en el ensayo. Para facilitar su lectura, los resultados se expresan en unidades miliBRET (mBU); mBU corresponde a la relación BRET multiplicado por 1000.

El SDF1 (100 nM) aumenta mediante aproximadamente 12 % de la señal BRET que resulta de la proximidad espacial de las proteínas de donante y receptor fusionadas al receptor CXCR4, es probable indicar la formación de homodímeros CXCR4/CXCR4 o los cambios conformacionales de los dímeros preexistentes (Figura 22). Los Mab humanizados 515H7 son capaces de modular los cambios conformacionales inducidos por SDF-1 para los homodímeros CXCR4 con un porcentaje de inhibición del aumento BREY inducido por SDF-1 de aproximadamente 88% para Mab hz515H7 VH1D76N-VL2, 65% para el Mab hz515H7 VH1D76N-VL2.1, 33% para el Mab hz515H7 VH1D76N-VL2.2 y 21% para el Mab hz515H7 VH1D76N-VL2.3 (Figura 22)

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, caracterizado porque este comprende por lo menos una región CDR determinante de complementariedad seleccionada de los CDR que comprenden las secuencias de aminoácido de las SEQ ID Nos. 1 a 6 y 30 a 33 como se define mediante el sistema de numeración IMGT.
2. El anticuerpo de la reivindicación 1, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, caracterizado porque este comprende una cadena ligera que comprende CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 que comprende respectivamente la secuencia de aminoácido de las SEQ ID Nos. 1, 2 y 3; y una cadena pesada que comprende CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 que comprende respectivamente la secuencia de aminoácido de las SEQ ID Nos. 4, 5 y 6.
3. El anticuerpo de la reivindicación 2, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, caracterizado porque este comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID No. 7 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID No. 8.
4. El anticuerpo de la reivindicación 2, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, caracterizado porque este es un anticuerpo quimérico y porque este comprende una cadena pesada de la secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID Nos. 56, 57 o 58, y una cadena ligera de la secuencia de la SEQ ID No. 59.
5. El anticuerpo de la reivindicación 2, caracterizado porque este es un anticuerpo humanizado y porque este comprende una región variable de cadena pesada de la secuencia que consiste de la SEQ ID No. 64, y una región variable de cadena ligera de la secuencia seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID Nos. 65, 66, 82 o 83.
6. El anticuerpo de la reivindicación 2, caracterizado porque este es un anticuerpo humanizado y en que este comprende el anticuerpo humanizado A, o un compuesto derivado o fragmento funcional del mismo, que

comprende una cadena pesada de la secuencia seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID Nos. 67, 68 o 69, y una cadena ligera de la secuencia seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID Nos. 70, 71, 84 o 85.

7. El anticuerpo de la reivindicación 2, caracterizado porque dicho fragmento funcional consiste de los fragmentos Fv, scFv, Fab, F(ab')₂, Fab', scFv-Fc, diacuerpos, o cualquier fragmento cuya vida útil se ha aumentado mediante modificación química.
8. El anticuerpo de la reivindicación 7, caracterizado porque este es un scFv que comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID No. 54.
9. El anticuerpo de la reivindicación 1, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, caracterizado porque este comprende una cadena ligera que comprende CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 que comprende respectivamente la secuencia de aminoácido de la SEQ ID Nos. 1, 2 y 30; y una cadena pesada que comprende CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 que comprende respectivamente la secuencia de aminoácido de la SEQ ID Nos. 31, 32 y 33.
10. El anticuerpo de la reivindicación 9, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, caracterizado porque este comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID No. 34 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID No. 35.
11. Un ácido nucleico aislado, caracterizado porque este se selecciona de los siguientes ácidos nucleicos:
 - a) un ácido nucleico, ADN o ARN, que codifica un anticuerpo, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, como se reivindica en una de las reivindicaciones 1 a 10;
 - b) un ácido nucleico que comprende una secuencia de ADN seleccionada del grupo de las secuencias de los CDR que consisten de las SEQ ID Nos. 14 a 19 y 41 a 45;

- c) un ácido nucleico que comprende una secuencia de ADN seleccionada del grupo de las secuencias de los dominios variables pesado y ligero que consiste de las SEQ ID Nos. 20, 21, 46, 47, 72, 73, 74, 86 y 87;
 - d) un ácido nucleico que comprende una secuencia de ADN seleccionada del grupo de las secuencias de las cadena pesada y ligera que consiste de la SEQ ID Nos. 60 a 63, 75 a 79, 88 y 89;
 - e) un ácido nucleico que comprende una secuencia de ADN que consiste de la SEQ ID No. 55;
 - f) los ácidos nucleicos de ARN correspondientes de los ácidos nucleicos como se define en b), c), d) o e);
 - g) los ácidos nucleicos complementarios de los ácidos nucleicos como se define en a), b), c), d) y e); y
 - h) un ácido nucleico de por lo menos 18 nucleótidos capaz de hibridar bajo condiciones de alta exigencia con por lo menos uno de los CDR de la secuencia SEQ ID Nos. 14 a 19 y 41 a 45.
- 12. Un vector que comprende un ácido nucleico como se reivindica en la reivindicación 11.
 - 13. Una célula anfitriona que comprende un vector como se reivindica en la reivindicación 12.
 - 14. Un animal transgénico con la excepción del hombre que comprende por lo menos una célula transformada por un vector como se reivindica en la reivindicación 12.
 - 15. Un proceso para la producción de un anticuerpo, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, como se reivindica en una de las reivindicaciones 1 a 10 caracterizado porque este comprende las siguientes etapas:

- a) cultivo en un medio y condiciones de cultivo apropiadas de una célula como se reivindica en la reivindicación 13; y
- b) la recuperación de dichos anticuerpos, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, que se producen así partiendo del medio de cultivo o dichas células cultivadas.
16. Un anticuerpo, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, que se pueden obtener o se obtienen por un proceso como se reivindica en la reivindicación 15.
17. El anticuerpo de las reivindicaciones 1 a 10 y 16 como un medicamento.
18. El anticuerpo, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, de las reivindicaciones 1 a 10 o 16 a 17, caracterizado porque este inhibe la replicación aislada principal de KON VIH-1 en PBMC con un IC_{90} de por lo menos 5 $\mu\text{g/ml}$, preferiblemente por lo menos 10 $\mu\text{g/ml}$.
19. Una composición que comprende por vía del principio activo un compuesto que consiste de un anticuerpo, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, como se reivindica en una de las reivindicaciones 1 a 10 y 16 a 18.
20. La composición como se reivindica en la reivindicación 19 como un medicamento.
21. La composición como se reivindica en la reivindicación 19 y 20 para la prevención o para el tratamiento de infección por VIH.
22. La composición como se reivindica en la reivindicación 21, caracterizado porque dicha infección por VIH es una infección por VIH trófica X4.
23. La composición como se reivindica en la reivindicación 21, caracterizado porque dicha infección por VIH es una infección por VIH trófica X4/R5.

24. La composición de acuerdo con las reivindicaciones 19 a 23, caracterizado porque esta comprende por lo menos un segundo compuesto anti-VIH seleccionados entre los compuestos capaces de inhibir específicamente la entrada de VIH y/o la replicación.
25. La composición de acuerdo con la reivindicación 24, caracterizado porque dicho por lo menos segundo compuesto anti-VIH se selecciona entre el grupo que consiste de fármacos antiretrovíricos tales como inhibidores de proteasa de VIH (PI), inhibidores de transcriptasa inversa de nucleósido/nucleótido de VIH (NRTI/NtRTI), inhibidores de transcriptasa inversa de VIH sin nucleósido (NNRTI), inhibidores de entrada de VIH, inhibidores de integrasa de VIH.
26. La composición de acuerdo con la reivindicación 24 o 25, caracterizado porque dicho por lo menos segundo compuesto anti-VIH es el Maraviroc.
27. Proceso para la detección y/o la identificación de moléculas como agentes antivíricos del antagonista CXCR4 que comprende las etapas de:
 - a) seleccionar células que expresan CXCR4,
 - b) incubar dichas células con un anticuerpo, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, de las reivindicaciones 1 a 10 o 16 a 18, y
 - c) evaluar las moléculas probadas por su inhibición potencial de la unión entre el anticuerpo, o uno de sus fragmentos o derivados funcionales, a CXCR4, y
 - d) seleccionar moléculas capaces de dicha inhibición.

ANTICUERPOS ANTI CXCR4 PARA EL TRATAMIENTO DEL VIH

La presente invención se relaciona con anticuerpos aislados novedosos, o los compuestos derivados o los fragmentos funcionales de los mismos, capaces de unirse a CXCR4 pero también para inducir el cambio conformacional de los homodímeros CXCR4 y capaces de inhibir la replicación aislada principal del VIH-1 en PBMC. Más particularmente, la presente invención se relaciona con los anticuerpos monoclonales 515H7 y 301aE5, específicos para la proteína CXCR4, así como también su uso para el tratamiento de infección por VIH. También se cubren composiciones farmacéuticas compuestas de tales anticuerpos y un proceso para la selección de tales anticuerpos.

1/16

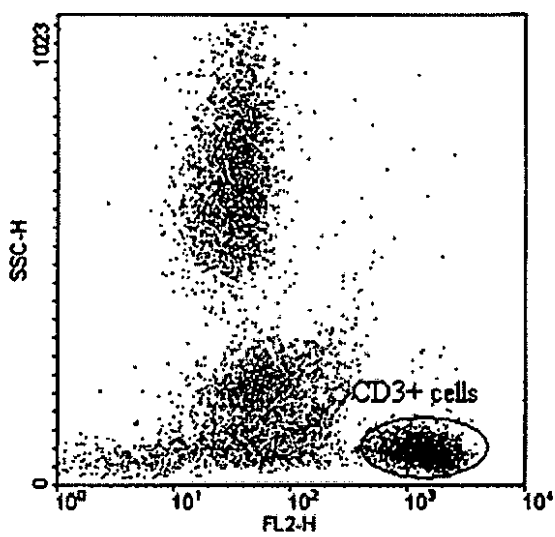


FIGURA 1A

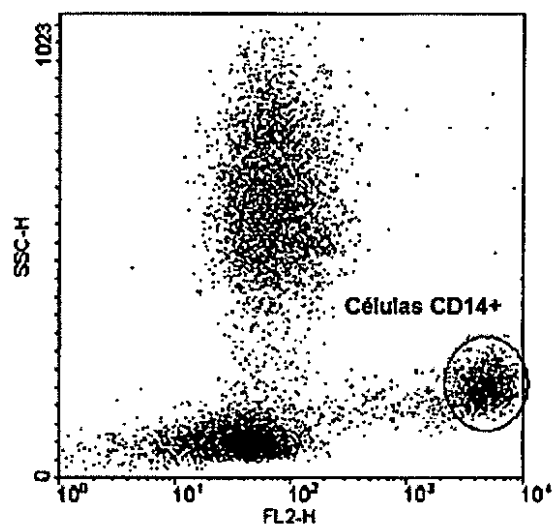


FIGURA 1B

HOJA SUSTITUTA (REGLA 26)

2/16

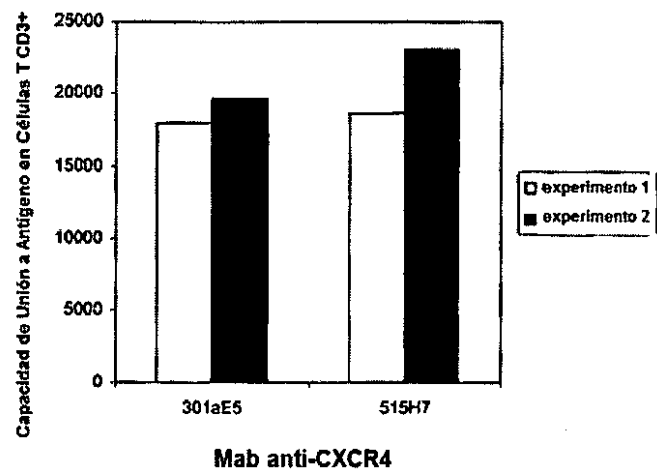


FIGURA 2A

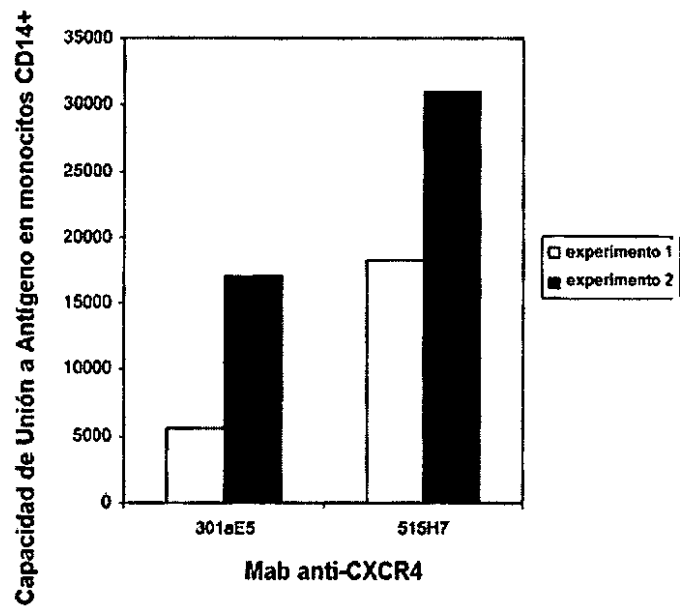


FIGURA 2B

3/16

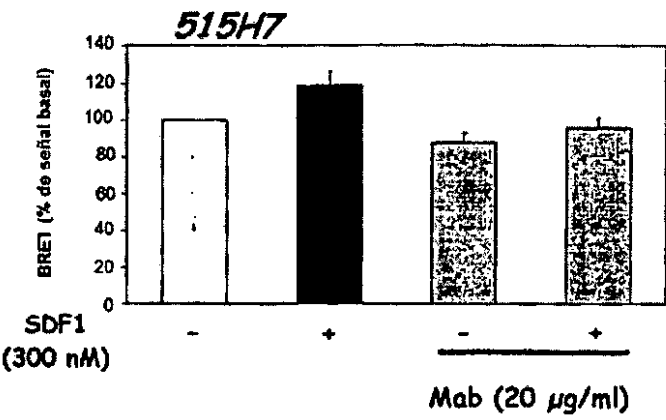


FIGURA 3A

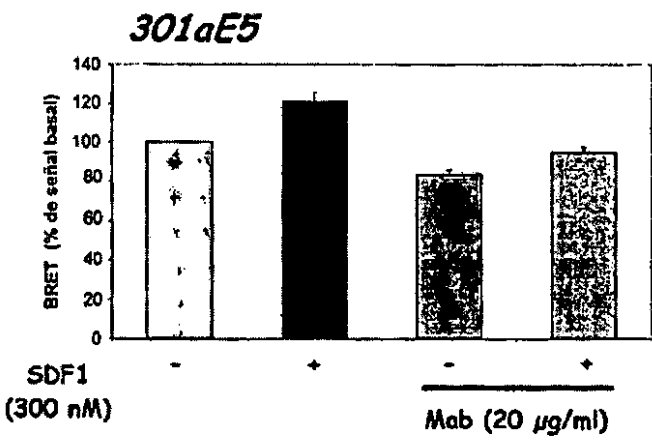


FIGURA 3B

4/16

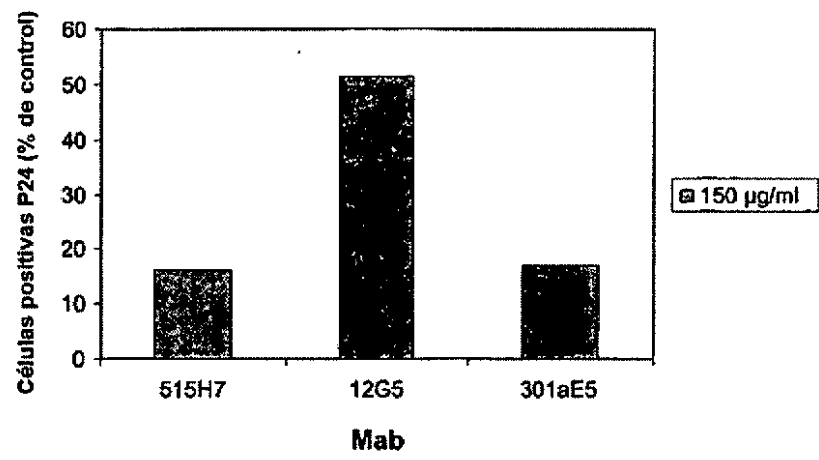


FIGURA 4A

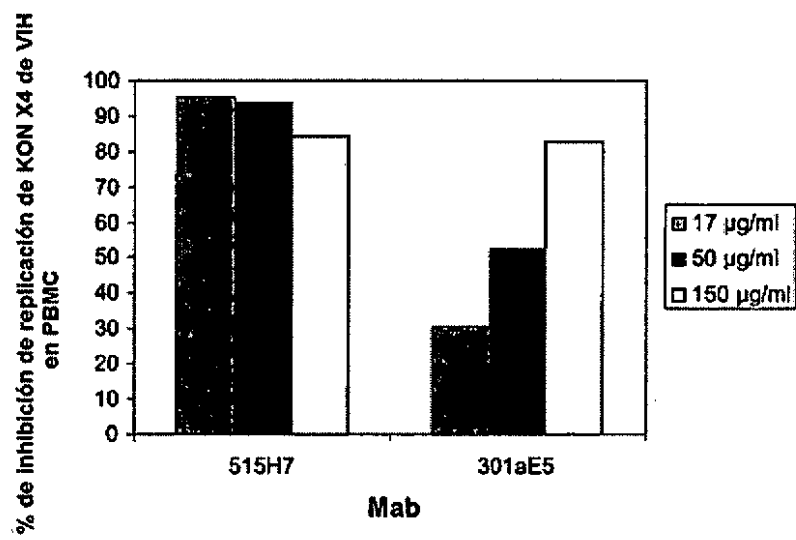


FIGURA 4B

5/16

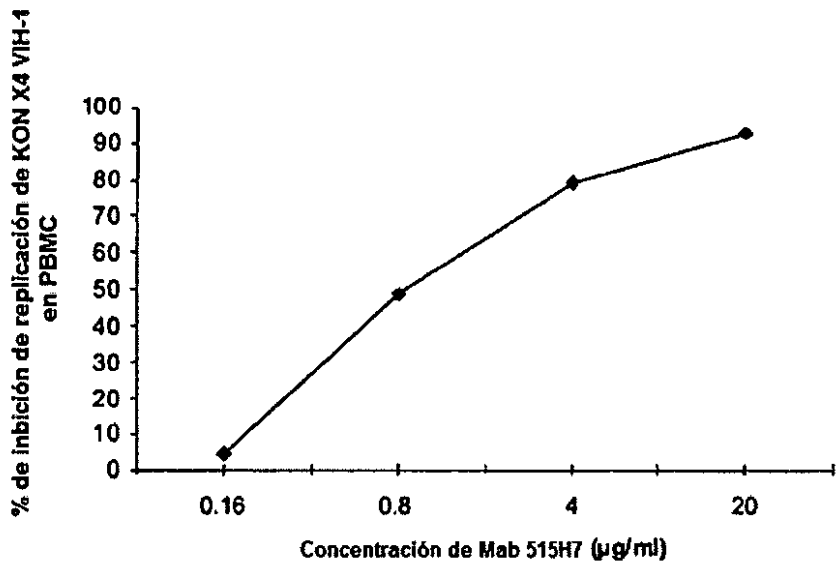


FIGURA 5

6/16

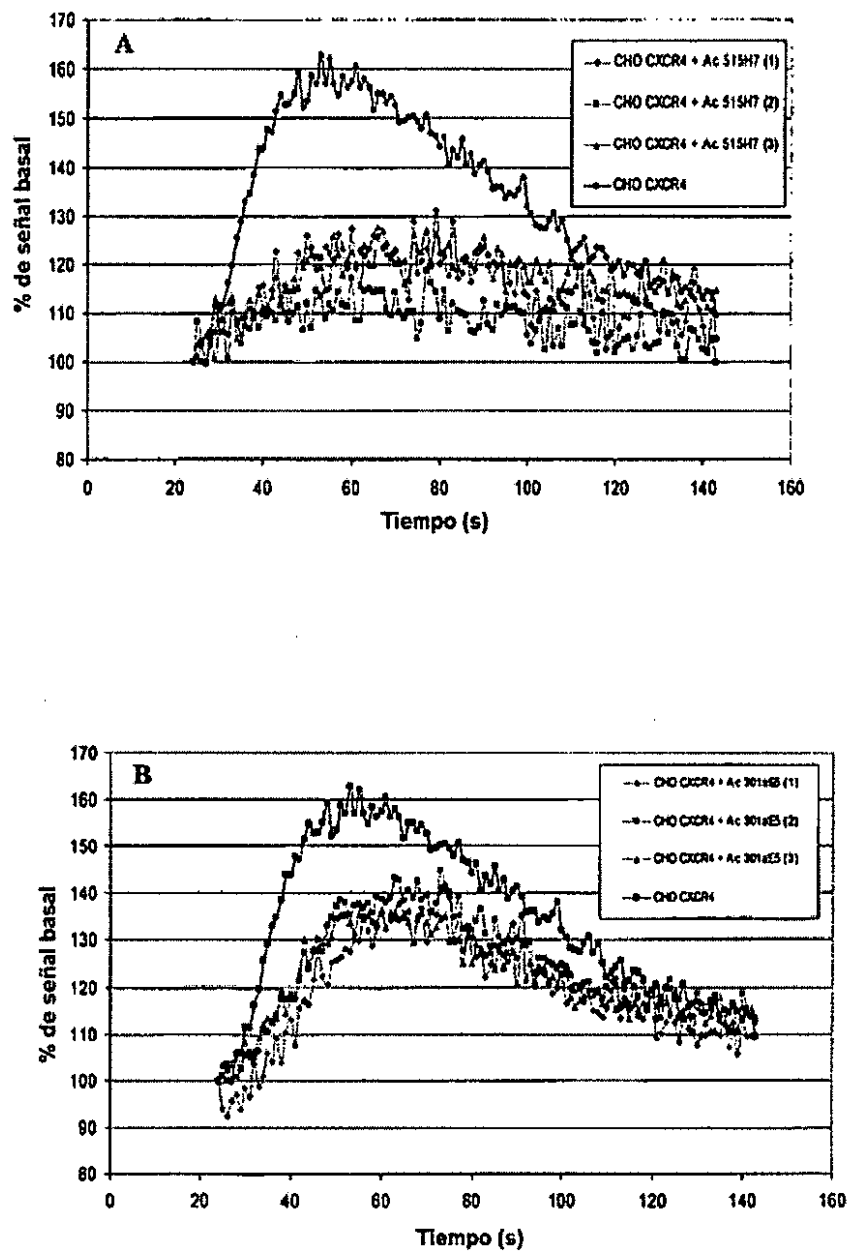


FIGURA 6A et 6B

HOJA SUSTITUTA (REGLA 26)

7/16

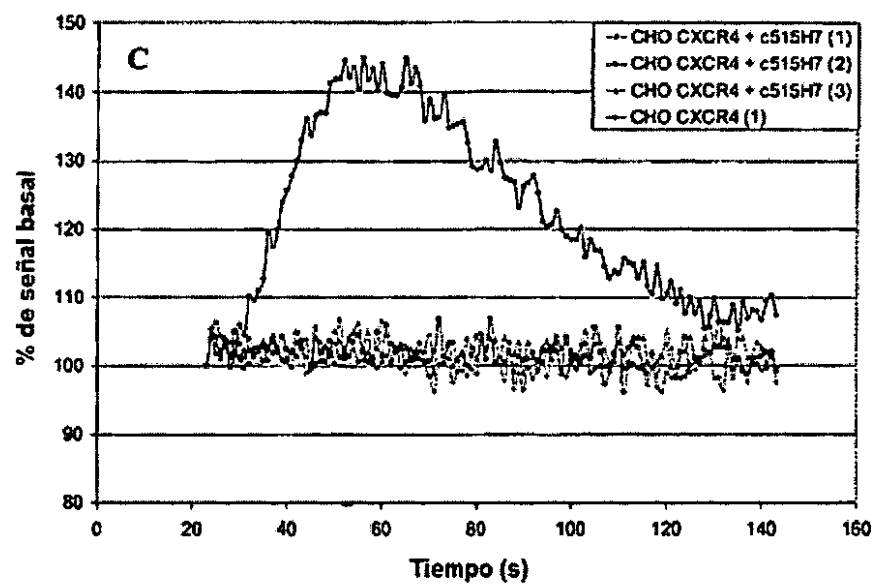


FIGURA 6C

HOJA SUSTITUTA (REGLA 26)

8/16

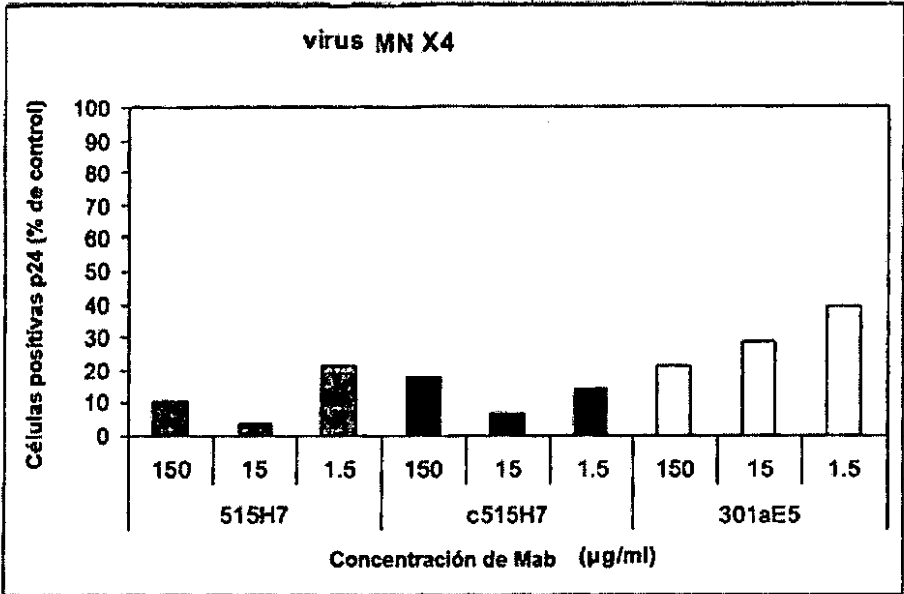


Figura 7

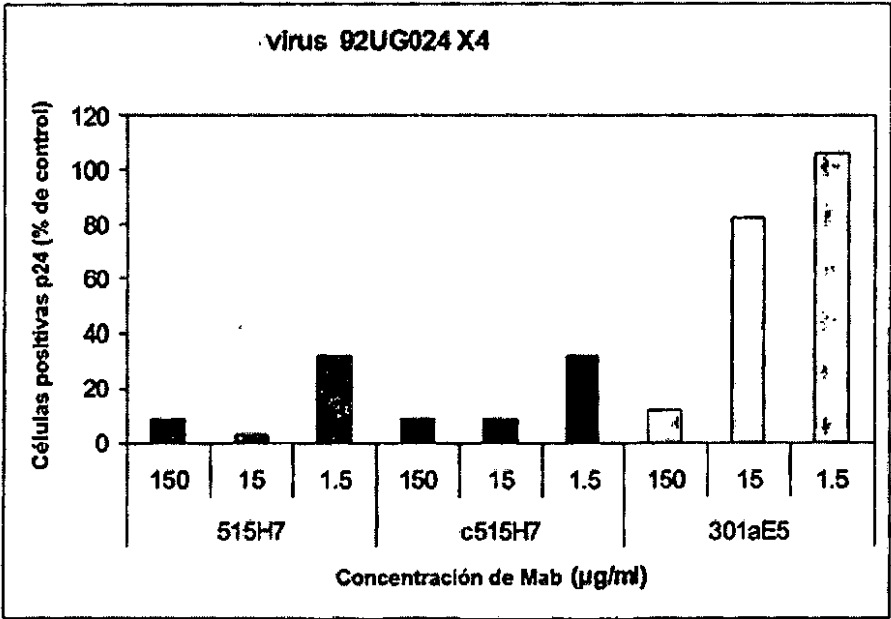


Figura 8

9/16

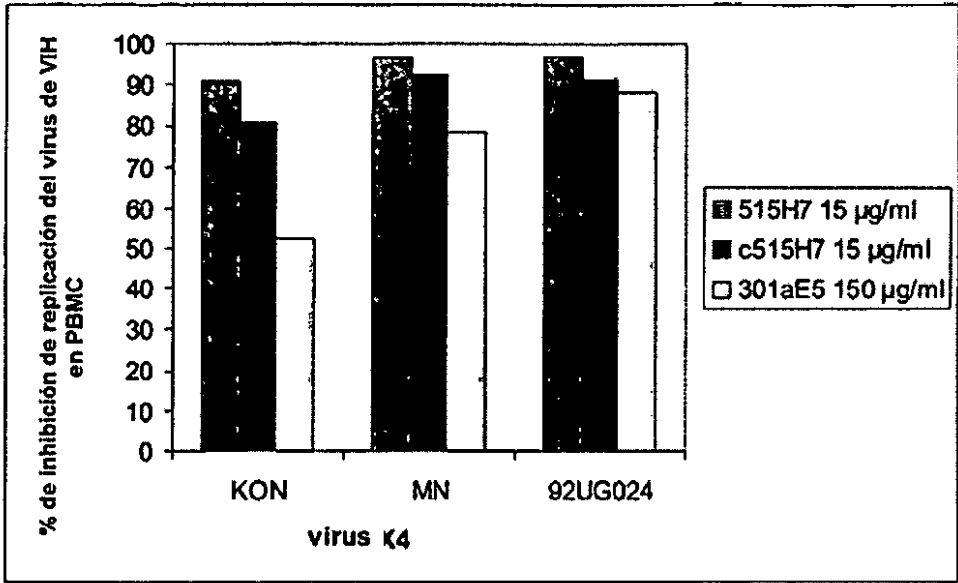


Figura 9

HOJA SUSTITUTA (REGLA 26)

10/16

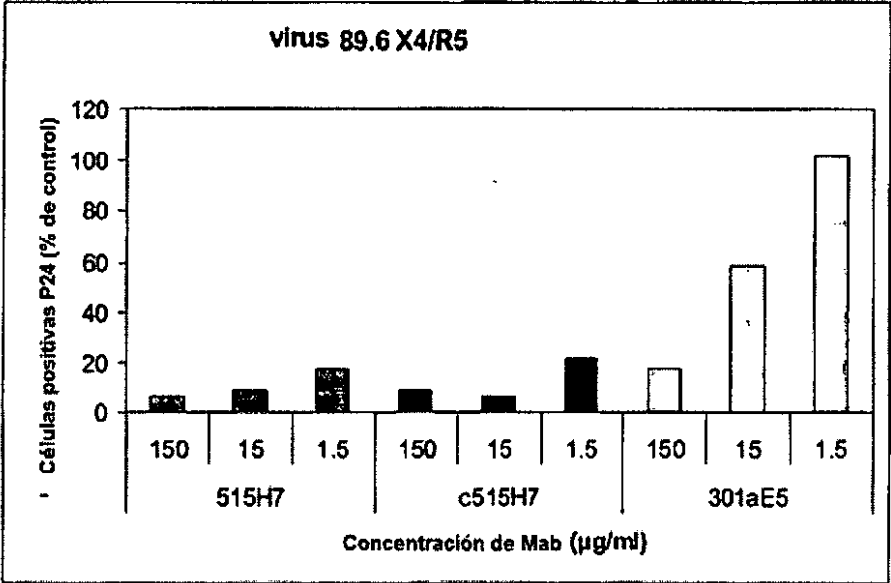


Figura 10

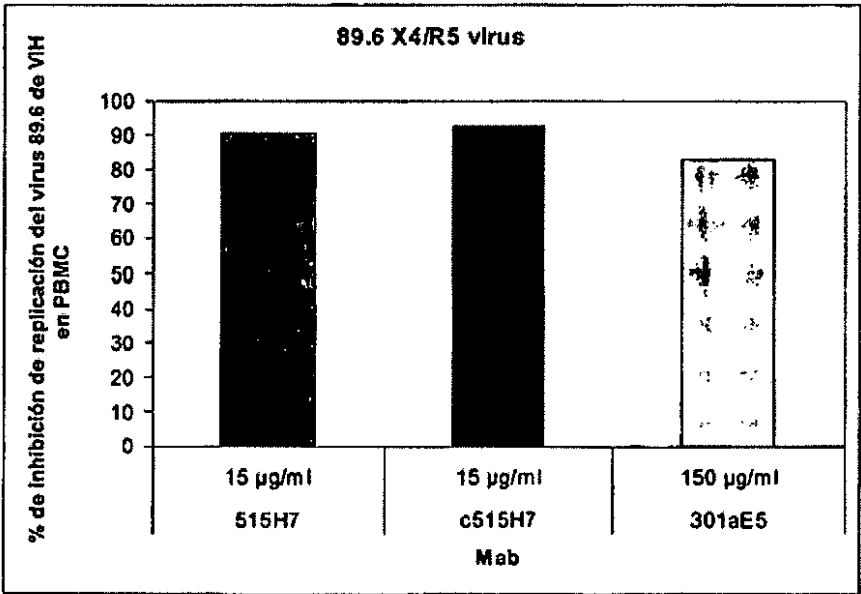


Figura 11

11/16

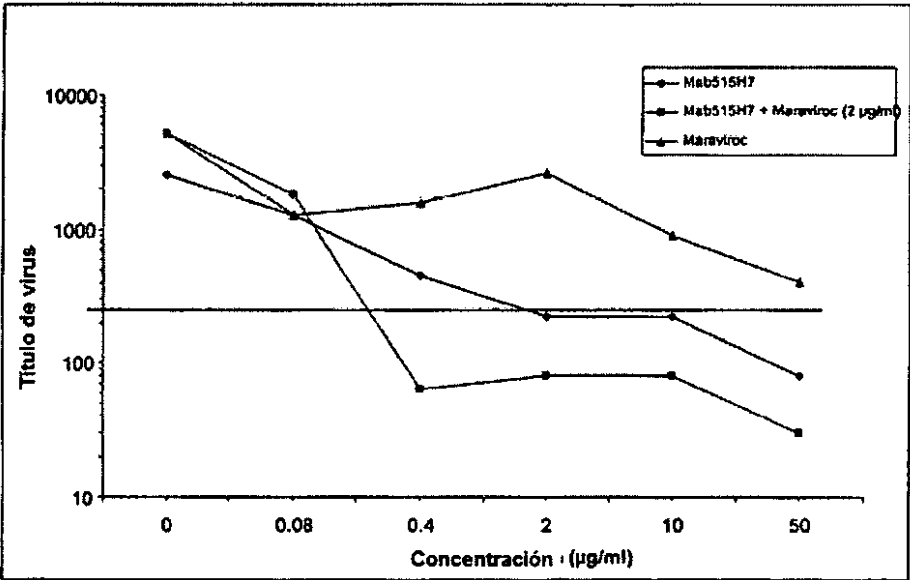


Figura 12

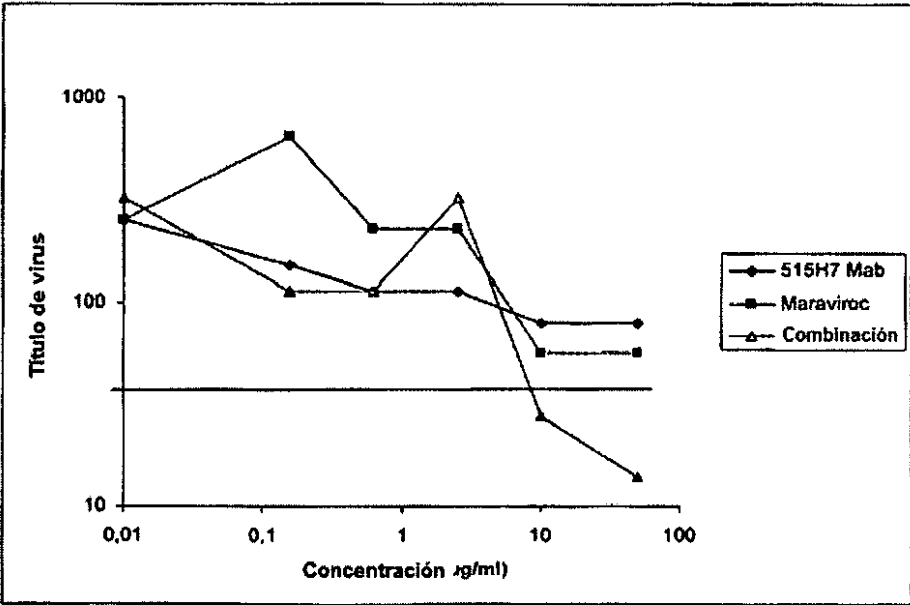


Figura 13

12/16

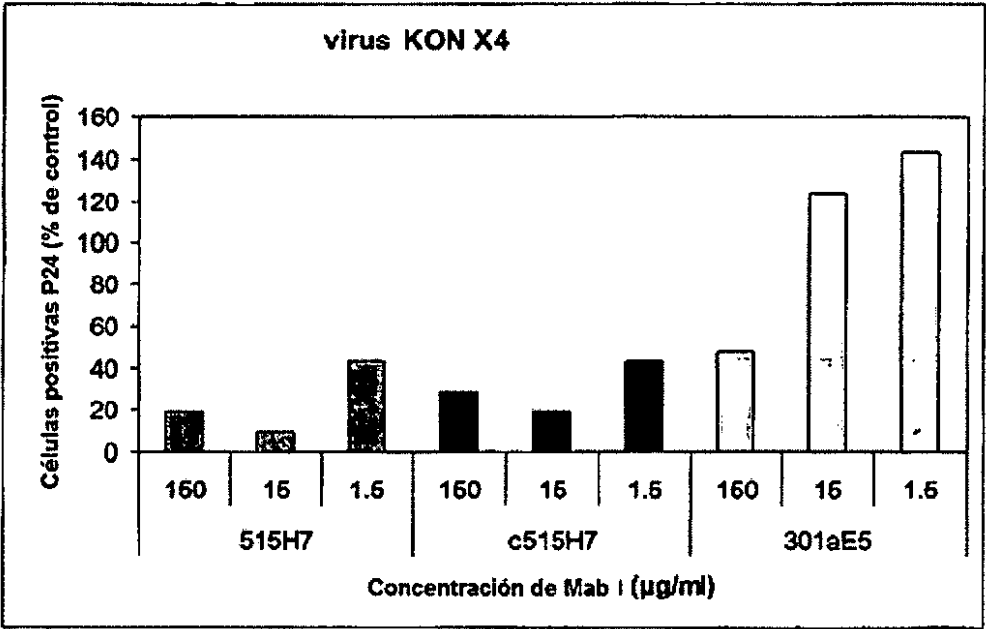


Figura 14

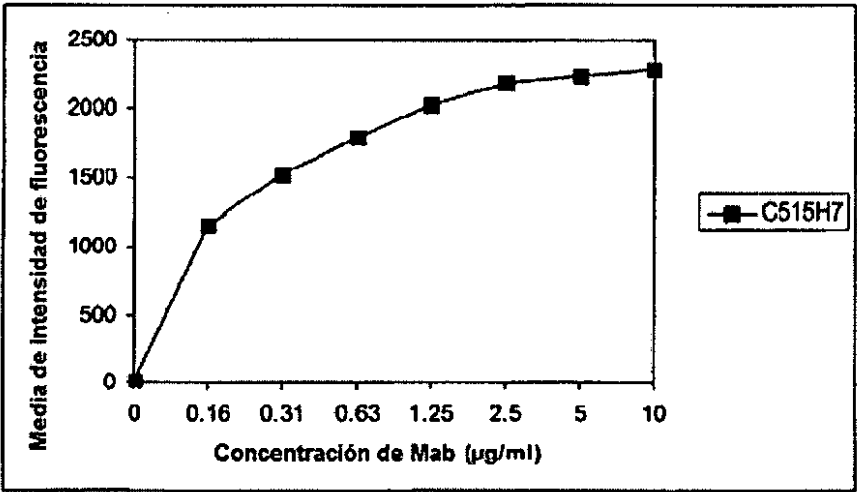


Figura 15

13/16

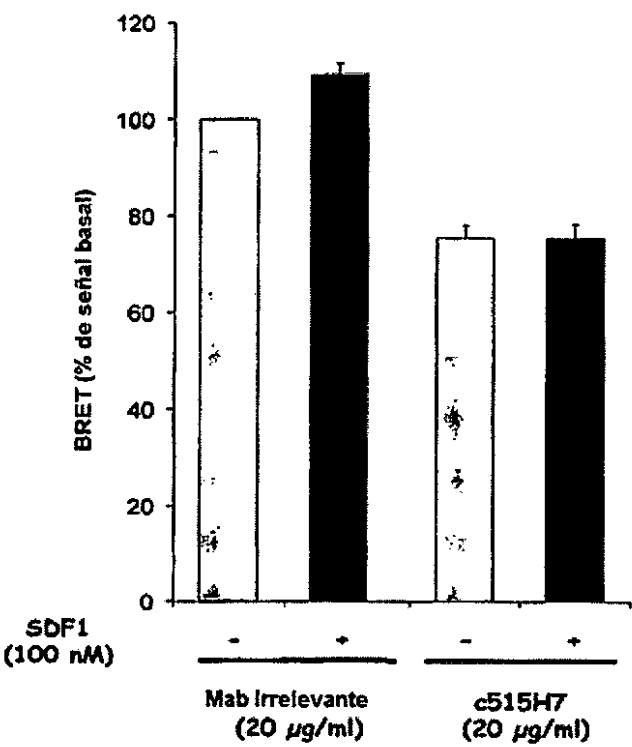


Figura 16

HOJA SUSTITUTA (REGLA 26)

14/16

		FR1-IMGT (1-26)			CDR1-IMGT (27-38)			FR2-IMGT (39-55)			CDR2-IMGT (56-65)		
		1 10 20			30			40 50			60		
515H7 VH IGHV3-49*04													
		EVNLVESGG.GLVQPGGSLRLSCATS			GFTF....TDNY			MSWVRQPPGKALEWLG			IRNKANGYTT		
		EVQLVESGG.GLVQPGGSLRLSCTAS			GFTF....GDYA			MSWVRQAPGKGLEWVGF			IRSKAYGGTT		
VH1		EVQLVESGG.GLVQPGGSLRLSCTAS			GFTF....TDNY			MSWVRQAPGKGLEWVGF			IRNKANGYTT		
VH1 D76N		EVQLVESGG.GLVQPGGSLRLSCTAS			GFTF....TDNY			MSWVRQAPGKGLEWVGF			IRNKANGYTT		
		FR3-IMGT (66-104)			CDR3-IMGT (105-115)			FR4-IMGT (116-125)					
		70 80 90 100											
515H7 VH IGHV3-49*04 IGHJ4*01													
		DYSASVR.GRFTISRDNQSILYLQMNALRAEDSATYYC			ARDVGSNYFDYW			GQGTTLTVSS			EYAASVK.GRFTISRDDSKSIAYLQMNLSLKTEDTAVYYC		
		EYAASVK.GRFTISRDDSKSIAYLQMNLSLKTEDTAVYYC			TR			YFDYW			GQGTTLTVSS		
VH1		EYAASVK.GRFTISRDDSKSIAYLQMNLSLKTEDTAVYYC			ARDVGSNYFDYW			GQGTTLTVSS			EYAASVK.GRFTISRDNSEKSIAYLQMNLSLKTEDTAVYYC		
VH1 D76N		EYAASVK.GRFTISRDNSEKSIAYLQMNLSLKTEDTAVYYC			ARDVGSNYFDYW			GQGTTLTVSS			EYAASVK.GRFTISRDNSEKSIAYLQMNLSLKTEDTAVYYC		

Figura 17

	FR1-IMGT (1-26)			CDR1-IMGT (27-38)			FR2-IMGT (39-55)			CDR2-IMGT (56-65)		
	1	10	20	30	40	50	60					
515H7 VL												
IGKV4-1*01	DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSS	QSLFNSRTRKNY	LAWYQQRPGQSPKLLIY	WA.....S	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSS	QSVLYSSNNKNY	LAWYQQRPGQPPKLLIY	WA.....S				
VL Var2	DIVMTQSPSSLAVSLGERATMSCKSS	QSLFNSRTRKNY	LAWYQQRPGQSPKLLIY	WA.....S	DIVMTQSPSSLAVSLGERATMSCKSS	QSLFNSRTRKNY	LAWYQQRPGQSPKLLIY	WA.....S				
VL Var2.1	DIVMTQSPDSLAVSLGERATMSCKSS	QSLFNSRTRKNY	LAWYQQRPGQPPKLLIY	WA.....S	DIVMTQSPDSLAVSLGERATMSCKSS	QSLFNSRTRKNY	LAWYQQRPGQPPKLLIY	WA.....S				
VL Var2.2	DIVMTQSPDSLAVSLGERATMSCKSS	QSLFNSRTRKNY	LAWYQQRPGQPPKLLIY	WA.....S	DIVMTQSPDSLAVSLGERATMSCKSS	QSLFNSRTRKNY	LAWYQQRPGQPPKLLIY	WA.....S				
VL Var2.3	DIVMTQSPDSLAVSLGERATMSCKSS	QSLFNSRTRKNY	LAWYQQRPGQPPKLLIY	WA.....S	DIVMTQSPDSLAVSLGERATMSCKSS	QSLFNSRTRKNY	LAWYQQRPGQPPKLLIY	WA.....S				
	FR3-IMGT (66-104)			CDR3-IMGT (106-113)			FR4-IMGT (114-123)					
	70	80	90	100								
515H7 VL												
IGKV4-1*01	ARDSGVP.ARFTCGSG..SETYFTLTISRVAEDLAVYYC	MQSFNLR	FGQGTKVEIK	TRESGVP.DRFSGSG..SGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC								
IGKJ1*01			MT	FGQGTKVEIK								
VL Var2	ARDSGVP.ARFTCGSG..SETYFTLTISRVAEDLAVYYC	MQSFNLR	FGQGTKVEIK	ARDSGVP.DRFSGSG..SETYFTLTISRVAEDLAVYYC								
VL Var2.1	ARDSGVP.DRFSGSG..SETYFTLTISRVAEDLAVYYC	MQSFNLR	FGQGTKVEIK	ARDSGVP.DRFSGSG..SETYFTLTISRVAEDLAVYYC								
VL Var2.2	ARDSGVP.DRFSGSG..SETYFTLTISRVAEDLAVYYC	MQSFNLR	FGQGTKVEIK	ARDSGVP.DRFSGSG..SETYFTLTISRVAEDLAVYYC								
VL Var2.3	ARDSGVP.DRFSGSG..SETYFTLTISRVAEDLAVYYC	MQSFNLR	FGQGTKVEIK	ARDSGVP.DRFSGSG..SETYFTLTISRVAEDLAVYYC								

Figura 18

HOJA SUSTITUTA (REGLA 26)

15/16

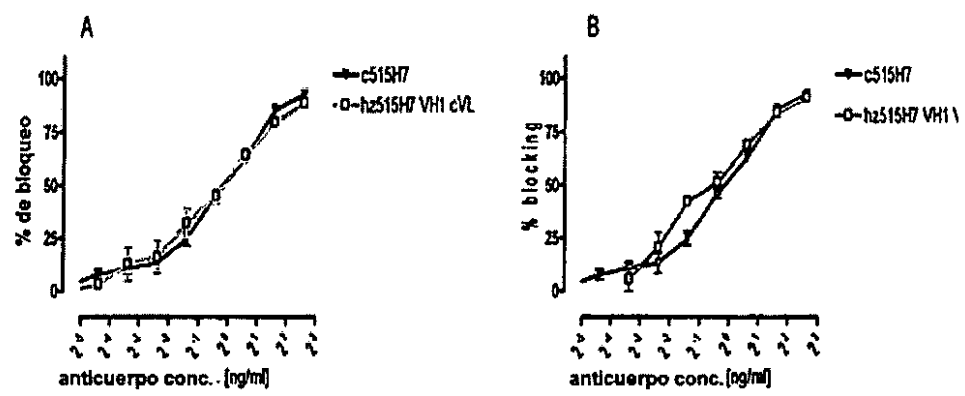


Figura 19

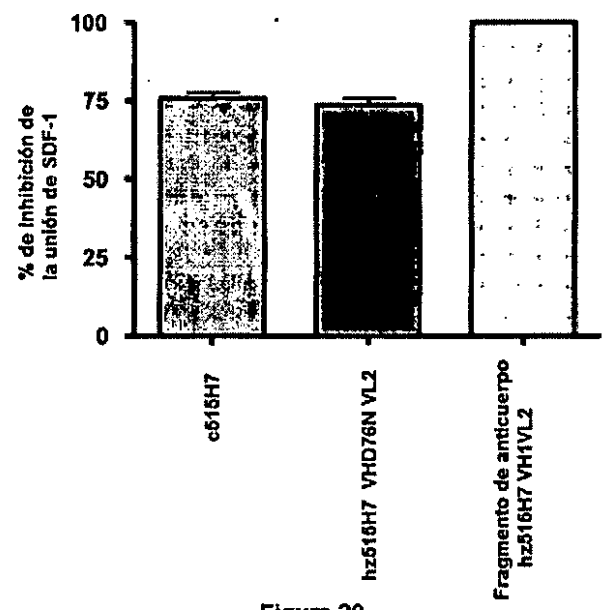


Figura 20

16/16

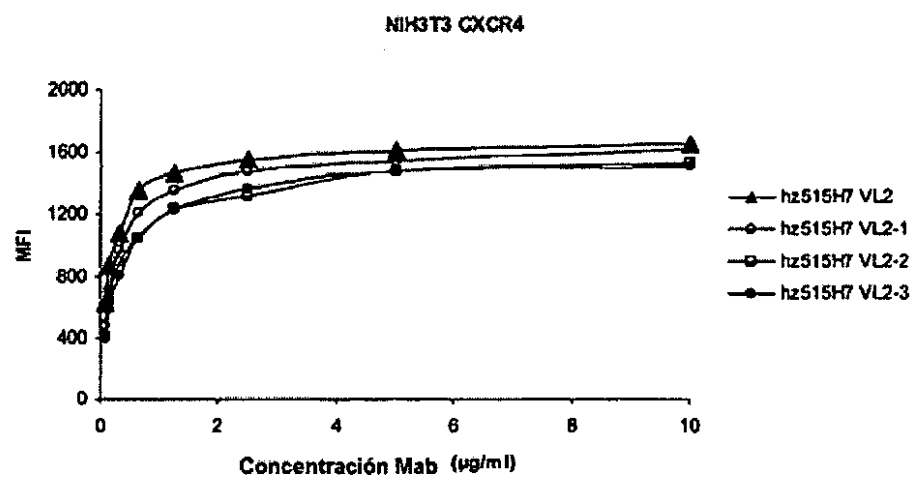


Figura 21

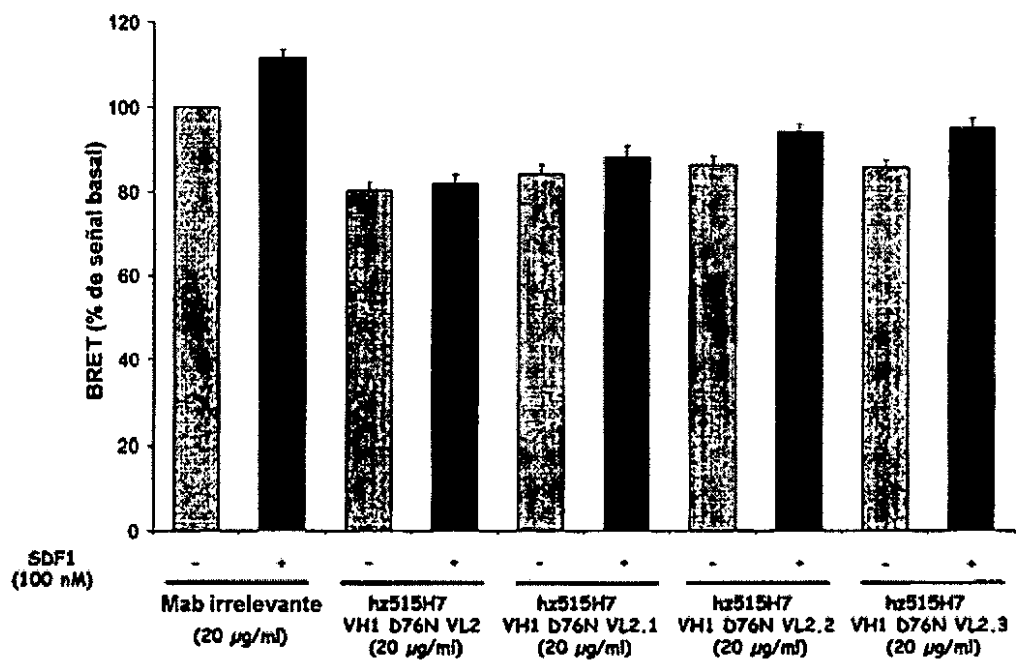


Figura 22

LISTA DE SECUENCIAS

<110> PIERRE FABRE MEDICAMENT
KLINGUER-HAMOUR, Christine

<120> ANTICUERPOS ANTI CXCR4 PARA EL TRATAMIENTO DEL VIH

<130> 356254 D27470

<150> EP09159076.0

<151> 2009-04-29

<150> US61/173680

<151> 2009-04-29

<160> 93

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 12

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

Gln Ser Leu Phe Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr
1 5 10

<210> 2

<211> 3

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Trp Ala Ser
1

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 3

Met Gln Ser Phe Asn Leu Arg Thr
1 5

<210> 4

<211> 8

<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 4

Gly Phe Thr Phe Thr Asp Asn Tyr
1 5

<210> 5
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 5

Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr
1 5 10

<210> 6
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 6

Ala Arg Asp Val Gly Ser Asn Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 7
<211> 112
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 7

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser
20 25 30

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

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Asp Ser Gly Val
50 55 60

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

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

Ser Phe Asn Leu Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 8

<211> 120

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

Glu Val Asn Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Asn
 20 25 30

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

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

Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Gln Ser Ile
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ala Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Thr Tyr
 85 90 95

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

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 9

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 9

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 10

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 10

Trp Ala Ser Ala Arg Asp Ser
1 5

<210> 11

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 11

Asp Asn Tyr Met Ser
1 5

<210> 12

<211> 19

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 12

Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Asp Tyr Ser Ala Ser
1 5 10 15

Val Arg Gly

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 13

Asp Val Gly Ser Asn Tyr Phe Asp Tyr
1 5

- <210> 14
- <211> 36
- <212> ADN
- <213> Mus musculus

<400> 14
cagagtctgt tcaacagtcg aacccgaaag aactac 36

- <210> 15
- <211> 9
- <212> ADN
- <213> Mus musculus

<400> 15
tgggcatcc 9

- <210> 16
- <211> 24
- <212> ADN
- <213> Mus musculus

<400> 16
atgcaatctt ttaatcttcg gacg 24

- <210> 17
- <211> 24
- <212> ADN
- <213> Mus musculus

<400> 17
gggttcacct tcactgataa ctac 24

- <210> 18
- <211> 30
- <212> ADN
- <213> Mus musculus

<400> 18
attagaaaca aagctaattgg ttacacaaca 30

- <210> 19
- <211> 33
- <212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 19

gcaagagatg tcggttccaa ctactttgac tac 33

<210> 20

<211> 336

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 20

gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctggctgtgt cagcaggaga gaaggcact 60

atgagctgca aatccagtca gagtctgttc aacagtcgaa cccgaaagaa ctacttggct 120

tggtaccagc agaagccagg gcagtctcct aaactgctga tctactgggc atccgctagg 180

gattctgggg tccctgctcg cttcacaggc agtggatctg agacatattt cactctcacc 240

atcagccgtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gcatgcaatc tttaaatctt 300

cggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa 336

<210> 21

<211> 360

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 21

gaggtgaacc tgggtggagtc tggaggaggc ttggtacagc ctgggggttc tctgagactc 60

tctgtgcaa cttctgggtt caccttcaact gataactaca tgagttgggt ccgccagcct 120

ccaggaaagg cacttgagtg gttgggcttt attagaaaca aagctaattg ttacacaaca 180

gactacagtg catctgtgag gggtcgggtc accatctcaa gagataattc ccaaagcatc 240

ctctatcttc aaatgaacgc cctgagagcc gaagacagtg ccacttatta ctgtgcaaga 300

gatgtcgggt ccaactactt tgactactgg ggccaaggca ccactctcac agtctctca 360

<210> 22

<211> 51

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 22

aaatccagtc agagtctgtt caacagtcga acccgaaaga actacttggc t 51

<210> 23

<211> 21
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 23
tgggcatccg ctaggattc t 21

<210> 24
<211> 15
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 24
gataactaca tgagt 15

<210> 25
<211> 57
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 25
ttattagaa acaaagctaa tggttacaca acagactaca gtgcatctgt gaggggt 57

<210> 26
<211> 27
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 26
gatgtcgggt ccaactactt tgactac 27

<210> 27
<211> 352
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 27

Met Glu Gly Ile Ser Ile Tyr Thr Ser Asp Asn Tyr Thr Glu Glu Met
1 5 10 15

Gly Ser Gly Asp Tyr Asp Ser Met Lys Glu Pro Cys Phe Arg Glu Glu
20 25 30

Asn Ala Asn Phe Asn Lys Ile Phe Leu Pro Thr Ile Tyr Ser Ile Ile
35 40 45

Phe Leu Thr Gly Ile Val Gly Asn Gly Leu Val Ile Leu Val Met Gly
50 55 60

Tyr Gln Lys Lys Leu Arg Ser Met Thr Asp Lys Tyr Arg Leu His Leu
65 70 75 80

Ser Val Ala Asp Leu Leu Phe Val Ile Thr Leu Pro Phe Trp Ala Val
85 90 95

Asp Ala Val Ala Asn Trp Tyr Phe Gly Asn Phe Leu Cys Lys Ala Val
100 105 110

His Val Ile Tyr Thr Val Asn Leu Tyr Ser Ser Val Leu Ile Leu Ala
115 120 125

Phe Ile Ser Leu Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Ala Thr Asn Ser
130 135 140

Gln Arg Pro Arg Lys Leu Leu Ala Glu Lys Val Val Tyr Val Gly Val
145 150 155 160

Trp Ile Pro Ala Leu Leu Leu Thr Ile Pro Asp Phe Ile Phe Ala Asn
165 170 175

Val Ser Glu Ala Asp Asp Arg Tyr Ile Cys Asp Arg Phe Tyr Pro Asn
180 185 190

Asp Leu Trp Val Val Val Phe Gln Phe Gln His Ile Met Val Gly Leu
195 200 205

Ile Leu Pro Gly Ile Val Ile Leu Ser Cys Tyr Cys Ile Ile Ile Ser
210 215 220

Lys Leu Ser His Ser Lys Gly His Gln Lys Arg Lys Ala Leu Lys Thr
225 230 235 240

Thr Val Ile Leu Ile Leu Ala Phe Phe Ala Cys Trp Leu Pro Tyr Tyr
245 250 255

Ile Gly Ile Ser Ile Asp Ser Phe Ile Leu Leu Glu Ile Ile Lys Gln
260 265 270

Gly Cys Glu Phe Glu Asn Thr Val His Lys Trp Ile Ser Ile Thr Glu
275 280 285

Ala Leu Ala Phe Phe His Cys Cys Leu Asn Pro Ile Leu Tyr Ala Phe
290 295 300

Leu Gly Ala Lys Phe Lys Thr Ser Ala Gln His Ala Leu Thr Ser Val
305 310 315 320

Ser Arg Gly Ser Ser Leu Lys Ile Leu Ser Lys Gly Lys Arg Gly Gly
325 330 335

His Ser Ser Val Ser Thr Glu Ser Glu Ser Ser Ser Phe His Ser Ser
340 345 350

<210> 28

<211> 356

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Met Ser Ile Pro Leu Pro Leu Leu Gln Ile Tyr Thr Ser Asp Asn Tyr
1 5 10 15

Thr Glu Glu Met Gly Ser Gly Asp Tyr Asp Ser Met Lys Glu Pro Cys
20 25 30

Phe Arg Glu Glu Asn Ala Asn Phe Asn Lys Ile Phe Leu Pro Thr Ile
35 40 45

Tyr Ser Ile Ile Phe Leu Thr Gly Ile Val Gly Asn Gly Leu Val Ile
50 55 60

Leu Val Met Gly Tyr Gln Lys Lys Leu Arg Ser Met Thr Asp Lys Tyr
65 70 75 80

Arg Leu His Leu Ser Val Ala Asp Leu Leu Phe Val Ile Thr Leu Pro
85 90 95

Phe Trp Ala Val Asp Ala Val Ala Asn Trp Tyr Phe Gly Asn Phe Leu

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

Leu Thr Ser Val Ser Arg Gly Ser Ser Leu Lys Ile Leu Ser Lys Gly
 325 330 335

Lys Arg Gly Gly His Ser Ser Val Ser Thr Glu Ser Glu Ser Ser Ser
 340 345 350

Phe His Ser Ser
 355

<210> 29

<211> 360

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Met Glu Asp Phe Asn Met Glu Ser Asp Ser Phe Glu Asp Phe Trp Lys
 1 5 10 15

Gly Glu Asp Leu Ser Asn Tyr Ser Tyr Ser Ser Thr Leu Pro Pro Phe
 20 25 30

Leu Leu Asp Ala Ala Pro Cys Glu Pro Glu Ser Leu Glu Ile Asn Lys
 35 40 45

Tyr Phe Val Val Ile Ile Tyr Ala Leu Val Phe Leu Leu Ser Leu Leu
 50 55 60

Gly Asn Ser Leu Val Met Leu Val Ile Leu Tyr Ser Arg Val Gly Arg
 65 70 75 80

Ser Val Thr Asp Val Tyr Leu Leu Asn Leu Ala Leu Ala Asp Leu Leu
 85 90 95

Phe Ala Leu Thr Leu Pro Ile Trp Ala Ala Ser Lys Val Asn Gly Trp
 100 105 110

Ile Phe Gly Thr Phe Leu Cys Lys Val Val Ser Leu Leu Lys Glu Val
 115 120 125

Asn Phe Tyr Ser Gly Ile Leu Leu Leu Ala Cys Ile Ser Val Asp Arg
 130 135 140

Tyr Leu Ala Ile Val His Ala Thr Arg Thr Leu Thr Gln Lys Arg Tyr
145 150 155 160

Leu Val Lys Phe Ile Cys Leu Ser Ile Trp Gly Leu Ser Leu Leu Leu
 165 170 175

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

Ser Pro Ala Cys Tyr Glu Asp Met Gly Asn Asn Thr Ala Asn Trp Arg
 195 200 205

Met Leu Leu Arg Ile Leu Pro Gln Ser Phe Gly Phe Ile Val Pro Leu
 210 215 220

Leu Ile Met Leu Phe Cys Tyr Gly Phe Thr Leu Arg Thr Leu Phe Lys
225 230 235 240

Ala His Met Gly Gln Lys His Arg Ala Met Arg Val Ile Phe Ala Val
 245 250 255

Val Leu Ile Phe Leu Leu Cys Trp Leu Pro Tyr Asn Leu Val Leu Leu
 260 265 270

Ala Asp Thr Leu Met Arg Thr Gln Val Ile Gln Glu Thr Cys Glu Arg
 275 280 285

Arg Asn His Ile Asp Arg Ala Leu Asp Ala Thr Glu Ile Leu Gly Ile
 290 295 300

Leu His Ser Cys Leu Asn Pro Leu Ile Tyr Ala Phe Ile Gly Gln Lys
305 310 315 320

Phe Arg His Gly Leu Leu Lys Ile Leu Ala Ile His Gly Leu Ile Ser
 325 330 335

Lys Asp Ser Leu Pro Lys Asp Ser Arg Pro Ser Phe Val Gly Ser Ser
 340 345 350

Ser Gly His Thr Ser Thr Thr Leu
355 360

<210> 30
<211> 8
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 30

Lys Gln Ser Tyr Asn Leu Arg Thr
1 5

<210> 31
<211> 8
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 31

Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr Gly
1 5

<210> 32
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 32

Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr
1 5

<210> 33
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 33

Ala Arg Gly Arg Gln Phe Gly Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 34
<211> 112
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 34

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

Glu Lys Val Thr Met Arg Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser
20 25 30

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

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Phe Trp Ala Ser Ile Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

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

Ser Tyr Asn Leu Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 35

<211> 116

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 35

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

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

Gly Val Tyr Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
65 70 75 80

Lys Met Asn Thr Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Gly Arg Gln Phe Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 36
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 36

Trp Ala Ser Ile Arg Glu Ser
1 5

<210> 37
<211> 8
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 37

Lys Gln Ser Tyr Asn Leu Arg Thr
1 5

<210> 38
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 38

Asp Tyr Gly Val Tyr
1 5

<210> 39
<211> 16
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 39

Met Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 40
<211> 8
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 40

Gly Arg Gln Phe Gly Phe Asp Tyr
1 5

<210> 41
<211> 36
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 41

cagagtctgt tcaacagtag aaccgaaag aactac 36

<210> 42
<211> 24
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 42

aagcaatctt ataattctcg gacg 24

<210> 43
<211> 24
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 43

gggttctcat taaccgacta tggc 24

<210> 44
<211> 21
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 44

atatggggtg atggaaccac a 21

<210> 45
<211> 30
<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 45
gccaggggta gacagttcgg gtttgactac 30

<210> 46
<211> 336
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 46
gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctggctgtgt cagcaggaga gaaggtcact 60
atgaggtgca aatccagtca gagtctgttc aacagtagaa cccgaaagaa ctacttggt 120
tggtaccaac agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tcttctgggc atccattagg 180
gaatctgggg tccctgatcg ctccacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 240
atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gcaagcaatc ttataatctt 300
cggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa 336

<210> 47
<211> 348
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 47
caggtgcagc tgaaggagtc tgggcctggc ctggtggcgc cctcacagag cctgtccatc 60
acatgcaccg tctcagggtt ctcattaacc gactatggtg tatactgggt tcgccagcct 120
ccaggaaagg gtcaggagt gctgggaatg atatggggtg atggaaccac agactataat 180
tcagctctca aatccagact gagcatcagt aaggacaact ccaagagcca agttttctta 240
aaaatgaaca ctctgcaaac tgatgacaca gccaggtatt actgtgccag gggtagacag 300
ttcgggtttg actactgggg ccaaggcacc acgtcacag tctctca 348

<210> 48
<211> 51
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 48
aatccagtc agagtctgtt caacagtaga acccgaaaga actactggc t 51

<210> 49

<211> 21
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 49
tgggcatcca ttagggaatc t 21

<210> 50
<211> 24
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 50
aagcaatctt ataattctcg gacg 24

<210> 51
<211> 15
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 51
gactatggtg tatac 15

<210> 52
<211> 48
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 52
atgatatggg gtgatggaac cacagactat aattcagctc tcaaatcc 48

<210> 53
<211> 24
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 53
ggtagacagt tcgggtttga ctac 24

<210> 54
<211> 359
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 54

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Asn
20 25 30

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

Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ala Ala
50 55 60

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

Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

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

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

Ser Glu Ser Lys Ser Thr Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
130 135 140

Leu Ala Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser
145 150 155 160

Gln Ser Leu Phe Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr
165 170 175

Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser
180 185 190

Ala Arg Asp Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Glu
195 200 205

Thr Tyr Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala
210 215 220

Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ser Phe Asn Leu Arg Thr Phe Gly Gln Gly

225 230 235 240
Thr Lys Val Glu Ile Lys Thr Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe
 245 250 255

Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val
 260 265 270

Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp
 275 280 285

Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr
 290 295 300

Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr
305 310 315 320

Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val
 325 330 335

Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly
 340 345 350

Glu His His His His His His
 355

<210> 55
<211> 1077
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 55
gaggtgcagc tgggtggagtc tggcggagga ctggtgcagc ccggcagaag cctgagactg 60

agctgcaccg ccageggctt caccttcacc gacaactaca tgtcctgggt gcgccaggcc 120

cctggaaagg gcctggaatg ggtgggcttc atccggaaca aggccaacgg ctacaccaca 180

gagtacgccg ccagcgtgaa gggccggttc accatcagcc gggacgacag caagagcatt 240

gcctacctgc agatgaacag cctgaaaacc gaggacaccg ccgtgtacta ctgcgccagg 300

gacgtgggca gcaactactt cgactactgg ggccagggca cactggtgac cgtgtctagc 360

caattgaaaa gcagcggcag cggtagcgaa agcaagtcga ccgacatcgt gatgaccag 420

agccccagca gcctggccgt gtctctgggc gagcgggcca ccatgagctg caagagcagc 480
cagagcctgt tcaacagccg gacccggaag aactacctgg cctggatatca gcagaagccc 540
ggccagtccc ccaagctgct gatctactgg gccagcgcca gagatagcgg cgtgcccgct 600
cgctttaccg gcagcggcag cgagacctac ttcacctga ccatcagccg ggtgcaggcc 660
gaggacctcg ccgtgtacta ctgcatgcag agcttcaacc tgcggacctt cggccagggc 720
accaaggtgg agatcaagac gcgtacggtg gccgctocca gcgtgttcat ctcccccca 780
agcgacgagc agctgaagag cggcaccgcc agcgtggtgt gtcgtctgaa caattctac 840
cccagggagg ccaaggtgca gtggaagggtg gacaacgccc tgcagagcgg caacagccag 900
gagagcgta ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag caccctgacc 960
ctgagcaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gtgaggtgac ccaccagggc 1020
ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac aggggcgagc accatcatca ccaccat 1077

<210> 56
<211> 446
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 56 .

Glu Val Asn Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Asn
20 25 30

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

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

Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Gln Ser Ile
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ala Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Thr Tyr
85 90 95

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

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

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

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

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

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

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
 195 200 205

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

Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240

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

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

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

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

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys

305 310 315 320

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 57
<211> 446
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 57

Glu Val Asn Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Asn
 20 25 30

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

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

Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Gln Ser Ile
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ala Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Thr Tyr
85 90 95

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

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

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

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

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

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

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
195 200 205

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

Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 58

<211> 445

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 58

Glu Val Asn Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Asn
20 25 30

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

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

Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Gln Ser Ile
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ala Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Thr Tyr
85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

435 440 445

<210> 59

<211> 219

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 59

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser
20 25 30

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

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Asp Ser Gly Val
50 55 60

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

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

Ser Phe Asn Leu Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

<210> 60
 <211> 1341
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<400> 60
 gaagtgaacc tggaggagtc tggcggcgga ctggtgcagc ctgggggcag cctgagactg 60
 agctgcgcca cctccggctt caccttcacc gacaactaca tgagctgggt gcgccagccc 120
 cctggcaagg ccttggaatg gctgggcctc atccggaaca aggccaacgg ctacaccacc 180
 gactacagcg ccagcgtgcg gggcagattc accatcagcc gggacaacag ccagagcatc 240
 ctgtacctgc agatgaacgc cctgcgggcc gaggacagcg ccacctacta ctgtgcccg 300
 gacgtgggca gcaactactt cgactactgg ggccagggca ccacactgac cgtgtccagc 360
 gccagcacca agggcccaag cgtgttcccc ctggccccct gctccagaag caccagcgag 420
 agcacagccg ccttgggctg cctggtgaag gactacttcc ccgagccccg gaccgtgtcc 480
 tggaacagcg gagccctgac cagcggcggtg cacaccttcc ccgccgtgct gcagagcagc 540
 ggcctgtaca gcctgagcag cgtgggtgacc gtgccagca gcagcctggg caccaagacc 600
 tacacctgta acgtggacca caagcccage aacaccaagg tggacaagag ggtggagagc 660
 aagtagggcc caccctgccc cagctgcccc gcccccgagt tcttgggcgg acccagcgtg 720
 ttctgttcc cccccaagcc caaggacacc ctgatgatca gcagaacccc cgaggtgacc 780
 tgtgtgtggg tggacgtgtc ccaggaggac cccgaggctc agttcaactg gtacgtggac 840
 ggcgtggagg tgcacaacgc caagaccaag ccagagagg agcagtttaa cagcacctac 900
 cgggtggtgt ccgtctgac cgtgtgcac caggactggc tgaacggcaa agagtacaag 960
 tgtaaggtct ccaacaaggg cctgccaagc agcatcgaaa agaccatcag caaggccaag 1020
 ggccagccta gagagcccca ggtctacacc ctgccacca gccaaagga gatgaccaag 1080

aaccaggtgt cctgacctg tctggtgaag ggcttctacc caagcgacat cgccgtggag 1140
 tgggagagca acggccagcc cgagaacaac tacaagacca cccccccagt gctggacagc 1200
 gacggcagct tcttctgtg cagcaggctg accgtggaca agtccagatg gcaggagggc 1260
 aacgtcttta gctgctccgt gatgcacgag gccctgcaca accactacac ccagaagagc 1320
 ctgagcctgt ccctgggctg a 1341

<210> 61
 <211> 1341
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<400> 61
 gaagtgaacc tgggtggagtc tggcggcgga ctggtgcagc ctggggggcag cctgagactg 60
 agctgcgcca cctccgggtt caccttcacc gacaactaca tgagctgggt gcgccagccc 120
 cctggcaagg ccctggaatg gctgggcttc atccggaaca aggccaacgg ctacaccacc 180
 gactacagcg ccagcgtgcg gggcagattc accatcagcc gggacaacag ccagagcatc 240
 ctgtacctgc agatgaacgc cctgcgggcc gaggacagcg ccacctacta ctgtccccgg 300
 gacgtgggca gcaactactt cgactactgg ggccagggca ccacactgac cgtgtccage 360
 gccagcacca agggcccaag cgtgttcccc ctggccccct gctccagaag caccagcgag 420
 agcacagccg ccctgggctg cctggtgaag gactacttcc ccgagcccgt gaccgtgtcc 480
 tggaacagcg gagccctgac cagcggcgtg cacaccttcc ccgccgtgct gcagagcagc 540
 ggccgtlaca gcctgagcag cgtggtgacc gtgcccagca gcagcctggg caccaagacc 600
 tacacctgta acgtggacca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag ggtggagagc 660
 aagtacggcc caccctgcc cccctgccc gcccccgagt tctggggcg acccagcgtg 720
 tctctgttcc ccccaagcc caaggacacc ctgatgatca gcagaacccc cgaggtgacc 780
 tgttggtgg tggacgtgtc ccaggaggac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggac 840
 ggctggagg tgcaaacgc caagaccaag cccagagagg agcagtttaa cagcacctac 900
 cgggtggtgt ccgtgctgac cgtgctgcac caggactggc tgaacggcaa agagtacaag 960
 tgtaaggtct ccaacaagg cctgccaagc agcatcgaag agaccatcag caaggccaag 1020
 ggccagccta gagageccca ggtctacacc ctgccacca gccaaagagga gatgaccaag 1080
 aaccaggtgt cctgacctg tctggtgaag ggcttctacc caagcgacat cgccgtggag 1140

tgggagagca acggccagcc cgagaacaac tacaagacca cccccccagt gctggacagc 1200
 gacggcagct tcttctgta cagcaggctg accgtggaca agtccagatg gcaggagggc 1260
 aacgtcttta gctgtccgt gatgcacgag gccctgcaca accactacac ccagaagagc 1320
 ctgagcctgt ccctgggctg a 1341

<210> 62
 <211> 1338
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<400> 62
 gaagtgaacc tggaggagtc tggcggcgga ctggtgcagc ctgggggcag cctgagactg 60
 agctgcgcca cctccggctt caccttcacc gacaactaca tgagctgggt gcgccagccc 120
 cctggcaagg ccctggaatg gctgggcttc atccggaaca aggccaacgg ctacaccacc 180
 gactacagcg ccagcgtgcg gggcagattc accatcagcc gggacaacag ccagagcate 240
 ctgtacctgc agatgaacgc cctgcgggcc gaggacagcg ccacctacta ctgtcccgg 300
 gacgtgggca gcaactactt cgactactgg ggccagggca ccacttgac cgtgtccagc 360
 gccagcacca agggcccaag cgtgttcccc ctggccccct gctccagaag caccagcgag 420
 agcacagccg ccctgggctg cctgggtgaag gactacttcc ccgagcccgt gaccgtgtcc 480
 tggaaacagcg gagccctgac cagcggcgtg cacaccttcc ccgccgtgct gcagagcagc 540
 ggctgtaca gctgagcag cgtggtgacc gtgccaagca gcaacttgg caccagacc 600
 tacacctgta acgtggacca caagcccagc aacaccaagg tggacaagac cgtggagagg 660
 aagtgtgtg tggagtggcc cccctgcccc gccccccag tggccggacc cagcgtgttc 720
 ctgttcccc ccaagcccaa ggacacctg atgatcagca gaacccccga ggtgacctgt 780
 gtggtgggtg acgtgtccca cgaggacccc gaggtgcagt tcaactggta cgtggacggc 840
 gtggagggtg acaacgcaa gaccaagccc agagaggagc agttaacag caccttccgg 900
 gtggtgtccg tgctgacctg ggtgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgt 960
 aaggtctcca acaagggcct gccagccccc atcgaaaaga ccatcagcaa gaccaaggga 1020
 cagccaagag agccacaggt ctacacctg cccccagca gggaggagat gaccaagaac 1080
 caggtgtccc tgacctgtct ggtgaagggc ttctaccaa gcgacatgc cgtggagtgg 1140

gagagcaacg gccagcccga gaacaactac aagaccaccc cccaatgct ggacagcgac 1200
ggcagcttct tctgtacag caagctgaca gtggacaaga gcagatggca gcagggcaac 1260
gtgttcagct gctccgtgat gcacgaggcc ctgcacaacc actacacca gaagagcctg 1320
agcctgtccc caggctga 1338

<210> 63
<211> 660
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 63
gacatcgtga tgagccagag cccagcagc ctggccgtgt ctgccggcga gaaagtgacc 60
atgagctgca agagcagcca gaggctgttc aacagccgga cccggaagaa ctacctggcc 120
tggtatcagc agaagccccg ccagtccccc aagctgctga tctactgggc cagcgccaga 180
gacagcggcg tgcccgccag attcaccggc agcggcagcg agacatactt caccctgacc 240
atcagccggg tgcaggccga ggatctggcc gtgtactact gcatgcagag ctcaacctg 300
cggacctttg gcggcggaac aaagctggaa atcaagcgta cgggtggccg tcccagcgtg 360
ttcatcttcc cccaagega cgagcagctg aagagcggca ccgccagcgt ggtgtgtctg 420
ctgaacaact tctaccccag ggaggccaag gtgcagtgga aggtggacaa cgccctgcag 480
agcggcaaca gccaggagag cgtcaccgag caggacagca aggactccac ctacagcctg 540
agcagcacc tgaccctgag caaggccgac tacgagaagc acaaggtgta cgcctgtgag 600
gtgacccacc agggcctgtc cagccccgtg accaagagct tcaacagggg cgagtgtgta 660

<210> 64
<211> 120
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 64

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Asn
20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

354045

Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ala Ala

505560

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Ser Ile

65707580

Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr

859095

Tyr Cys Ala Arg Asp Val Gly Ser Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln

100105110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115120

<210> 65

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 65

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

151015

Glu Arg Ala Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser

202530

Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

354045

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Asp Ser Gly Val

505560

Pro Ala Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Glu Thr Tyr Phe Thr Leu Thr

65707580

Ile Ser Arg Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln

859095

Ser Phe Asn Leu Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 66
<211> 112
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 66

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

Glu Arg Ala Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser
20 25 30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Asp Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Glu Thr Tyr Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

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

Ser Phe Asn Leu Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 67
<211> 446
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 67

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Asn
20 25 30

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

Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ala Ala
 50 55 60

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

Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95

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

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

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

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

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

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

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
 195 200 205

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

Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 68

<211> 446

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 68

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Asn
 20 25 30

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

Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ala Ala
 50 55 60

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

Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95

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

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

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

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

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

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

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
 195 200 205

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

Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

420 425 430

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

<210> 69
<211> 445
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 69

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Asn
20 25 30

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

Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ala Ala
50 55 60

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

Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 70
<211> 219
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 70

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

Glu Arg Ala Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser
 20 25 30

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

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Asp Ser Gly Val
 50 55 60

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

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

Ser Phe Asn Leu Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

115 120 125

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

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

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

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

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

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

<210> 71
<211> 219
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 71

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

Glu Arg Ala Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser
20 25 30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Asp Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Glu Thr Tyr Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

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

Ser Phe Asn Leu Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

- <210> 72
- <211> 360
- <212> ADN
- <213> Mus musculus

<400> 72
gaggtgcagc tgggtggagtc tggcggagga ctggtgcagc ccggcagaag cctgagactg 60
agctgcaccg ccagcggcctt caccttcacc gacaactaca tgtcctgggt gcgccaggcc 120
cctggaaagg gcctggaatg ggtgggcttc atccggaaca aggccaacgg ctacaccaca 180
gagtagcccg ccagcgtgaa gggecggctc accatcagcc gggacaacag caagagcatt 240
gcctacctgc agatgaacag cctgaaaacc gaggacaccg ccgtgtacta ctgcgccagg 300
gacgtgggca gcaactactt cgactactgg ggccagggca cactggtgac cgtgtctagc 360

<210> 73
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<400> 73
 gacatcgtga tgaccagag cccagcagc ctggccgtgt ctctgggcga gcgggccacc 60
 atgagctgca agagcagcca gagcctgttc aacagccgga cccggaagaa ctacctggcc 120
 tggatcagc agaagcccgg ccagtccccc aagctgctga tctactgggc cagcgccaga 180
 gatagcggcg tgcccgtcgt ctttaccggc agcggcagcg agacctactt caccctgacc 240
 atcagccggg tgcaggccga ggacctgcc gtgtactact gcatgcagag ctcaacctg 300
 cggaccttcg gccagggcac caaggtggag atcaag 336

<210> 74
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<400> 74
 gacatcgtga tgaccagtc ccccgactcc ctggccgtgt ctctgggcga gcgggccacc 60
 atgtctgca agtctccca gtccctgttc aactcccgga cccggaagaa ctacctggcc 120
 tggatcagc agaagcccgg ccagccccc aagctgctga tctactgggc ctctgctaga 180
 gactctggcg tgcccgacag attctccggc tccggcagcg agacatactt caccctgacc 240
 atctccggg tgcaggccga ggatctggcc gtgtactact gcatgcagtc ctcaacctg 300
 cggaccttcg gccagggcac caaggtggaa atcaag 336

<210> 75
 <211> 1341
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<400> 75
 gaggtgcagc tggaggagtc tggcggagga ctggtgcagc ccggcagaag cctgagactg 60
 agctgcaccg ccagcggctt caccctcacc gacaactaca tgtctgggt gcgccaggcc 120
 cctggaaagg gcctggaatg ggtgggcttc atccggaaca aggccaacgg ctacaccaca 180
 gagtacgccg ccagcgtgaa gggccggctt accatcagcc gggacaacag caagagcatt 240
 gcctacctgc agatgaacag cctgaaaacc gaggacaccg ccgtgtacta ctgcgccagg 300

gacgtgggca gcaactactt cgactactgg ggccagggca cactggtgac cgtgtctagc 360
gccagcacca agggcccaag cgtgttcccc ctggccccct gctccagaag caccagcgag 420
agcacagccg ccctgggctg cctggtgaag gactacttcc ccgagcccgt gaccgtgtcc 480
tggaacagcg gagccctgac cagcggcgtg cacaccttcc ccgccgtgct gcagagcagc 540
ggcctgtaca gcctgagcag cgtggtgacc gtgccagca gcagcctggg caccaagacc 600
tacacctgta acgtggacca caagcccage aacaccaagg tggacaagag ggtggagagc 660
aagtacggcc caccctgcc cagctgccc gcccccgagt tctggggcg acccagcgtg 720
ttcctgttcc ccccaagcc caaggacacc ctgatgatca gcagaacccc cgaggtgacc 780
tgtgtggtgg tggacgtgtc ccaggaggac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggac 840
ggcgtggagg tgcacaacgc caagaccaag ccagagagg agcagttta cagcacctac 900
cgggtggtgt ccgtgtgac cgtgtgcac caggactggc tgaacggcaa agagtacaag 960
tgtaaggtct ccaacaagg cctgccaagc agcatgaaa agaccatcag caaggccaag 1020
ggccagccta gagagcccca ggtctacacc ctgccacca gccagagga gatgaccaag 1080
aaccaggtgt ccctgacctg tctggtgaag ggcttctacc caagcgacat cgccgtggag 1140
tgggagagca acggccagcc cgagaacaac tacaagacca cccccccagt gctggacagc 1200
gacggcagct tcttctgta cagcaggctg accgtggaca agtccagatg gcaggagggc 1260
aacgtcttta gctgtccgt gatgcaagc gccctgcaca accactacac ccagaagagc 1320
ctgagcctgt ccctgggctg a 1341

<210> 76
<211> 1341
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 76
gaggtgcagc tgggtggagtc tggcggagga ctggtgcagc ccggcagaag cctgagactg 60
agctgcaccg ccagcggtt caccctcacc gacaactaca tgtcctgggt gcgccaggcc 120
cctggaaagg gcctggaatg ggtgggcttc atccggaaca aggccaacgg ctacaccaca 180
gagtacgccg ccagcgtgaa gggccggttc accatcagcc gggacaacag caagagcatt 240
gcctacctgc agatgaacag cctgaaaacc gaggacaccg ccgtgtacta ctgcgccagg 300

gacgtgggca gcaactactt cgactactgg ggccagggca cactggtgac cgtgtctagc 360
 gccagcacca agggcccaag cgtgttcccc ctggccccct gctccagaag caccagcgag 420
 agcacagccg ccctgggctg cctggtgaag gactacttcc ccgagcccgt gaccgtgtcc 480
 tggaacagcg gagccctgac cagcggcgtg cacaccttcc ccgccgtgct gcagagcagc 540
 ggctgtaca gcctgagcag cgtggtgacc gtgccagca gcagcctggg caccaagacc 600
 tacacctgta acgtggacca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag ggtggagagc 660
 aagtacggcc caccctgccc ccctgcccga gccccgagt tcctgggcgg acccagcgtg 720
 ttctgttcc cccccaagcc caaggacacc ctgatgatca gcagaacccc cgaggtgacc 780
 tgtgtggtgg tggacgtgtc ccaggaggac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggac 840
 ggcggtggagg tgcacaacgc caagaccaag ccagagagg agcagtttaa cagcacctac 900
 cgggtggtgt ccgtgtgac cgtgtgcac caggactggc tgaacggcaa agagtacaag 960
 tgtaaggtct ccaacaaggg cctgccaagc agcatcgaaa agaccatcag caaggccaag 1020
 ggccagccta gagagcccca ggtctacacc ctgccacca gccaaagagg gatgaccaag 1080
 aaccaggtgt ccctgacctg tctggtgaag ggcttctacc caagcgacat cgccgtggag 1140
 tgggagagca acggccagcc cgagaacaac tacaagacca cccccccagt gctggacagc 1200
 gacggcagct tcttctgta cagcaggctg accgtggaca agtccagatg gcaggagggc 1260
 aacgtcttta gctgtccgt gatgcacgag gccctgcaca accactacac ccagaagagc 1320
 ctgagcctgt ccctgggctg a 1341

<210> 77

<211> 1338

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 77

gaggtgcagc tggaggagtc tggcggagga ctggtgcagc ccggcagaag cctgagactg 60
 agctgcaccg ccagcggctt caccttacc gacaactaca tgtctgggt gcgccagggc 120
 cctggaaagg gcctggaatg ggtgggcttc atccggaaca aggccaacgg ctacaccaca 180
 gagtacgccg ccagcgtgaa gggccggttc accatcagcc gggacaacag caagagcatt 240
 gcctacctgc agatgaacag cctgaaaacc gaggacaccg ccgtgtacta ctgcgccagg 300
 gacgtgggca gcaactactt cgactactgg ggccagggca cactggtgac cgtgtctagc 360

gccagcacca agggcccaag cgtgtcccc ctggccccct gctccagaag caccagcgag 420
 agcacagccg ccctgggctg cctgggtgaag gactacttcc ccgagcccgt gaccgtgtcc 480
 tggaaacagcg gagccctgac cagcggcgtg cacaccttcc ccgccgtgct gcagagcagc 540
 ggctgtaca gcctgagcag cgtggtgacc gtgccaagca gcaacttcgg caccagacc 600
 tacacctgta acgtggacca caagcccagc aacaccaagg tggacaagac cgtggagagg 660
 aagtgtgtg tggagtgtcc cccctgccca gccccccag tggccggacc cagcgtgttc 720
 ctgttcccc ccaagcccaa ggacacctg atgatcagca gaacccccga ggtgacctgt 780
 gtggtgtgg acgtgtccca cgaggacccc gaggtgcagt tcaactggta cgtggacggc 840
 gtggagggtgc acaacgcaa gaccaagccc agagaggagc agttaacag caccttccgg 900
 gtggtgtccg tgetgacctg ggtgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgt 960
 aaggcttcca acaagggcct gccagcccc atcgaaaaga ccatcagcaa gaccaaggga 1020
 cagccaagag agccacaggt ctacacctg cccccagca gggaggagat gaccaagaac 1080
 caggtgtccc tgacctgtct ggtgaagggc ttctaccaa gcgacatgc cgtggagtgg 1140
 gagagcaacg gccagcccga gaacaactac aagaccaccc ccccaatgct ggacagcgac 1200
 ggcagcttct tctgtlacag caagctgaca gtggacaaga gcagatggca gcagggaac 1260
 gtgttcagct gctccgtgat gcagaggcc ctgcacaacc actacacca gaagagcctg 1320
 agcctgtccc caggtga 1338

<210> 78
 <211> 660
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<400> 78
 gacatcgtga tgaccagag cccagcagc ctggccgtgt ctctgggcga gcgggccacc 60
 atgagctgca agagcagcca gagcctgttc aacagccgga cccggaagaa ctacctggcc 120
 tggatcagc agaagcccgg ccagtcccc aagctgctga tctactgggc cagcgccaga 180
 gatagcggcg tccccgtcg cttaccggc agcggcagcg agacctactt cacctgacc 240
 atcagccggg tgcaggccga ggacctgcc gtgtactact gcatgcagag cttaacctg 300
 cggaccttcg gccagggcac caaggtggag atcaagcgta cgttgccgc tcccagcgtg 360

ttcattttcc ccccaagcga cgagcagctg aagagcggca ccgccagcgt ggtgtgtctg 420
ctgaacaact tctaccccag ggaggccaag gtgcagtgga aggtggacaa cgccctgcag 480
agcggcaaca gccaggagag cgtcaccgag caggacagca aggactccac ctacagcctg 540
agcagcacc tgacctgag caaggccgac tacgagaagc acaaggtgta cgcctgtgag 600
gtgaccacc agggcctgtc cagccccgtg accaagagct tcaacagggg cgagtgtga 660

<210> 79
<211> 660
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 79
gacatcgtga tgaccagtc ccccgactcc ctggccgtgt ctctgggcca gcgggccacc 60
atgtcctgca agtcctccca gtccctgttc aactcccgga cccggaagaa ctacctggcc 120
tggtatcagc agaagcccgg ccagcccccc aagctgtgta tctactgggc ctctgctaga 180
gactctggcg tgcccagacag attctccggc tccggcagcg agacatactt caccctgacc 240
atctcccggg tgcaggccga g gatctggcc gtgtactact gcatgcagtc cttaacctg 300
cggaccttcg gccagggcac caaggtggaa atcaagcgtg cgggtggccgc tccagcgtg 360
ttcattttcc ccccaagcga cgagcagctg aagagcggca ccgccagcgt ggtgtgtctg 420
ctgaacaact tctaccccag ggaggccaag gtgcagtgga aggtggacaa cgccctgcag 480
agcggcaaca gccaggagag cgtcaccgag caggacagca aggactccac ctacagcctg 540
agcagcacc tgacctgag caaggccgac tacgagaagc acaaggtgta cgcctgtgag 600
gtgaccacc agggcctgtc cagccccgtg accaagagct tcaacagggg cgagtgtga 660

<210> 80
<211> 450
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 80

Glu Val Asn Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Asn
20 25 30

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

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

Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Gln Ser Ile
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ala Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Thr Tyr
85 90 95

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

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

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

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

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

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

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

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

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile

245

250

255

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

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

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300

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

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

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

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

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400

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

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

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

Gly Lys
 450

<210> 81
 <211> 1353
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<400> 81
 gaagtgaacc tggaggagtc tggcggcgga ctggtgcagc ctgggggcag cctgagactg 60
 agctgcgcca cctccggctt caccttcacc gacaactaca tgagctgggt gcgccagccc 120
 cctggcaagg ccttggaatg gctgggcttc atccggaaca aggccaacgg ctacaccacc 180
 gactacagcg ccagcgtgcg gggcagattc accatcagcc gggacaacag ccagagcacc 240
 ctgtacctgc agatgaacgc cctgcggggc gaggacagcg ccacctacta ctgtcccgg 300
 gacgtgggca gcaactactt cgactactgg ggccagggca ccacttgac cgtgtccagc 360
 gccagcacca agggccctc cgtgttccc ctagcccca gcagcaagag caccagcggc 420
 ggcacagccg ccttgggctg cctggtgaag gactacttcc ccgagcccgt gaccgtgtcc 480
 tggaacagcg gagccctgac ctccggcgtg cacaccttcc ccgccgtgt gcagagcagc 540
 ggcctgtaca gcctgagcag cgtggtgacc gtcccagca gcagcctggg caccagacc 600
 tacatctgta acgtgaacca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agtggagccc 660
 aagagetgtg acaagacca cacctgcccc cctgcccag ccccgagct gctgggcgga 720
 cccagcgtgt tctgttccc cccaagccc aaggacccc tgatgatcag cagaaccccc 780
 gaggtgacct gtgtggtggt ggacgtgtcc cagaggacc cagagtgaa gttcaactgg 840
 tacgtggacg gcgtggaggt gcacaacgcc aagaccaagc ccagagagga gcagtacaac 900
 agcacctaca ggggtggtgc cgtgtgacc gtgtgcacc aggactggt gaacggcaag 960
 gagtacaagt gtaagggtgc caacaaggcc ctgccagccc caatcgaaa gaccatcagc 1020
 aaggccaagg gccagccaag agagccccag gtgtacccc tgccaccag caggagaggag 1080
 atgaccaaga accaggtgtc cctgacctgt ctggtgaagg gcttctacc aagcgacatc 1140
 gccgtggagt gggagagcaa cggccagccc gagaacaact acaagaccac cccccagtg 1200
 ctggacagcg acggcagctt ctctctgtac agcaagctga ccgtggacaa gagcagatgg 1260
 cagcagggca acgtgttcag ctgtccgtg atgcacgagg cctgcacaa ccactacacc 1320
 cagaagagcc tgagcctgtc ccaggcaag tga 1353

<210> 82
<211> 112
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 82

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

Glu Arg Ala Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser
20 25 30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Asp Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Glu Thr Tyr Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

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

Ser Phe Asn Leu Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 83
<211> 112
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 83

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

Glu Arg Ala Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser
20 25 30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Asp Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Glu Thr Tyr Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

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

Ser Phe Asn Leu Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 84
<211> 219
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 84

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

Glu Arg Ala Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser
20 25 30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Asp Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Glu Thr Tyr Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

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

Ser Phe Asn Leu Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

<210> 85
<211> 219
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 85

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

Glu Arg Ala Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser
20 25 30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Asp Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Glu Thr Tyr Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

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

Ser Phe Asn Leu Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

<210> 86
<211> 336
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 86
gacatcgtga tgaccagtc ccccgactcc ctggccgtgt ctctgggcga gggggccacc 60
atgtcctgca agtcctccca gtccctgttc aactcccga cccggaagaa ctacctggcc 120
tggtatcage agaagcccgg ccagccccc aagctgctga tctactgggc ctctgctaga 180
gactctggcg tgcccgacag attcaccggc tccggcagcg agacatactt caccctgacc 240
atctcccggg tgcaggccga ggatgtggcc gtgtactact gcatgcagtc cttaacctg 300
cggaccttcg gccagggcac caaggtggaa atcaag 336

<210> 87

<211> 336
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<400> 87
 gacatcgtga tgaccagtc ccccgactcc ctggccgtgt ctctgggcga gcgggccacc 60
 atgtcctgca agtcctccca gtcctgttc aactcccga cccggaagaa ctacctggcc 120
 tggatcagc agaagcccgg ccagcccccc aagctgctga tctactgggc ctctgctaga 180
 gactctggcg tgcccagacag attcaccggc tccggcagcg agacatactt caccctgacc 240
 atctccagcc tgcaggccga ggatctggcc gtgtactact gcattgcagtc cttcaacctg 300
 cggaccttcg gccagggcac caaggtggaa atcaag 336

<210> 88
 <211> 657
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<400> 88
 gacatcgtga tgaccagtc ccccgactcc ctggccgtgt ctctgggcga gcgggccacc 60
 atgtcctgca agtcctccca gtcctgttc aactcccga cccggaagaa ctacctggcc 120
 tggatcagc agaagcccgg ccagcccccc aagctgctga tctactgggc ctctgctaga 180
 gactctggcg tgcccagacag attcaccggc tccggcagcg agacatactt caccctgacc 240
 atctcccggg tgcaggccga ggatgtggcc gtgtactact gcattgcagtc cttcaacctg 300
 cggaccttcg gccagggcac caaggtggaa atcaagcgt cggtggccgc tcccagcgtg 360
 ttcattctcc ccccaagcga cgagcagctg aagagcggca ccgccagcgt ggtgtgtctg 420
 ctgaacaact tctaccccag ggaggccaag gtgcagtga aggtggacaa cgccctgcag 480
 agcggcaaca gccaggagag cgtcaccgag caggacagca aggactccac ctacagcctg 540
 agcagcacc tgacctgag caaggccgac tacgagaagc acaaggtgta cgctgtgag 600
 gtgaccacc agggcctgtc cagccccgtg accaagagct tcaacagggg cgagtgc 657

<210> 89
 <211> 657
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<400> 89
 gacatcgtga tgaccagtc ccccgactcc ctggccgtgt ctctgggcga gcgggccacc 60

atgtctgca agtctccca gtcctgttc aactcccga cccggaaga ctacctggcc 120
tggatcagc agaagcccg ccagccccc aagctgctga tctactgggc ctctgctaga 180
gactctggcg tgcccacag attcaccgc tccggcagcg agacatactt caccctgacc 240
atctccagcc tgcaggccga ggatctggcc gtgtactact gcatgcagtc ctcaacctg 300
cggaccttcg gccagggcac caaggtggaa atcaagcgta cggtgggccgc tcccagcgtg 360
ttcatcttc cccaagcga cgagcagctg aagagcggca ccgccagcgt ggtgtgtctg 420
ctgaacaact tctaccccag ggaggccaag gtgcagtga aggtggacaa cgcctgcag 480
agcggcaaca gccaggagag cgtcaccgag caggacagca aggactccac ctacagcctg 540
agcagcaccc tgacctgag caaggccgac tacgagaagc acaaggtgta cgcctgtgag 600
gtgacccacc agggcctgtc cagccccgtg accaagagct tcaacagggg cgagtgc 657

<210> 90
<211> 120
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 90

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Asn
20 25 30

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

Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ala Ala
50 55 60

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

Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Asp Val Gly Ser Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 91

<211> 360

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 91

gaggtgcagc tggaggagtc tggcggagga ctggtgcagc ccggcagaag cctgagactg 60

agctgcaccg ccagcggtt cacctcacc gacaactaca tgtcctgggt gcgccaggcc 120

cctggaaagg gcctggaatg ggtgggcttc atccggaaca aggccaacgg ctacaccaca 180

gagtacgccg ccagcgtgaa gggccggttc accatcagcc gggacgacag caagagcatt 240

gcttacctgc agatgaacag cctgaaaacc gaggacaccg ccgtgtacta ctgcgccagg 300

gacgtgggca gcaactactt cgactactgg ggccagggca cactggtgac cgtgtctagc 360

<210> 92

<211> 450

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 92

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Asn

20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ala Ala

50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ile

65 70 75 80

Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr

85

90

95

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

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

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140

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

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

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

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205

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

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240

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

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

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

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300

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

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

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

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

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

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

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

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

Gly Lys
450

- <210> 93
- <211> 1350
- <212> ADN
- <213> Mus musculus

<400> 93
gaggtgcagc tgggtggagtc tggcggagga ctggtgcagc ccggcagaag cctgagactg 60
agctgcaccg ccageggctt caccttcacc gacaactaca tgtcctgggt gcgccaggcc 120
cctggaaagg gcctggaatg ggtgggcttc atccggaaca aggccaacgg ctacaccaca 180
gagtagccg ccagegtgaa gggccggttc accatcagcc gggacgacag caagagcatt 240

gcctacctgc agatgaacag cctgaaaacc gaggacaccg ccgtgtacta ctgcgccagg 300
 gacgtgggca gcaactactt cgactactgg ggccagggca cactggtgac cgtgtctagc 360
 gccagcacia agggcccaag cgtgttcccg ctagcccca gcagcaagag caccagcggc 420
 ggcacagccg ccctgggctg cctggtgaag gactacttcc ccgagcccgt gaccgtgtcc 480
 tggaacagcg gagccctgac ctccggcgtg cacaccttcc ccgccgtgct gcagagcagc 540
 ggctgtaca gcctgagcag cgtggtgacc gtgccagca gcagcctggg caccagacc 600
 tacatctgta acgtgaacca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agtggagccc 660
 aagagctgtg acaagacca cacctgcccc ccctgccag ccccgagct gctgggcgga 720
 cccagcgtgt tctgttccc cccaagccc aaggacccc tgatgatcag cagaacccc 780
 gaggtgacct gtgtgggtgt ggacgtgtcc cagcaggacc cagaggtgaa gttcaactgg 840
 tacgtggacg gcgtggaggt gcacaagcc aagaccaagc ccagagagga gcagtacaac 900
 agcacctaca ggggtgtgtc cgtgtgacc gtgtgcacc aggactggct gaacggcaag 960
 gagtacaagt gtaaggtgtc caacaaggcc ctgccagccc caatcgaaaa gaccatcagc 1020
 aaggccaagg gccagccaag agagccccag gtgtacccc tgccaccag cagggaggag 1080
 atgaccaaga accaggtgtc cctgacctgt ctggtgaagg gttctaccc aagcgacatc 1140
 gccgtggagt gggagagcaa cggccagccc gagaacaact acaagaccac ccccccagtg 1200
 ctggacagcg acggcagctt ctctctgtac agcaagctga ccgtggacia gagcagatgg 1260
 cagcagggca acgtgttcag ctgtccgtg atgcacgagg cctgcacia ccactacacc 1320
 cagaagagcc ttagcctgtc cccaggcaag 1350

PCT/EP2010/055863

VIII-2-1	Declaration: Entitlement to apply for and be granted a patent Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51bis.1(a)(ii)), in a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate: Name (LAST, First)	In relation to this international application PIERRE FABRE MEDICAMENT is entitled to apply for and be granted a patent by virtue of the following:
VIII-2-1(i v)		an assignment from KLINGUER-HAMOUR, Christine to PIERRE FABRE MEDICAMENT, dated 30 June 2009 (30.06.2009)

Brigard & Castro
BOGOTÁ - COLOMBIA

JP

PODER

El Suscrito.....
En calidad de.....
De.....
Sociedad constituida de acuerdo con las leyes de.....
con domicilio en.....
Oficinas principales en.....

Nombro(amos) a: **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO** y/o **CARLOS H. PALACIO EASTMAN** y/o **MARTIN EDUARDO TORRES CARDOZO**, de Bogotá, Colombia, apoderados verdaderos y legales con poder especial, amplio y suficiente, para recabar de las oficinas y autoridades colombianas administrativas, judiciales y de policía, en cualquier instancia o recurso, la obtención de patentes de invención, registros de marcas, diseños industriales, modelos de utilidad, depósitos de nombres comerciales y enseñanzas, registros de derechos de autor y contratos sobre los mismos, obtención de certificados de obtentor de variedades vegetales, así como sus prórrogas, renovaciones, anotaciones de traspaso, cambios de nombre y/o domicilio; elaborar, tramitar y registrar contratos de licencia y licencias de cualesquiera clases; intervenir como demandante o como demandado en cualquier instancia y recurso ante cualquier juez, corporación, funcionario público o autoridad en acciones judiciales, administrativas y de policía tales como: oposiciones al registro de marcas; acciones de caducidad, cancelación y nulidad; acciones reivindicatorias, acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias; acciones de competencia desleal; demandas penales; acciones de indemnización de perjuicios, reclamos y observaciones a solicitudes de patentes, diseños industriales, modelos de utilidad, en el ejercicio de medidas cautelares y en otras acciones o medidas similares.

A este efecto, lo(s) faculto(amos) para elevar solicitudes, formular descripciones, enmiendas, protestas, declaraciones, oposiciones, cancelaciones, nulidades, apelaciones y reclamos; pagar impuestos, cuotas y gravámenes prescritos por la ley; renunciar o desistirse a derechos concedidos o en curso de concesión; recibir toda clase de documentos y valores, dando el descargo respectivo, y, en general, para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al efecto indicado y tomar todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de mis (nuestros intereses), con todas las demás facultades legales necesarias.

Este poder comprende la facultad de ratificar o confirmar en mi (nuestro) nombre lo actuado así como la facultad de desistir, transigir, comprometer, y la de sustituirlo en todo o en parte y revocar sustituciones. Asimismo nombro(amos) a: **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO** y/o **CARLOS H. PALACIO EASTMAN** y/o **MARTIN EDUARDO TORRES CARDOZO**, domiciliado(s) en la Carrera 7 No. 16-56 Piso 9, mis (nuestros) apoderados en Colombia, con facultades para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales.

Otorgado y firmado en
Hoy.....de.....de.....200.....
Firma.....
PIERRE FABRE MEDICAMENT
Nombre.....Société Anonyme.....
Cargo.....17, avenue Jean Moulin - 81106 CASTRES
45, place Abel Gance - 92100 BOULOGNE

POWER-OF ATTORNEY

The Undersigned.....**Jean-Pierre COUZINIER**.....
Acting as Chief Operating Officer.....
Of **PIERRE FABRE MEDICAMENT**.....
Company incorporated as per the laws of France.....
domiciled in **45, Place Abel Gance**.....
With principal offices in **Castres**.....

Hereby appoints **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO** and/or **CARLOS H. PALACIO EASTMAN** and/or **MARTIN EDUARDO TORRES CARDOZO**, of Bogotá, Colombia, my (our) true and lawful attorneys with special, ample and sufficient power to obtain from the Colombian administrative, judicial and police offices and authorities, in any instance, privileges of patents of invention, registration of trademarks, industrial designs and utility models; registration of commercial names and emblems, registration of copyright and contracts related thereto, certificates of obtainment of vegetable varieties, as well as extensions, renewals and recordal of assignments and changes of name and domicile related to the above; to prepare, prosecute and register licenses of any kind; to act as plaintiff or defendant in any instance or recourse, and before any judge, corporation, public official or authority in judicial, administrative and police actions, such as: oppositions to the registration of trademarks; caducity, cancellation and nullity actions; claim actions derived from the obtaining or exploitation of licenses, action of unfair competition; criminal proceedings, actions for payment of damages; claims or observations on patent applications, models, industrial designs and utility models; in the exercise of preventive measures; and in other actions or similar proceedings.

To that effect they hereby empowered to file applications, formulate descriptions, amendments, protests, declarations, oppositions, cancellations, nullities, appeals and claims; to pay taxes, quotas and assessments prescribed by law, renounce or waive the rights granted or in the process of granting; to receive all kinds of documents and valuables, giving the respective release of receipt, and, in general, to take before said authorities the necessary steps to such effect, and any measures that they may deem pertinent to the safeguard of my (our) interest(s) with all the other necessary legal powers.

This power includes the faculty to ratify or confirm desist, settle and compromise on my (our) behalf, and to substitute this power in whole or in part and to revoke substitutions. At the same time I (We) hereby appoints **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO** and/or **CARLOS H. PALACIO EASTMAN** and/or **MARTIN EDUARDO TORRES CARDOZO**, domiciled in Carrera 7 No. 16-56, Piso 9, my (our) attorney(s) in fact, with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys.

Granted and signed in Castres
This 3rd day of November.....
Signature.....
Name **Jean-Pierre COUZINIER**.....
Title **Chief Operating Officer**.....



CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Hoy.....de.....de.....

personalmente compareció ante mí.....

a quien conozco, y de quien me consta que firmó el anterior documento, debidamente juramentado declaró y dijo que él/ella es.....

de.....

Sociedad legalmente constituida para un período de duración que aún no ha terminado; que el declarante está autorizado por dicha compañía para conferir este poder; que el sello estampado por él al pie de tal poder, en nombre y representación de la expresada compañía, es el sello oficial de ella; y que el objeto para el cual se confiere este instrumento está comprendido dentro del objeto social de la sociedad.

El suscrito Notario hace constar que tuvo a la vista las ruelas de la existencia de la sociedad.

Estado de.....

con fecha.....

y que quien confiere el presente poder es su representante.

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

On this 3rd day of November.....of 2005.....

personally appeared before me Jean-Pierre COUZINIER

to me known, and known to me to be the person who signed the foregoing instrument who being by me duly sworn did depose and say that he (she) is the **Chief Operating Officer**.

of **PIERRE FABRE MEDICAMENT**...

Which is legally constituted for a term not yet expired; that deponent is authorized by said Company to confer this Power of Attorney; that the seal affixed hereunto by the deponent in the name and on behalf of said Corporation is the corporate seal thereof; and that the purpose for which this instrument is granted is included within the corporate purpose of company.

The undersigned Notary Public attests that he has seen the documents that prove the existence of the company.

State of France....

under date of November 3rd, 2005.....

and that he (she) who grants the present power of attorney is its Representative

Notario Público (sello)

CERTIFICADO NOTARIAL
PERSONA NATURAL

Hoy.....de.....de.....
compareció(eron) ante mí.....

a quien(es) conozco y me consta que es(son) la(s) persona(s) firmante(s) del documento que precede y quien(es) declara(n) que otorgan el mismo para los fines y propósitos que en él se expresan.

Notario Público (sello)



On this.....day of.....of.....
personally appeared before me.....

who is(are) known to me and who I attest executed the foregoing document and he (they) declared he (they) grant(s) the document for the uses and purposes therein expressed.

Notary Public (Seal)

LEGALIZACION POR APOSTILLA ES REQUERIDA.

LEGALIZATION BY APOSTILLE IS REQUIRED.



(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1 - République Française

Le présent acte public

2 - a été signé par DR. P. L. DEVEAUX

3 - agissant en qualité de Notaire

4 - est revêtu du sceau de CASTREY

Atteste

5 - à TOULOUSE

6 - le 1^{er} NOV. 2005

7 - Par le procureur général près la cour d'appel

8 - Sous n° 2862

9 - Sceau

10 - Signature



En la Notaría Cuarenta de esta Circulo se
cotejó la presente fotocopia que acompaña con
el original que se ha tenido a la vista.

24 NOV. 2011

NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C. Colombia
Agustín Castillo Zárate

TRADUCCION AL ESPAÑOL del Documento de Poder otorgado por **PIERRE FABRE MEDICAMENT**, domiciliada en **45, Place Abel Gance**.

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. Republica Francesa

Este documento público

2. ha sido firmado por el Sr. Philippe DÉYVEAUX

3. actuando en capacidad de Notario

4. lleva el sello de la oficina de CASTRES

Certificado

5. en TOLOUSE

6. el 14 de noviembre de 2005

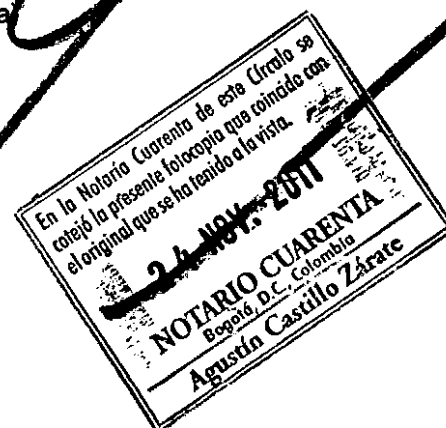
7. por el Procurador general para la Corte de apelaciones

8. No. 7842

9. Sello

10. Firma

(Firma)



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-162444- -00000-0000

Fecha: 2011-11-25 17:06:51 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 186

ADMISION A TRAMITE - NUEVAS CREACIONES



PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒	Indicación que se solicita una PCT
☒	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☒	Dibujos de ser estos pertinentes
☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☒	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐