

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 423**

51 Int. Cl.:  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**C07K 16/18** (2006.01)  
**A61P 9/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03748843 .4**  
96 Fecha de presentación: **06.10.2003**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1545609**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.06.2005**

54 Título: **ANTICUERPOS DIRIGIDOS CONTRA APOLIPROTEÍNA B OXIDADA**

30 Prioridad:  
**04.10.2002 SE 0202959**  
**27.08.2003 SE 0302312**  
**22.09.2003 WO PCT/SE03/01469**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**21.09.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**21.09.2012**

73 Titular/es:  
**BioInvent International AB**  
**223 70 Lund, SE**

72 Inventor/es:  
**NILSSON, Jan;**  
**CARLSSON, Roland;**  
**BENGTSSON, Jenny y**  
**STRANDBERG, Leif**

74 Agente/Representante:  
**Urizar Anasagasti, José Antonio**

ES 2 387 423 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Campo Técnico

5 **[0001]** La presente invención se refiere a nuevos anticuerpos, o fragmentos de anticuerpo, humanos aislados como se define en las reivindicaciones promovidos contra un péptido que es un fragmento oxidado de apolipoproteína B el cual es IEIGLEGKGFEPTEALFGK, en anticuerpos particulares que van a ser usados para terapia de inmunización para tratamiento de la aterosclerosis, y el método para su preparación.

**[0002]** También se describe aquí pero no se reivindica explícitamente:

10 **[0003]** El uso de cualquier anticuerpo aislado promovido contra una forma oxidada del péptido p45 listado en la tabla 1, en particular un péptido MDA modificado, preferiblemente junto con un portador y adyuvante adecuado como una inmunoterapia o "vacuna antiaterosclerosis" para la prevención y tratamiento de trastorno cardiovascular isquémico..

Antecedentes de la invención

15 **[0004]** Se sabe que los efectos protectores de inmunidad humoral son mediados por una familia de glicoproteínas relacionadas estructuralmente llamadas anticuerpos. Los anticuerpos inician su actividad biológica ligándose a antígenos. La unión de anticuerpos a antígenos es generalmente específica a un antígeno y la unión es normalmente de alta afinidad. Los anticuerpos son producidos por linfocitos B. La sangre contiene mucho anticuerpos diferentes, cada uno derivado de un clon de células B y cada uno teniendo una estructura y especificidad para el antígeno distinta. Los anticuerpos están presentes en la superficie de linfocitos B, en el plasma, en el fluido intersticial de los tejidos y en fluidos secretados tales como saliva y moco en las superficies mucosales.

20 **[0005]** Todos los anticuerpos son similares en su estructura general, teniendo en cuenta ciertas similitudes en características fisicoquímicas tales como carga y solubilidad. Todos los anticuerpos tienen una estructura nuclear común de dos cadenas ligeras idénticas, cada una casi de 24 kilo Daltons, y dos cadenas idénticas pesadas de casi 55-70 kilo Daltons cada una. Una cadena ligera se une a cada cadena pesada, y las dos cadenas pesadas están unidas entre sí. Tanto las cadenas ligeras como las pesadas contienen una serie de unidades homólogas repetitivas, cada una de casi 110 residuos de aminoácidos de longitud que se doblan FOLD independientemente en un motivo común globular, llamado dominio de inmunoglobulina (Ig). La región de un anticuerpo formado por la asociación de las dos cadenas pesadas es hidrofóbica. Se conoce que los anticuerpos, y especialmente los anticuerpos monoclonales se insertan en el sitio donde la cadena ligera se une a la cadena pesada cuando están sometidas a condiciones físicas o químicas adversas. A causa de que los anticuerpos contienen numerosos residuos de cisteína, tienen muchos uniones cisteína - disulfuro de cisteína. Todos los dominios Ig contienen dos capas de láminas plegadas-beta con tres o cuatro cepas de cadenas polipéptidas antiparalelas.

25

30

**[0006]** A pesar de su total similitud, las moléculas de anticuerpos pueden dividirse en un pequeño número de clases y subclases distintas en base a características fisicoquímicas tales como tamaño, carga y solubilidad, y a su comportamiento en la unión con antígenos. En los humanos, las clases de moléculas anticuerpo son: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Miembros de cada clase se dice que son del mismo isotipo. Los isotipos IgA y IgG se dividen además en subtipos llamados IgA1, IgA2 and IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4. Las cadenas pesadas de todos los anticuerpos en un isotipo comparten regiones extensas de identidad de secuencia aminoácida, pero difieren en los anticuerpos que pertenecen a otros isotipos o subtipos. Las cadenas pesadas son designadas por las letras del alfabeto griego correspondientes al isotipo general del anticuerpo, por ejemplo, cadenas pesadas IgA contienen .alpha., IgD contienen .delta., IgE contienen .epsilon., IgG contienen .gamma., y IgM contienen .mu.. IgG, IgE y IgD circulan como monómeros, mientras que las formas segregadas de IgA y IgM son dímeros o pentámeros, respectivamente, estabilizados por la cadena J. Algunas moléculas IgA existen como monómeros o trímeros.

35

40

**[0007]** Hay entre  $10^8$  y  $10^{10}$  moléculas de anticuerpo estructuralmente diferentes en cada individuo, cada una con una única secuencia aminoácida en su sitios combinatorios de antígeno. La diversidad secuencial en anticuerpos se encuentra predominantemente en tres cortas extensiones en los dominios aminoterminales de las cadenas pesadas y ligeras llamados regiones (V), para distinguirlas de las regiones (C) constantes más conservadas.

45

**[0008]** La aterosclerosis es una patología crónica que causa un engrosamiento de la capa más interna (la íntima) de arterias de tamaño grande y medio. Disminuye el flujo sanguíneo y puede causar isquemia y destrucción del tejido en órganos alimentados por el vaso afectado. La aterosclerosis es la causa principal de cardiopatía vascular incluyendo el infarto de miocardio, derrame cerebral y arteriopatía periférica. Es la principal causa de muerte en el mundo occidental y se predice que se convertirá en la iniciadora causa de muerte en todo el mundo en dos décadas.

50

**[0009]** La patología se inicia por acumulación de lipoproteínas, fundamentalmente la lipoproteína de baja densidad (LDL), en la matriz extracelular del vaso. Estas partículas LDL se agregan y se someten a modificación oxidativa. El LDL oxidado es tóxico y causa daño vascular. La aterosclerosis representa en muchos aspectos una respuesta a este daño que incluye inflamación y fibrosis.

55

**[0010]** En 1989 Palinski y colaboradores identificaron autoanticuerpos circulantes contra el LDL oxidado en humanos. Esta observación sugirió que la aterosclerosis puede ser una patología inmune causada por reacciones inmunes contra lipoproteínas oxidadas. En este momento los laboratorios comenzaron a buscar asociaciones entre títulos de anticuerpo contra el LDL oxidado y cardiopatía vascular. Sin embargo, el cuadro que surgió de estos

estudios dista de estar claro. Existían anticuerpos contra un gran número de diferentes epítomos en LDL oxidado, pero la estructura de estos epítomos fue desconocida. El término "anticuerpos de LDL oxidado" de este modo se refería a una mezcla desconocida de diferentes anticuerpos más que a un anticuerpo específico. Los anticuerpos IgM independientes de las células T fueron más frecuentes que los anticuerpos IgG dependientes de las células T.

5 **[0011]** Los anticuerpos contra LDL oxidado estaban presentes tanto en pacientes con cardiopatía vascular como en  
 controles sanitarios. Sin embargo algunos iniciadores estudios informaron sobre asociaciones entre títulos de  
 anticuerpos de LDI oxidado y cardiopatía vascular, otros fueron incapaces de encontrar tales asociaciones. Una  
 debilidad principal de estos estudios fue que las pruebas ELISA usadas para determinar títulos de anticuerpo  
 10 emplearon partículas de LDL oxidado como ligando. La composición de LDL es diferente en diferentes individuos, el  
 grado de modificación oxidativa es difícil tanto para controlar como para evaluar y los niveles de anticuerpos contra  
 los diferentes epítomos en las partículas de LDL oxidado no pueden ser determinados. Hasta cierto punto, debido a  
 los problemas técnicos ha sido difícil evaluar el papel de las respuestas de los anticuerpos contra el LDL oxidado  
 usando técnicas disponibles hasta ahora, pero sin embargo, no es posible crear componentes bien definidos y  
 reproducibles de una vacuna si uno usa partículas intactas de LDL oxidado.

15 **[0012]** Otra manera de investigar la posibilidad de que reacciones autoinmunes contra LDL oxidado en la pared  
 vascular juegue un papel clave en el desarrollo de aterosclerosis es inmunizar animales contra su propio LDL  
 oxidado. La idea detrás de este enfoque es que si las reacciones autoinmunes contra LDL oxidado son reforzadas  
 usando técnicas clásicas de inmunización esto resultaría en inflamación vascular incrementada y progresión de la  
 aterosclerosis. Para probar esta hipótesis fueron inmunizados conejos con LDL oxidado homólogo y luego se indujo  
 20 aterosclerosis alimentando a los animales con una dieta alta en colesterol durante 3 meses.

**[0013]** Sin embargo, en contraste con la hipótesis original la inmunización con LDL oxidado tenía un efecto de  
 protección reduciendo la aterosclerosis en alrededor del 50%. Resultados parecidos fueron también obtenidos en un  
 estudio posterior en el cual la dieta alta en colesterol fue combinada con daño con vascular balón para producir un  
 desarrollo más agresivo de la placa. En paralelo con nuestros estudios otros varios laboratorios informaron de  
 25 observaciones similares. Tomados conjuntamente los datos disponibles claramente demuestran que hay reacciones  
 inmunes que protegen contra el desarrollo de la aterosclerosis y que incluyen autoinmunidad contra el LDL oxidado.

**[0014]** Estas observaciones también sugieren la posibilidad de desarrollar una terapia inmune o "vacuna" para el  
 tratamiento de cardiopatía vascular producido por aterosclerosis en el hombre. Un enfoque para hacer esto sería  
 inmunizar a un individuo con su propio LDL después de que ha sido oxidado por exposición a por ejemplo cobre. Sin  
 embargo, este enfoque es complicado por el hecho que no es conocido qué estructura en el LDL oxidado es  
 30 responsable de inducir la inmunidad de protección y si el LDL oxidado también puede contener epítomos que pueden  
 dar lugar a reacciones inmunes adversas.

**[0015]** La identificación de epítomos en LDL oxidado es importante para diversos aspectos:

35 **[0016]** Iniciador, uno o varios de estos epítomos son probablemente responsables de activar la respuesta inmune  
 anti aterogénica observada en animales inmunizados con LDL oxidado. Los péptidos conteniendo estos epítomos  
 pueden por tanto representar una posibilidad para el desarrollo de una terapia inmune o "vacuna de aterosclerosis"  
 en humano. Además, pueden ser usados para tratamiento terapéutico de aterosclerosis desarrollada en humano.

40 **[0017]** En segundo lugar, los péptidos conteniendo los epítomos identificados pueden ser usados para desarrollar  
 ELISAs capaces de detectar anticuerpos contra la estructura específica en LDL oxidado. Tales ELISAs serían más  
 precisos y fiables que los actualmente disponibles usando partículas LDL oxidadas como antígeno. También  
 permitirían el análisis de respuestas inmunes contra diferentes epítomos en LDL oxidado asociados con cardiopatía  
 vascular.

45 **[0018]** La patente estadounidense 5,972,890 se refiere al uso de péptidos para diagnosticar aterosclerosis. La  
 técnica presentada en dicha patente estadounidense es en principio una forma de diagnóstico radiofísico. Una  
 secuencia de péptidos es etiquetada radioactivamente y es inyectada en la circulación sanguínea. Si esta  
 secuencia de péptidos fuera idéntica a las secuencias presentes en la apolipoproteína B se unirá al tejido donde existe  
 receptores presentes para la apolipoproteína B. En los vasos esto es por enzima de toda la placa aterosclerótica. La  
 concentración de radioactividad en la pared del vaso puede estar determinada por ejemplo, por medio de una  
 50 cámara gamma. La técnica es por tanto un método diagnóstico radiofísico basado en que esas secuencias de  
 péptidos etiquetadas radioactivamente se unirán a sus receptores normales de tejido presentes en la placa  
 aterosclerótica y son detectados usando un análisis externo de radioactividad. Es un método de análisis directo para  
 identificar la placa aterosclerótica. Requiere que al paciente se le den compuestos radiactivos.

55 **[0019]** Estudios publicados (Palinski et al., 1995, and George et al., 1998) han mostrado que la inmunización contra  
 LDL oxidado reduce el desarrollo de aterosclerosis. Esto indicaría que las reacciones inmunes contra el LDL oxidado  
 en general tienen efecto protector. Los resultados dados aquí han, sin embargo, sorprendentemente mostraron que  
 esto no es siempre el caso. Por ejemplo, la inmunización usando una mezcla de péptidos número 10, 45, 154, 199, y  
 240 provocó un incremento del desarrollo de aterosclerosis. La inmunización usando otras secuencias de péptidos,  
 por ejemplo las secuencias de péptidos números 1, y 30 a 34 carecen de total efecto sobre el desarrollo de  
 aterosclerosis. Los resultados son sorprendentes porque proporcionan base para el hecho de que reacciones  
 60 inmunes contra LDL oxidado, pueden proteger contra el desarrollo, contribuir al desarrollo de aterosclerosis, y no  
 tener ningún efecto en absoluto dependiendo de a qué estructuras en el LDL oxidado están dirigidas. Estos  
 hallazgos hacen posible desarrollar métodos de inmunización, que aíslan la activación de reacciones inmunes de  
 protección. Además, muestran que la inmunización usando LDL intacto oxidado podría tener un efecto perjudicial si

las partículas usadas contienen un alto nivel de estructuras que dan lugar a las reacciones inmunes aterogénicas.

**[0020]** La técnica aquí descrita esta basada en principios y métodos completamente diferentes y se refiere a anticuerpos promovidos contra fragmentos oxidados de apolipoproteína B, cuyos anticuerpos son usados para la inmunización contra cardiopatía vascular.

5 **[0021]** Como una alternativa a la inmunización activa, usando los péptidos identificados descritos antes, la  
 10 inmunización pasiva con anticuerpos prefabricados dirigidos a los mismos péptidos es una posibilidad atractiva. A  
 tales anticuerpos puede dárseles propiedades deseadas relacionadas por ejemplo con especificidad y reactividad  
 cruzada, isotipo, afinidad y semivida plasmática. La posibilidad de desarrollar anticuerpos con propiedades  
 predeterminadas se vuelve patente ya con la llegada de la tecnología de anticuerpos monoclonales (Milstein and  
 Köhler, 1975 Nature, 256:495-7). Esta tecnología usó células de hibridoma de ratón produciendo grandes cantidades  
 de anticuerpos idénticos, pero de ratón. De hecho, una gran número de pruebas preclínicas, y también clínicas  
 15 comenzaron usando anticuerpos monoclonales de ratón para el tratamiento de por ejemplo cánceres. Sin embargo,  
 debido al hecho de que los anticuerpos fueron de origen no humano el sistema inmune de los pacientes los  
 reconoció como extraños y desarrolló anticuerpos contra ellos. Como consecuencia la eficacia y semividas de los  
 anticuerpos de ratón se vió reducida, y a menudo efectos secundarios procedentes de reacciones alérgicas,  
 causadas por el anticuerpo extraño, evitaron el éxito del tratamiento.

20 **[0022]** Para solucionar estos problemas fueron tomados varios enfoques para reducir el componente de ratón del  
 anticuerpo específico y potencialmente terapéutico. El iniciador enfoque comprendía tecnología para hacer los  
 llamados anticuerpos quiméricos donde los dominios variables de ratón del anticuerpo fueron transferidos a regiones  
 constantes humanas resultando en un anticuerpo que fue principalmente humano (Neuberg et al. 1985, Nature  
 314:268-70). Un refinamiento adicional de este enfoque fue desarrollar anticuerpos humanizados donde las regiones  
 del anticuerpo de ratón que contactaban con el antígeno, las supuestas Regiones Determinantes de  
 Complementariedad (CDRs), fueron transferidas a un marco de anticuerpo humano. Tales anticuerpos son casi  
 25 completamente humanos y raramente causan alguna respuesta dañina de anticuerpo cuando se administra a los  
 pacientes. Diversos anticuerpos quiméricos o humanizados han sido registrados como medicamentos terapéuticos y  
 son ahora ampliamente usados en varias indicaciones (Borrebaeck and Carlsson, 2001, Curr. Opin. Pharmacol.  
 1:404-408).

30 **[0023]** Hoy también anticuerpos completamente humanos pueden ser producidos usando tecnologías  
 recombinantes. Normalmente son usadas grandes bibliotecas conteniendo billones de anticuerpos diferentes. Como  
 contraste a las anteriores tecnologías que emplean quimerización o humanización de por ejemplo anticuerpos de  
 ratón, esta tecnología no confía en la inmunización de animales para generar el anticuerpo específico. En lugar de  
 eso las bibliotecas de recombinantes contienen un enorme número de variantes de anticuerpos prefabricados  
 porque es probable que la biblioteca tendrá al menos un anticuerpo específico para cualquier antígeno. Así, usando  
 35 tales bibliotecas el problema único es encontrar el ligante específico ya existente en la biblioteca, y no generarlo a  
 través de inmunizaciones. Con el fin de encontrar el ligante bueno en una biblioteca de manera eficiente, han sido  
 concebidos varios sistemas donde el fenotipo, por ejemplo el anticuerpo o fragmento de anticuerpo, está vinculado a  
 su genotipo, por ejemplo el gen codificante. El sistema más comúnmente usado es el llamado sistema de  
 presentación de fago donde fragmentos de anticuerpo son expresados, expuestos, como fusiones con proteínas de  
 recubrimiento de fago en la superficie de las partículas filamentosas fágicas, mientras que llevan simultáneamente la  
 40 información genética codificando la molécula expuesta (McCafferty et al., 1990, Nature 348:552-554). Fragmentos  
 de anticuerpo que presenta fago específicos para un particular antígeno pueden ser seleccionados por unión al  
 antígeno en cuestión. El fago aislado puede entonces ser amplificado y el gen codificando los dominios variables de  
 anticuerpo seleccionados puede opcionalmente ser transferido a otros formatos de anticuerpo como por ejemplo  
 45 inmunoglobulina de longitud completa y expresado en altas cantidades usando vectores apropiados y células  
 huésped bien conocidas en la materia.

50 **[0024]** El formato de especificidades de anticuerpo expuestas en partículas fágicas pueden diferir. Los formatos más  
 comúnmente usados son Fab (Griffiths et al., 1994, EMBO J. 13:3245-3260) y cadena único (scFv) (Hoogenboom et  
 al., 1992, J Mol Biol. 227:381-388) ambas comprendiendo los dominios variables de unión de antígeno de  
 anticuerpos. El formato de cadena único está compuesto de un dominio variable pesado (VH) vinculado a un  
 dominio variable ligero (VL) por medio de un vinculante flexible (US 4,946,778). Antes de usarse como reactivos  
 analíticos, o agentes terapéuticos, la especificidad de anticuerpo expuesta es transferida a un formato soluble, por  
 ejemplo Fab o scFv, y analizado como tal. En posteriores pasos el fragmento de anticuerpo identificado como  
 teniendo características deseables puede ser transferido a además otros formatos tales como anticuerpos de  
 extensión completa.

55 **[0025]** Recientemente fue presentada una tecnología novedosa para la generación de variabilidad en bibliotecas de  
 anticuerpos (WO98/32845, Soderlind et al., 2000, Nature BioTechNOI. 18:852-856). Fragmentos de anticuerpos  
 derivados de esta biblioteca tienen todos las mismas regiones marco y únicamente difieren en sus CDRs. Puesto  
 que las regiones marco son de secuencia germinal la inmunogenicidad de los anticuerpos derivada de la biblioteca,  
 o bibliotecas parecidas producidas usando la misma tecnología, se espera que sea particularmente baja (Soderlind  
 60 et al., 2000, Nature BioTechnol. 18:852-856). Se espera que esta propiedad sea de gran valor para que los  
 anticuerpos terapéuticos reduzcan el riesgo de que el paciente forme anticuerpos al anticuerpo administrado, de ese  
 modo reduciendo riesgos de reacciones alérgicas, la aparición de anticuerpos bloqueadores, y permitiendo una larga  
 semivida plasmática del anticuerpo. Diversos anticuerpos derivados de los bibliotecas recombinantes han alcanzado  
 ahora la fase clínica y se espera que proporcionen medicamentos terapéuticos en un futuro próximo.

## ES 2 387 423 T3

**[0026]** De este modo, cuando nos encontramos con el desafío de desarrollar anticuerpos terapéuticos para ser usados en humanos la técnica aconseja separarse de la tecnología de hibridoma anterior e ir hacia el uso de tecnología moderna de biblioteca recombinante (Soderlind et al, 2001, Comb. Chem. & High Throughput Screen. 4: 409-416). Se reconoció que los péptidos identificados (PCT/SE02/00679) podían ser usados como antígenos para la generación de anticuerpos completamente humanos con propiedades predeterminadas. Como contraste al estado de la técnica (US 6,225,070) las estructuras antigénicas, por ejemplo los péptidos aquí usados, fueron identificadas como particularmente relevantes como secuencias diana para anticuerpos terapéuticos (PCT/SE02/00679). También, los anticuerpos aquí descritos son derivados de bibliotecas de anticuerpos omitiendo la necesidad de inmunización de ratones deficientes en lipoproteínas para **raise** anticuerpos de ratón (US 6,225,070). Más todavía, los anticuerpos resultantes son totalmente humanos y no se espera que generen ninguna reacción inmunológica indeseada cuando se administran a los pacientes.

**[0027]** Los péptidos usados, y previamente identificados (PCT/SE02/00679) son los siguientes:

Tabla 1

	<b>A. Alto IgG, diferencia MDA</b>
15	P11. FLDTVYGNCSHFTRKTRKG P 25. PQCSTHILQWLKRVHANPLL P 74. VISIPRLQAEARSEILAHWS
	<b>B. Alto IgM, no diferencia MDA</b>
20	P 40. KLVKEALKESQLPTVMDFRK P 68. LKFVTQAEGAKQTEATMTFK P 94. DGSLRHKFLDSNIKFHVEK P 99. KGTYGLSCQRPNTGRLNGE P 100. RLNGESNLRFNSSYLQGTNQ P 102. SLTSTSDLQSGIIKNTASLK
25	P 103. TASLKYENYELTLKSDTNGK P 105. DMTFSKQNALLRSEYQADYE P 177. MKVKIIRTIDQMENSELQWP
	<b>C. Alto IgG, no diferencia MDA</b>
30	P 143. IALDDAKINFNEKLSQLQTY P 210. KTTKQSFDSLVAQYKKNKH
	<b>D. NHS/AHP, IgG-ak &gt; 2, diferencia MDA</b>
35	P1. EEEMLENVSLVCPKDTRFK P 129. GSTSHHLVSRKSISAALHK P 148. IENIDFNKSGSSTASWIQNV P 162. IREVTQRLNGEIQALELPQK P 252. EVDVLTKYSQPEDSLIPFFE
	<b>E. NHS/AHP, IgM-ak &gt; 2, diferencia MDA</b>
40	P 301. HTFLIYITELLKQLQSTTVM P 30. LLDIANYLMEQIQDDCTGDE P 31. CTGDEDYTYKIKRVIGNMGQ P 32. GNMGTMEQLTPELKSSILK P 33. SSILKCVQSTKPSLMIQKAA P 34. IQKAAIQALRKMEPKDKDQE

## ES 2 387 423 T3

P 100. RLNGESNLRFNSSYLQGTNQ

P 107. SLNSHGLELNADILGTDKIN

P 149. WIQNVDTKYQIRIQIQEKLQ

P 169. TYISDWWTLAAKNLTDFAEQ

5 P 236. EATLQRIYSLWEHSTKNHLQ

### **F. NHS/AHP, IgG-ak < 0.5, no diferencia MDA**

P 10. ALLVPPETEEAKQVFLDTV

P 45. IEIGLEGKGFEPTEALFGK

P 111. SGASMKLTTNGRFREHNAKF

10 P 154. NLIGDFEVAEKINAFRAKVH

P 199. GHSVLTAKGMALFGEGKAEF

P 222. FKSSVITLNTNAELFNQSDI

P 240. FPDLGQEVALNANTKNQKIR

o un sitio activo de uno o más de estos péptidos.

15 **[0028]** En la Tabla 1 antes, debe notarse lo siguiente:

(A) Fragmentos que producen altos niveles de anticuerpos IgG a péptidos modificados MDA (n=3),

(B) Fragmentos que producen altos niveles de anticuerpos IgM, pero NO diferencia entre péptidos nativos y modificados MDA (n=9),

20 (C) Fragmentos que producen altos niveles de anticuerpos IgG, pero NO hay diferencia entre péptidos nativos y modificados MDA (n=2),

(D) Fragmentos que producen altos niveles de anticuerpos IgG a péptidos modificados MDA y al menos dos veces más anticuerpos en el pool NHP comparado con el pool AHP (n=5),

(E) Fragmentos que producen altos niveles de anticuerpos IgM a péptidos modificados MDA y al menos dos veces más anticuerpos en el pool NHP comparado con el pool AHP (n=11), y

25 (F) Fragmentos que producen altos niveles de anticuerpos IgG, pero no hay diferencia entre los péptidos intactos y modificados MDA pero al menos dos veces más anticuerpos en el pool de AHP comparado con el pool NHP (n=7).

### **Resumen de la invención**

30 **[0029]** La invención se refiere al uso de al menos un anticuerpo o fragmento de anticuerpo aislado humano dirigido hacia un fragmento oxidado de apolipoproteína B en la fabricación de una composición farmacéutica para tratamiento terapéutico o profiláctico de aterosclerosis por medio de inmunización pasiva, por el que el fragmento oxidado es IEIGLEGKGFEPTEALFGK, y en donde el anticuerpo o fragmento del mismo está caracterizado porque contiene la región VH y/o LH seleccionada de las secuencias ácidos nucleicas definidas en las reivindicaciones.

35 **[0030]** Además la invención se refiere a la preparación recombinante de tales anticuerpos. También aquí se describe un método para la inmunización pasiva usando tales anticuerpos promovidos usando un fragmento de apolipoproteína B, como antígeno, en particular un fragmento como se identifica antes.

**[0031]** Se describe aquí el uso de una biblioteca de fragmentos de anticuerpo aislados para generar fragmentos de anticuerpo humano contra péptidos, en particular MDA, oxidados modificados derivados de Apo B100. Fragmentos de anticuerpo identificados con características deseadas pueden entonces reconstruirse en inmunoglobulina humana de extensión completa para ser usada para fines terapéuticos.

### **Descripción detallada de la invención**

**[0032]** La presente invención se define en las Reivindicaciones acompañantes, con referencia a los ejemplos acompañantes.

45 **[0033]** A continuación seguirá una descripción detallada de las realizaciones preferidas de la invención descritas por medio de ejemplos no limitadores y con referencia a las figuras acompañantes. También se describen los anticuerpos derivados de una biblioteca de fragmentos de anticuerpo aislados y dirigidos hacia dos péptidos modificados MDA a partir de ApoB 100.

Ejemplo 1.

## ES 2 387 423 T3

Selección de scFv contra péptidos modificados MDA IEIGL EGKGF EPTLE ALFGK (P45, Tabla 1) y KTTKQ SFDLS VKAQY KKNKH (P210, Tabla 1).

**[0034]** Los antígenos objetivo fueron químicamente modificados para portar grupos (MDA) malondialdehído sobre lisinas e histidinas. Los péptidos modificados fueron denotados IEI (P45) and KTT (P210).

5 **[0035]** Las selecciones fueron realizadas usando la biblioteca de n-CoDeR™ scFv de BioInvent para la que el principio de construcción y producción han sido descritos en Soderlind et al. 2000, Nature BioTechNOlogy, 18, 852-856. Brevemente, los CDRs son aislados de genes de inmunoglobulina humana y son revueltos en un marco fijo. De este modo la variabilidad en las regiones resultantes variables de inmunoglobulina es una consecuencia de la recombinación de los seis CDRs en un marco fijo. Las regiones marco son todas germinales y son idénticas en todos los anticuerpos. De este modo la variabilidad está restringida a los CDRs, los cuales son todos naturales, y de origen humano. El biblioteca contiene aproximadamente  $2 \times 10^{10}$  clones y un exceso de clones de 2000 veces fue usado como entrada en cada selección. Las selecciones fueron realizadas en tres tandas. En la tanda 1, fueron recubiertos inmunotubos (NUNC maxisorb 444202) con 1.2 ml de 20 mg/ml de péptidos objetivo modificados MDA en PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1.4 mM  $\text{KH}_2\text{HPO}_4$ ) con con agitación de punta a punta a +4°C duranre la noche. Los tubos fueron bloqueados luego con TPBSB5% (5% BSA, 0.05% Tween 20, 0.02% azida sódica en PBS) durane 30 minutos y lavados dos veces con 3% de TPBSB (3% BSA, 0.05% Tween 20, 0.02% azida sódica en PBS) antes del uso. Cada tubo objetivo fue entonces incubado con aproximadamente  $2 \times 10^{13}$  fagos CFU de la biblioteca n-CodeR™ en 1.8 ml del 3% de TPBSB durante 2 h a temperatura ambiente, usando agitación de punta a punta. Los tubos luego fueron lavados con 15 x 3 ml de 3% de TPBSB and 2 x 1 ml PBS antes de eluir los fagos unidos con 1ml/tubo de 2mg/ml de tripsina (Roche, 109819) durante 30 minutos a temperatura ambiental. Este procedimiento aprovecha un sitio específico de tripsina en la proteína de fusión-scFv para liberar el fago del objetivo. La reacción fue frenada con la adición de 100 ml de Aprotéina (0.2 mg/ml, Roche, cat. 236624), y los inmunotubos fueron lavados con 300  $\mu\text{l}$  de PBS, dando un volumen final de 1.4 ml.

25 **[0036]** Para la amplificación del fago seleccionado E. *Coli* células HB101 F' fueron cultivadas exponencialmente en 10 ml de medio LB (Merck, cat. 1.10285) a  $\text{OD}_{600} = 0.5$  e infectadas con el fago selccionado y eluado principalmente como se ha descrito (Soderlind et al., 2000, Nature BioTechnol. 18, 852-856. El fago supernatante resultante fue entonces precipitado por adición de  $\frac{1}{4}$  volumen de 20% PEG6000 en 2.5 M NaCl e incubado durante 5 h a +4°C. Los fagos fueron entonces granulados por centrifugación durante 30 minutos, 13000 x g, resuspendidos en 500  $\mu\text{l}$  de PBS y usados en la tanda de selección 2.

30 **[0037]** El repuesto fágico amplificado se usó en la tanda de selección 2 en un volumen final de 1.5 ml de 5 % de BSA, 0.05% Tween 20, 0.02 % azida sódica en PBS. El péptido sin modificación de MDA ( $4 \times 10^{-7}$  M) fue incluido también para competencia contra ligantes al péptido objetivo no modificado MDA. La mezcla fue incubada en inmunotubos preparados con antígeno como se describe antes, excepto que los tubos se bloquearon con 1 % de Caseína en lugar de 3% TPBSB. Las incubaciones y lavado de los inmunotubos fueron como se describe para la selección 1. Los fagos ligados fueron entonces eluados durante 30 minutos usando 600  $\mu\text{l}$  de 100mM de buffer TrisGlicina, pH 2.2. Los tubos fueron lavados con 200  $\mu\text{l}$  de buffer de glicina y los eluados fueron reunidos y luego neutralizados con 96  $\mu\text{l}$  de 1 M Tris-HCl, pH 8.0. Las muestras fueron re-naturalizadas durante 1 h a temperatura ambiente y usadas para la tanda de selección 3.

40 **[0038]** Para la tanda de selección 3, BSA, Tween 20 y azida sódica fueron añadidos al conjunto fágico re-naturalizado a una concentración final de 3 %, 0.05% y 0.02%, respectivamente. Péptidos competidores, péptidos MDA modificados no relacionados así como péptidos objetivo nativos sin modificación fueron añadidos en una concentración de  $1 \times 10^{-7}$ M. Las mezclas de fagos (1100 ml) fueron añadidas a inmunotubos recubiertos con antígeno objetivo como se describe en la selección 1 e incubadas durante la noche a 4°C con agitación. Los tubos fueron entonces lavados con 3 x 3 ml 3% de TPBSB, 5 x 3 ml de PBS y en un momento dada los fagos unidos fueron eluados usando tripsina como se describe en la tanda de selección 1 antes. Cada eluado se infectó hasta 10 ml de HB101F' creciendo logarítmicamente en LB conteniendo 100 mg/ml de ampicilina, 15 mg/ml de tetraciclina, 0.1% glucosa, y se cultivó durante la noche a 30°C, 200 rpm en un incubador agitador.

50 **[0039]** Los cultivos durante la noche fueron usados para preparación a mini escala de ADN plásmido, usando Kit mini prep Biorad (Cat. 732 6100). Para eliminar la parte de gen III del fago del vector de expresión, se insertó 0.25 mg del ADN plásmido durante 2 h a 37°C usando 2.5 U Eag-1 (New England Biolabs, cat. R050) en el buffer recomendado por el proveedor. Las muestras fueron entonces inactivadas por calor durante 20 minutos a 65°C y ligadas durante la noche a 16°C usando 1 U T4 ADN ligasa en 30 ml de 1 x ligasa buffer (Gibco/BRL). Este procedimiento unirá dos sitios 1 Eag-1 sites situados en lados opuestos del fragmento de gen III de fago, así creando un scFv libre presentando una etiqueta terminal 6xhis. Tras ligación el material fue digerido durante 2 h a 37°C en una solución conteniendo 30 ml de mezcla de ligación, 3.6  $\mu\text{l}$  10 x REACT3 stock, 0.4  $\mu\text{l}$  1 M NaCl, 5  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ , con el fin de destruir clones en los que el segmento de gen III fago había sido religado. Veinte (20) ng del producto final fue transformado en producto químico competente Top10F' y extendido sobre 500  $\text{cm}^2$  bandeja Q placas LA (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Amp, 1% glucosa), para permitir la elección de colonias sencillas para selección posterior.

60 Selección de la biblioteca n scFv -CoDeR™ para fragmentos específicos de anticuerpo uniendo péptidos modificados MDA a partir de la Apoliproteína B-100

**[0040]** Con el fin de identificar scFv que podría discriminar péptido IEI (P45) MDA modificado e IEI nativo y entre KTT (P210) MDA modificado y KTT nativo respectivamente fueron realizadas selecciones en supernatantes bacterianos a partir de clones seleccionados expresando scFv.

## ES 2 387 423 T3

**[0041]** La recogida de colonia de clones únicos, la expresión de scFv y selección número 1 fueron realizadas en el sistema automático de BioInvent de acuerdo a métodos standard. 1088 y 831 clones únicos seleccionados contra péptidos IEI y KTT MDA modificados respectivamente fueron elegidos y cultivados y expresados en placas de microtitulación en 100 µl de LB conteniendo 100 µg de ampicilina/ml.

5 **[0042]** Para la selección número 1 placas white Assay (Greiner 655074) fueron recubiertas con 54 pmol de péptido/pocillo en buffer de recubrimiento (0.1 M carbonato sódico, pH 9.5), bien con péptido MDA modificado que sirvió como objetivo positivo o con péptido no modificado correspondiente que sirvió como no objetivo. En el ELISA el scFv expresado fue detectado por medio de una myc-tag situada C-terminal al scFv usando 1 µg/ml de anti-c-myc monoclonal (9E10 Roche 1667 149) en buffer de lavado. Como anticuerpo secundario se usó conjugado de fosfatasa alcalina de cabra - antiratón (Applied Biosystems Cat # AC32ML) en dilución a 25000 veces. Para detección de luminescencia fueron usados CDP-Star Ready para usar con Emerald II Tropix (Applied Biosystems Cat # MS100RY) de acuerdo a las recomendaciones del proveedor.

10 **[0043]** Clones ScFv que ligaban péptido modificado MDA pero no péptido nativo fueron re-expresados como se describe antes y para selección otra vez en un ELISA luminiscente (Tabla 2 y Figura 1). Se realizaron ensayos tanto contra péptidos directamente recubiertos (108 pmol/pocillo recubierto con PBS) como contra el objetivo más fisiológico; partículas LDL (1 mg/pocillo recubiertas en PBS + 1 mM EDTA) conteniendo la proteína ApoB-100 con o sin modificación de MDA fueron usadas como objetivos. Clones positivos fueron aquellos que ligaban LDL oxidado y péptido MDA modificado pero no LDL o péptido nativo. El ELISA se realizó como antes excepto que el anticuerpo anti-His (MaB050 RaD) se usó como anticuerpo de detección. Se encontró que doce clones IEI y 2 clones KTT daban señales luminiscentes tres veces más altas a 700 nm para la forma MDA modificada que para la forma nativa tanto para el péptido como el LDL.

15 **[0044]** Los clones identificados fue más probados por medio de titulación contra una cantidad fija (1 mg/pocillo) de LDL MDA y LDL nativo para evaluar la respuesta a dosis de scFv (Figura 2).

20 **Tabla 2.** Resultados de la selección. El número de clones probados en cada paso de selección para cada objetivo. Las respuestas positivas alcanzadas en porcentaje son mostradas entre paréntesis.

		Objetivo	
		IEI	KTT
Selección número 1	Clones probados	1088	831
	% de respuestas positivas alcanzadas	64 (5.9%)	33 (4.0%)
Selección número 2	Clones probados	64	33
	% de respuestas positivas alcanzadas	12 (1.1%)	2 (0.2%)
Respuesta a Dosis	Clones probados	12	2
	% de respuestas positivas alcanzadas	8 (0.7%)	2 (0.2%)

30 **[0045]** Las secuencias de los clones scFv elegidos se determinaron a fin de encontrar clones únicos. Se realizó un PCR bacteriano con el Boeringer Mannheim Expand Kit usando iniciadores (5'-CCC AGT CAC GAC GTT GTA AAA CG-3') y (5'-GAA ACA GCT ATG AAA TAC CTA TTG C-3') y un sistema GeneAmp 9700 PCR (PE Applied system) usando el programa de ciclo de temperatura a 94°C 5 min, 30 ciclos de 94°C 30s, 52°C durante 30s y 68°C durante 2min y finalmente 5 min a 68 min. La reacción secuenciadora se realizó con el producto bacteriano de PCR (diluido cinco veces) como molde, usando Big Dye Terminator mix de PE Applied Biosystems y el sistema GeneAmp 9700 PCR (PE Applied system) y el programa de ciclo de temperatura 25 ciclos de 96°C 10s, 50°C durante 5s y 60°C durante 4 min. Los productos de extensión fueron purificados de acuerdo a las instrucciones del proveedor y la separación y detección de productos de extensión se hizo usando un analizador Genetic 3100 (PE Applied Biosystems). Las secuencias se analizaron por el programa de ordenador residente. A partir de de la información secuencial fueron excluidos los clones homólogos y clones con sitios de restricción inapropiada, dejando seis clones para conversión de IgG. Las secuencias de ADN de los dominios variables pesados (VH) y variables ligeros (VL) de los clones finalmente seleccionados son mostradas en la Figura 3.

40 Ejemplo 2.

Transferencia de genes codificando las partes variables de scFv seleccionado para vectores IgG1 humanos de longitud completa.

## ES 2 387 423 T3

**[0046]** Bacterias conteniendo clones scFv para ser convertidos en formato Ig fueron cultivadas durante la noche en LB suplementado con 100 µg/ml de ampicilina. Se preparó plásmido de ADN a partir de cultivos de una noche usando el Quantum Prep, plasmid miniprep kit de Biorad (# 732-6100). La concentración de ADN fue estimada midiendo la absorbancia en 260nm, y el ADN se diluyó a una concentración de 2 ng/µl.

5 **[0047]** VH y VL de los diferentes scfv-plásmidos se amplificaron por PCR con el fin de suministrar estos segmentos con sitios de restricción compatibles con los vectores de expresión (ver abajo). Los iniciadores 5' contienen un sitio de inserción de enzima de restricción BsmI y los iniciadores 3' contienen un sitio de inserción de enzima de restricción BsiWI (mostrado en cursiva). Los iniciadores 3' también contenían un sitio donante de empalme (mostrado en negrita).

10 Iniciadores para amplificación de segmentos VH:

5'VH: 5'-GGTGTGCATTCCGAGGTGCAGCTGTTGGAG (SEC. ID. Nº: 13)

3'VH: 5'-GACGTACGACTCACCTGAGCTCACGGTGACCAG (SEC. ID. Nº: 14)

Iniciadores para amplificación de segmentos VL:

5'VL: 5'-GGTGTGCATTCCAGTCTGTGCTGACTCAG (SEC. ID. Nº: 15)

15 3'VL: 5'-GACGTACGTTCTACTCACCTAGGACCGTCAGCTT (SEC. ID. Nº: 16)

**[0048]** Se realizó PCR en un volumen total de 50 µl, conteniendo 10ng de molde ADN, 0.4 µM de iniciador 5', 0.4 µM de iniciador 3' y 0.6 mM dNTP (Roche, #1 969 064). La polimerasa usada fue Expand long template PCR system (Roche # 1 759 060), 3.5 u por reacción, junto con cada uno de los buffers suministrados en 3 reacciones separadas. Cada ciclo de amplificación de PCR consistía en un paso desnaturante a 94°C durante 30 segundos, un paso de hibridación a 55°C durante 30 segundos, y un paso de elongación a 68°C durante 1.5 minutos. Este ciclo de amplificación fue repetido 25 veces. Cada reacción comenzó con un único paso desnaturante a 94°C durante 2 minutos y finalizaba con un único paso de elongación a 68°C durante 10 minutos. La existencia de producto PCR fue revisado por electroforesis de gel de agarosa, y se agruparon reacciones conteniendo el mismo material amplificado (procedente de reacciones con diferentes buffers). Los productos de amplificación de PCR fueron posteriormente purificados por cromatografía en columna spin usando columnas S400-HR (Amersham-Pharmacia Biotech # 27-5240-01).

**[0049]** Cuatro (4) µl de cada pool de productos PCR fueron usados para clonación TOPO TA (pCR 2.1 TOPO, Invitrogen #K4550-01) de acuerdo a las recomendaciones de los fabricantes. Colonias bacterianas conteniendo plásmidos con insertos fueron cultivadas durante la noche en LB suplementado con 100 µg/ml de ampicilina y 20 µg/ml de kanamicina. Se preparó plásmido de ADN de cultivos nocturnos usando el Quantum Prep, plasmid miniprep kit de Biorad (# 732-6100). Las preparaciones plásmidas fueron purificadas por cromatografía en columna spin usando columnas S400-HR (Amersham-Pharmacia Biotech # 27-5240-01). Tres plásmidos de cada clonación individual de VH y VL fueron sometidos a análisis de secuencia usando BigDye Cycle Sequencing (Perkin Elmer Applied Biosystem, # 4303150). El programa de secuenciación de ciclo consistía en un paso de desnaturación a 96°C durante 10 segundos, un paso de hibridación a 50°C durante 15 segundos, y un paso de elongación a 60°C durante 4 minutos. Este ciclo fue repetido 25 veces. Cada reacción comenzaba con un único paso de desnaturación a 94°C durante 1 minuto. Las reacciones fueron realizadas en un volumen de 10 µl consistiendo en 1 µM de iniciador (5'-CAGGAAACAGCTATGAC), 3 µl de plásmido de ADN y 4 ml de mezcla de reacción Big Dye. Las reacciones fueron precipitadas de acuerdo a las recomendaciones de los fabricantes, y las muestras corrieron en un ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer. Las secuencias fueron comparadas con la secuencia original de scFv usando la función de alineamiento del software de análisis secuencial OMIGA (Oxford Molecular Ltd).

**[0050]** Plásmidos conteniendo segmentos VH y VL sin mutaciones fueron digeridos por enzima de restricción. Para romper el vector pCR 2.1 TOPO, los plásmidos fueron inicialmente digeridos con DraI (Roche # 1 417 983) a 37°C durante 2 horas. Las digestiones fueron inactivadas por calor a 70°C durante 20 minutos y purificadas por cromatografía en columna spin usando columnas S400-HR (Amersham-Pharmacia Biotech # 27-5240-01). Las digestiones DraI purificadas fueron posteriormente digeridas con BsmI (Roche # 1 292 307) y BsiWI (Roche # 1 388 959) a 55°C durante la noche. Las digestiones fueron purificadas usando extracción y precipitación de fenol. El ADN precipitado fue disuelto en 10 µl de H<sub>2</sub>O y usado para ligación.

**[0051]** Los vectores de expresión fueron obtenidos de Lars Norderhaug (J. Immunol. Meth. 204 (1997) 77-87). Tras algunas modificaciones, los vectores (Figure 4) contienen un promotor de CMV, un péptido Ig-líder, un vinculante clonante conteniendo sitios de restricción BsmI y BsiWI para clonar VH/VL, regiones genómicas constantes de IgG1 (vector de cadena pesada (HC)) o lambda (vector de cadena ligera (LC)), genes de resistencia a neomicina (vector HC) o metotrexato (vector LC) para selección en células eucariotas, orígenes SV40 y ColEI de replicación y genes de resistencia a ampicilina (vector HC) o kanamicina (vector LC) para selección en bacterias.

**[0052]** Los vectores HC y LC fueron digeridos con BsmI y BsiWI, tratados con fosfatasa y purificados usando extracción y precipitación de fenol. La ligación se estableció a 16°C durante la noche en un volumen de 10 µl, conteniendo 100 ng de vector digerido, 2 µl de vector digerido VH/VL-pCR 2.1 TOPO (ver antes), 1 U T4 ADN ligasa (Life Technologies, # 15224-025) y el buffer suministrado. 2 µl de la mezcla de ligación fueron transformados posteriormente en 50 µl de bacterias top10F' químico competentes, y colocados sobre placas de agar selectivas (100 µg/ml de ampicilina o 20 µg/ml de kanamicina). Colonias conteniendo HC/LC plásmidos con insertos VH/VL fueron

## ES 2 387 423 T3

identificados por PCR de colonia:

Iniciador hacia adelante: 5'-ATGGGTGACAATGACATC

Iniciador inverso: 5'-AAGCTTGCTAGCGTACG

5 **[0053]** Se realizó PCR en un volumen total de 20 ml, conteniendo bacterias, 0.5  $\mu$ M de iniciador hacia adelante, 0.5  $\mu$ M de iniciador inverso y 0.5 mM dNTP (Roche, #1 969 064). La polimerasa usada fue Expand long template PCR system (Roche # 1 759 060), 0.7 U por reacción, junto con el buffer # 3 suministrado. Cada ciclo de amplificación de PCR consistía en un paso de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, un paso de hibridación a 52°C durante 30 segundos, y un paso de elongación a 68°C durante 1.5 minutos. Este ciclo de amplificación fue repetido 30 veces. Cada reacción comenzaba con un único paso de desnaturalización a 94°C durante 2 minutos y finalizaba con un único paso de elongación a 68°C durante 5 minutos. La existencia de producto PCR fue revisado por electroforesis de gel de agarosa. Colonias conteniendo plásmidos HC/LC con insertos VH/VL fueron cultivadas durante la noche en LB suplementado con 100  $\mu$ g/ml ampicilina o 20  $\mu$ g/ml de kanamicina. Plásmido de ADN fue preparado de cultivos durante la noche usando la Quantum Prep, plasmid miniprep kit de Biorad (# 732-6100). Las preparaciones plásmidas fueron purificadas por cromatografía en columna spin usando columnas S400-HR (Amersham-Pharmacia Biotech # 27-5240-01). Para confirmar la integridad de la secuencia de ADN tres plásmidos de cada VH y VL individual fueron sometidos a análisis secuencial usando BigDye Cycle Sequencing (Perkin Elmer Applied Biosystem, # 4303150). El programa de secuenciación de ciclo consistía en un paso de desnaturalización a 96°C durante 10 segundos, un paso de hibridación a 50°C durante 15 segundos, y un paso de elongación a 60°C durante 4 minutos. Este ciclo fue repetido 25 veces. Cada reacción comenzaba con un único paso de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto. Las reacciones fueron realizadas en un volumen de 10  $\mu$ l consistiendo en 1  $\mu$ M iniciador (5'-AGACCCAAGCTAGCTTGGTAC), 3  $\mu$ l plásmido de ADN y 4  $\mu$ l de mezcla de reacción Big Dye. Las reacciones precipitaron de acuerdo a las recomendaciones de los fabricantes, y las muestras corrieron en un ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer. Las secuencias se analizaron usando software de análisis de secuencia OMIGA (Oxford Molecular Ltd). El plásmido de ADN fue usado para transfección transitoria de 7 células COS (ver abajo) y fue digerido para producción de un vector unido, conteniendo genes de cadena pesada y ligera en el mismo plásmido.

30 **[0054]** Vectores de cadena pesada y ligera conteniendo segmentos VH y VL originados del mismo scFv fueron insertados por enzimas de restricción y ligados: los vectores HC y LC fueron inicialmente digeridos con MunI (Roche # 1 441 337) tras cuyas digestiones fueron inactivados por calor a 70°C durante 20 minutos y purificados por cromatografía en columna spin usando columnas S200-HR (Amersham-Pharmacia Biotech # 27-5120-01). Las digestiones de vector HC fueron posteriormente digeridas con NruI (Roche # 776 769) y las digestiones del vector LC con Bst1107I (Roche # 1 378 953). Las digestiones fueron entonces inactivadas por calor a 70°C durante 20 minutos y purificadas por cromatografía en columna spin usando columnas S400-HR (Amersham-Pharmacia Biotech # 27-5240-01). 5  $\mu$ l de cada plásmido digerido fueron ligados a 16°C durante la noche en un volumen total de 20  $\mu$ l, conteniendo 2U T4 ADN ligasa (Life Technologies, # 15224-025) y el buffer suministrado. 2  $\mu$ l de la mezcla de ligación fueron transformados posteriormente en 50  $\mu$ l de bacterias top10F<sup>+</sup> químico competentes, y colocados sobre placas de agar selectivas (100  $\mu$ g/ml de ampicilina o 20  $\mu$ g/ml de kanamicina).

40 **[0055]** Colonias bacterianas fueron cultivadas durante la noche en LB suplementado con 100  $\mu$ g/ml de ampicilina y 20  $\mu$ g/ml de kanamicina. Fue preparado plásmido de ADN a partir de cultivos de una noche usando el Quantum Prep, plasmid miniprep kit de Biorad (# 732-6100). Los vectores correctamente unidos fueron identificados por digestión de enzima de restricción seguido de análisis de tamaños de fragmento por electroforesis en gel de azarosa.

**[0056]** Las preparaciones plasmidas fueron purificadas por cromatografía en columna spin usando columnas S400-HR (Amersham- Pharmacia Biotech # 27-5240-01) y usadas para la transfección transitoria de 7 células COS.

45 **[0057]** Células COS-7 (ATCC # CRL-1651) fueron cultivadas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> en Dulbeccos MEM, alta glucosa + Glutamax1 (Invitrogen # 31966021), suplementado con 0.1 mM de aminoácidos no esenciales (Invitrogen # 11140035) y 10% de suero fetal bovino (Invitrogen # 12476-024, batch # 1128016). El día anterior a la transfección, las células fueron colocadas en placas de 12 pocillos (Nunc, # 150628) a una densidad de 1.5x10<sup>5</sup> células por pocillo.

50 **[0058]** Antes de la transfección, el ADN plásmido fue calentado a 70°C durante 15 minutos. Las células fueron transfeccionadas con 1  $\mu$ g de plásmido-HC+ 1  $\mu$ g de plásmido-LC, o 2  $\mu$ g de plásmido unido por pocillo, usando Lipofectamine 2000 Reagent (Invitrogen, # 11668019) de acuerdo a las recomendaciones de los fabricantes. 24 horas después de la transfección, el medio de cultivo celular fue cambiado y las células se dejaron cultivar durante 5 días. Después de eso, el medio fue recogido y la producción de proteínas fue probada para usar ELISA.

55 **[0059]** Placas de noventa y seis (96) pocillos (Costar # 9018, fondo plano, alta unión) fueron recubiertas a 4°C durante la noche añadiendo 100  $\mu$ l/pocillo de anticuerpo de cadena ligera lambda anti-humano de conejo (DAKO, # A0193) disuelto 4000 veces en buffer de muestra (0.1M de carbonato sódico, pH 9.5). Las placas fueron lavadas 4 veces en PBS conteniendo 0.05% Tween 20 y después bloqueadas con 100  $\mu$ l/pocillo de PBS+3% BSA (Albumin, fraction V, Roche # 735108) durante 1 h. a temperatura ambiente. Tras lavarse como antes, se añadieron 100  $\mu$ l/pocillo de la muestra y se incubó a temperatura ambiente durante una hora. Como un estándar para la estimación de la concentración, se usó IgG1 humano purificado (Sigma, # 15029). Muestras y estándar fueron diluidos en un buffer de muestra (1x PBS conteniendo 2% BSA y 0.5% suero de conejo (Sigma # R4505). Posteriormente, las placas fueron lavadas como se describe antes y 100  $\mu$ l/pocillo de anticuerpo HARP-conjugado de IgG (cadena y)

## ES 2 387 423 T3

anti-humano de conejo (DAKO, # P214) disueltos 8000 veces en buffer de muestra fue añadido e incubado a temperatura ambiental durante 1 hora. Tras lavarse 8 veces con PBS conteniendo 0.05% Tween 20, se añadieron 100 µl/pocillo de una solución de sustrato conteniendo un comprimido de OPD (10 mg, Sigma # P8287,) disuelto en 15 ml de buffer de ácido cítrico y 4.5 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%). Después de 10 minutos, la reacción fue terminada añadiendo 150 µl /pocillo de HCl 1M. La absorbancia fue medida a 490-650 nm y los datos fueron analizados usando software Softmax.

5

10

**[0060]** Bacterias conteniendo vectores HC y LC correctamente unidos fueron cultivadas durante la noche en 500 ml de LB suplementado con ampicilina y kanamicina. Se preparó ADN plásmido a partir de cultivos nocturnos usando el Quantum Prep, plasmid maxiprep kit de Biorad (# 732-6130). Los vectores fueron linealizados usando enzima de restricción PvuI (Roche # 650 129). Antes de la transfección, el ADN linealizado fue purificado por cromatografía en columna spin usando columnas S400-HR (Amersham- Pharmacia Biotech # 27-5240-01) y calentado a 70°C durante 15 minutos.

Ejemplo 3

15

Transfección estable de células NSO expresando anticuerpos contra péptidos MDA modificados de Apolipoproteína B-100.

**[0061]** Células NSO (ECACC no. 85110503) fueron cultivadas en DMEM (cat nr 31966-021, Invitrogen) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (cat no. 12476-024, lot: 1128016, Invitrogen) y 1X NEAA (aminoácidos no esenciales, cat no. 11140-053, Invitrogen). Los cultivos celulares fueron mantenidos a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> en entorno humidificado.

20

**[0062]** Los constructos de ADN a ser tranfectados fueron cuatro constructos de anticuerpos específicos de IEI (IEI-A8, IEI-D8, IEI-E3, IEIG8), dos de anticuerpos específicos de KTT (KTT-B8, KTT-D6) y un anticuerpo de control (JFPA12). El día antes de la transfección, las células fueron tripsinizadas y contadas, antes de colocarlas en un matraz T-75 a 12x10<sup>6</sup> células/matraz. En el día de la transfección, cuando las células fueron confluentes al 85-90%, las células fueron colocadas en 15 ml de DMEM + 1X NEAA + 10 % FBS (como antes). Para cada matraz de células a ser tranfectadas, 35-40 µg del ADN se diluyeron en 1.9 ml de OPTI-MEM I Reduced Serum Medium (Cat no. 51985-026, lot: 3062314, Invitrogen) sin suero. Para cada matraz de células, 114 ml de Lipofectamine 2000 Reagent (Cat nr. 11668-019, lot: 1116546, Invitrogen) fueron diluidos en 1.9 ml OPTI-MEM I Reduced Serum Medium en otro tubo e incubados durante 5 min a temperatura ambiente. El ADN diluido fue combinado con el Reactivo Lipofectamine 2000 diluido (en los 30 min) e incubado a temperatura ambiente durante 20 min para dejar formarse complejos Reactivo LF2000-ADN.

25

30

**[0063]** Las células fueron lavadas con medio una vez y se añadieron 11 ml de DMEM + 1X NEAA + 10 % de FBS. Los complejos Reactivo LF2000-ADN (3.8 ml) fueron luego añadidos directamente a cada matraz y suavemente mezclados meciendo el flask hacia atrás y hacia delante. Las células fueron incubadas a 37°C en un incubador con 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 h.

35

**[0064]** Las células fueron entonces tripsinizadas y contadas, y posteriormente colocadas en placas con 96 pocillos a 2x10<sup>4</sup> células/pocillo usando cinco placas de 96 pocillos /constructo. Las células fueron colocadas en 100 ml/pocillo de DMEM + 1X NEAA + 10 % FBS (como antes) conteniendo G418-sulfato (cat nr.10131-027, lot: 3066651, Invitrogen) en 600 µg/ml. La presión de selección fue mantenida inalterada hasta la recolección de las células.

40

**[0065]** Las células fueron cultivadas durante 12 días y ensayadas para producción de anticuerpos usando ELISA. De cada constructo células de los 24 pocillos conteniendo las mayores cantidades de IgG fueron transferidas a placas con 24 pocillos y fueron dejadas para alcanzar confluencia. La producción de anticuerpos de las células en estos pocillos fue entonces ensayada con ELISA y 5-21 pools/constructo fueron seleccionados para re-selección (Tabla 3). Finalmente fueron elegidas las células de los 1-4 mejores pocillos para cada constructo. Estas células fueron expandidas sucesivamente en matraces de cultivo celular y finalmente transferidas a matraces de triple capa (500 cm<sup>2</sup>) en 200 ml de (DMEM + 1xNEAA + 10% Ultra low IgG FBS (cat. NO. 16250-078, lot. NO. 113466, Invitrogen) + G418 (600 µg/ml)) para producción de anticuerpos. Las células fueron incubadas durante 7-10 días y los supernatantes fueron ensayados por ELISA, recolectados y filtrados de forma estéril para su purificación.

45

Ejemplo 4.

Producción y purificación de IgG1 humano

50

**[0066]** Supernatantes de células NSO tranfectadas con los diferentes anticuerpos IgG1 fueron filtrados de forma estéril usando un filtro de 0.22 µm y purificados usando un medio de afinidad MabSelect™ con proteína A recombinante, (Cat. NO. 17519901 Amersham Biosciences).

55

**[0067]** IgG1 humano ligado fue eluado con buffer HCL-glicina pH 2.8. El eluado fue recogido en fracciones de 0.5 ml y fue usado OD<sub>280</sub> para determinar la presencia de proteína. Las fracciones pico fueron agrupadas y la absorbancia fue medida a 280 nm y 320 nm. El buffer fue cambiado por medio de diálisis contra un gran volumen de PBS. La presencia de endotoxinas en las preparaciones purificadas de IgG-1 fue ensayada usando un test LAL (QCL-1000R, cat. NO. 50-647U Bio Whittaker). Las muestras contenían entre 1 y 12 EU/ml de endotoxina. Se estimó que la pureza de las preparaciones excedía del 98% por análisis PAGE.

Tabla 3 Resumen de la Producción y Purificación de IgG1 humano

Nombre de clon	Volumen supernatante cultivo (ml)	IgG1 total en supernatante (mg)	IgG1 total purificado (mg)	Rendimiento (%)
IEI-A8	600	68	42	61.8
IEI-D8	700	45	21	46.7
IEI-E3	700	44.9	25.6	60
IEI-G8	600	74	42.4	57.3
KTT-B8	1790	77.3	37.6	48.6
KTT-D6	1845	47.8	31.8	66.5
JFPA12	2000	32.2	19.2	59.6

**[0068]** Las preparaciones purificadas de IgG1 fueron probadas en ELISA para la reactividad a péptidos MDA modificados y no modificados (Figura 5) y fueron entonces usadas en estudios funcionales in vitro y in vivo.

Ejemplo 5.

5 Análisis de posible efecto anti-aterogénico de anticuerpos es realizado tanto en casos de animales experimentales como en cultivos celulares.

**[0069]** 1. Efecto de los anticuerpos sobre la aterosclerosis en ratones con apolipoproteína E knockout (apo E-). Ratones apo E- con cinco semanas de edad son alimentados con una dieta rica en colesterol durante 15 semanas. Es conocido que este tratamiento produce una cantidad significativa de placas ateroscleróticas en las arterias aorta y carótida. Luego se da a los ratones una inyección intraperitoneal conteniendo 500 µg del respectivo anticuerpo antes identificado. A los ratones de control se les dan 500 µg de un anticuerpo de control irrelevante o PBS solo. Los tratamientos son repetidos tras 1 y 2 semanas. Los ratones son sacrificados 4 semanas después de la inyección inicial del anticuerpo. La gravedad de la aterosclerosis en la aorta es determinada por teñido Oil Red O de preparaciones planas y determinando el tamaño de placas ateroscleróticas subvalvulares. El contenido de colágeno, macrófagos y células T de placas ateroscleróticas subvalvulares es determinado por teñido Masson trichrome y por inmunohistoquímica específica celular. La cuantificación del teñido Oil Red O, el tamaño de las placas subvalvulares, el teñido trichrome y el teñido inmunohistoquímico es realizada usando análisis de imágenes por ordenador.

**[0070]** En un primer experimento el efecto de los anticuerpos en el desarrollo de aterosclerosis fue analizado en ratones apo E-/- alimentados con una dieta alta en colesterol. Los ratones recibieron tres inyecciones intraperitoneales de 0.5 mg de anticuerpo con intervalos semanales comenzando a las 21 semanas de edad, usando PBS como control. Fueron sacrificados dos semanas después de la última inyección de anticuerpo, y la extensión de la aterosclerosis fue evaluada por teñido Oil Red O de secciones planas de la aorta descendente. Un efecto pronunciado fue observado en ratones tratados con el anticuerpo IEI-E3, con más del 50% de reducción de aterosclerosis comparado con el grupo PBS ( $P=0.02$ ) y con un grupo de control que recibió un anticuerpo IgG1 humano (FITC8) dirigido contra un antígeno no relevante de isotiocianato de fluoresceína (FITC) ( $P=0.03$ ) (Fig. 6). Los ratones toleraron bien los anticuerpos humanos y no fueron evidentes efectos en el estado de salud general de los ratones.

**[0071]** Para verificar el efecto inhibitorio del anticuerpo IEI-E3 en el desarrollo de aterosclerosis realizamos entonces un estudio de respuesta a dosis. La programación fue idéntica a la del estudio inicial. En ratones tratados con anticuerpos IEI-E3 la aterosclerosis se redujo el 2% en el grupo de 0.25 mg (n.s.), el 25% en el grupo de 0.5 mg (n.s.) y el 41% ( $P=0.02$ ) en el grupo de 2.0 mg comparado con los correspondientes grupos tratados con anticuerpos FITC (Fig. 7).

**[0072]** 2. Efecto de los anticuerpos en la formación de neo-intima después de lesión mecánica de las arterias carótidas en ratones apo E-. La lesión mecánica de las arterias da lugar al desarrollo de placa fibromuscular de neo-intima en 3 semanas. Esta placa se asemeja morfológicamente a una placa aterosclerótica muscular y ha sido usada como un modelo para estudios del desarrollo de la lesión causada. La colocación de un collar plástico alrededor de la arteria carótida causa el daño mecánico. Ratones apo E. de cinco semanas de edad son alimentados con una dieta rica en colesterol durante 14 semanas. Los ratones reciben luego una inyección peritoneal conteniendo 500 µg del respectivo anticuerpo. Se administra a ratones de control 500 µg de un anticuerpo irrelevante o PBS solo. El tratamiento es repetido después de 7 días y la colocación quirúrgica del collar plástico es realizada 1 día después. Una última inyección de anticuerpos o PBS es administrada 6 días tras la operación y los animales son sacrificados 15 días después. La arteria carótida dañada es fijada, embebida en parafina y seccionada. El tamaño de la placa neo-intima es medida usando análisis de imagen por ordenador.

3. Efecto de anticuerpos en absorción de LDL oxidado en macrófagos humanos cultivados.

45 **[0073]** La absorción de LDL oxidado en macrófagos arteriales llevando a la formación de células espumosas de

macrófagos cargadas de colesterol es uno de los rasgos más característicos de la placa aterosclerótica. Diversas líneas de evidencia sugieren que inhibir la absorción de LDL oxidado en macrófagos arteriales representa un posible objetivo para el tratamiento de aterosclerosis. Para estudiar el efecto de anticuerpos sobre la absorción macrófaga de oxidado se preincubaban células con LDL oxidado humano con etiquetado <sup>125</sup>I durante 2 horas. Macrófagos humanos se aíslan de capas leucocitarias de donante de sangre por centrifugación en Ficoll Hypaque seguido de cultivo en presencia de 10% de suero durante 6 días. Las células son entonces incubadas con medio conteniendo complejos anticuerpo/LDL oxidado durante 6 horas, lavados y determinada la radioactividad asociada a células en un contador gamma. La adición de anticuerpos IEI-E3 resultó en un incremento de cinco veces en la unión ( $P=0.001$ ) y absorción ( $P=0.004$ ) de LDL oxidado comparado con FITC-8 en macrófagos, pero no tenía efecto en la unión o absorción de LDL nativo (Fig. 8a y 8b).

**[0074]** 4. *Efecto de los anticuerpos sobre citotoxicidad dependiente de LDL oxidado.* El LDL oxidado es altamente citotóxico. Se cree que gran parte de la actividad inflamatoria en placas ateroscleróticas se explica por daño celular causado por LDL oxidado. La inhibición de citotoxicidad de LDL oxidado representa así otro posible objetivo para el tratamiento de la aterosclerosis. Para estudiar el efecto de los anticuerpos sobre la citotoxicidad de LDL oxidado, se exponen células humanas cultivadas de músculo liso arterial a 100 ng/ml de LDL humano oxidado en presencia de concentraciones crecientes de anticuerpos (0-200 ng/ml) durante 48 hours. El índice de daño celular es determinado midiendo la liberación de la enzima LDH.

**[0075]** El experimento mostrado revela un efecto para un anticuerpo particular promovido contra un péptido particular, pero es evidente para un entendido en la materia que otros anticuerpos promovidos contra los péptidos revelados se comportarán de la misma manera.

**[0076]** Los anticuerpos como se definen en las Reivindicaciones son usados en composiciones farmacéuticas para inmunización pasiva, por las que las composiciones farmacéuticas principalmente son previstas para inyección, incluyendo una solución, suspensión, o emulsión de un único anticuerpo o una mezcla de anticuerpos como se define en las Reivindicaciones en una dosis para proporcionar un nivel terapéuticamente o profilácticamente activo en el cuerpo tratado. Las composiciones puede estar provistas de adyuvantes comúnmente usados para mejorar la absorción del anticuerpo o la mezcla de los anticuerpos. Otras vías de administración pueden ser la vía nasal por inhalación del anticuerpo/ mezcla del anticuerpo en combinación con excipientes inhalables.

**[0077]** Tales composiciones farmacéuticas pueden contener el anticuerpo activo en una cantidad de 0.5 a 99.5% en peso, o 5 a 90% en peso, o 10 a 90% en peso, o 25 a 80% en peso, o 40 a 90% en peso.

**[0078]** La dosis diaria del anticuerpo, o una dosis de choque proporcionará un nivel terapéuticamente o profilácticamente activo en el cuerpo, tratado para reducir o evitar signos y síntomas de aterosclerosis por medio de inmunización pasiva. Una dosis del anticuerpo como se define en las Reivindicaciones puede ser de 1  $\mu$  a 1 mg por kg de peso corporal, o más.

**[0079]** La composición del anticuerpo puede ser suplementada con otros medicamentos para tratar o evitar aterosclerosis o cardiopatías vasculares, tales como medicamentos reductores de presión sanguínea, tales como bloqueadores beta receptores, antagonistas del calcio, diuréticos, y otros agentes antihipertensivos.

**[0080]** FIG. 9 muestra la unión de scFv aislado a péptidos derivados de ApoB100 MDA modificados y a un péptido de control MDA modificado de secuencia irrelevante. También se muestran las proporciones entre la unión de scFv a proteína ApoB100 MDA modificada y nativa y LDL humano respectivamente. Las columnas aparecen en el orden en que son definidas de arriba a abajo en la columna de la derecha de la respectiva subfigura.

## REFERENCIAS

### [0081]

- Dimayuga, P., B. Cercek, et al. (2002). "Inhibitory effect on arterial injury-induced neointimal formation by adoptive B-cell transfer in Rag-1 kNOckout mice." *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 22: 644-649.
- Jovinge, S., M. Crisby, et al. (1997). "ADN fragmentation and ultrastructural changes of degenerating cells in atherosclerotic lesions and smooth muscle cells exposed to oxidized LDL in vitro." *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 17: 2225-2231.
- Regnström, J., G. Walldius, et al. (1990). "Effect of probucol treatment on susceptibility of low density lipoprotein isolated from hypercholesterolemic patients to become oxidatively modified in vitro." *Atherosclerosis* 82: 43-51.
- Steinberg, D., S. Parthasarathy, et al. (1989). "Beyond cholesterol modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity." *New England Journal of Medicine* 320(14): 915-924.
- Zhou, X., G. Paulsson, et al. (1998). "Hypercholesterolemia is associated with a T helper (Th) 1/Th2 switch of the autoimmune response in atherosclerotic apo E-kNOckout Mice." *Journal of Clinical Investigation* 101: 1717-1725.

### SEC. ID. Nº: 1

55 IEIA8

Región Variable pesada (VH)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCC  
TGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAATAACGCCTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA  
AGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCCATTAGTAGTAGTAGTACATATACTACGCAGACTCAGT  
GAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGC  
CTGAGAGCCGAGGACACTGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGTACAGTAGGTACTIONACTACGGACCAT  
CTTTCTACTTTGACTCCTGGGGCCAGGGTACACTGGTCACCGTGAGCAGC

SEC. ID. Nº: 2

IEIA8

5 Región variable ligera (VL)

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCCT  
GCTCTGGAAGCAGGTCCAACATTGGGAATAATTATGTATCCTGGTATCAGCAGCTCCCAGGAAC  
GGCCCCAAACTCCTCATCTATGGTAACAACAATCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTG  
GCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTG  
ATTATTACTGTGCAGCATGGGATGACAGCCTGAATGGTCATTGGGTGTTCCGGCGGAGGAACCAA  
GCTGACGGTCCTAGGT

SEC. ID. Nº: 3

IEI-E3

Región variable pesada (VH)

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCCT  
GCTCTGGAAGCAGGTCCAACATTGGGAATAATTATGTATCCTGGTATCAGCAGCTCCCAGGAAC  
GGCCCCAAACTCCTCATCTATGGTAACAACAATCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTG  
GCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTG  
ATTATTACTGTGCAGCATGGGATGACAGCCTGAATGGTCATTGGGTGTTCCGGCGGAGGAACCAA  
GCTGACGGTCCTAGGT

10

SEC. ID. Nº: 4

IEI-E3

Región Variable Ligera (VL)

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCCT  
GTTCTGGAAGCAGTCCAACATCGGAAATAATGCTGTAAACTGGTATCAGCAGCTCCCAGGAAC  
GGCCCCAAACTCCTCATCTATGGGAATGATCGGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCT  
GGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCT  
GATTATTACTGTGACACTGGGGCACTGGCCGGGGGTATTCCGGCGGAGGAACCAAGCTGACG  
GTCCTAGGT

15 SEC. ID. Nº: 5

IEI-G8

Región Variable Pesada (VH)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCC  
TGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGTAGCTATTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA  
AGGGGCTGGAGTGGGTCTCAAGTATCAGTGGTAGTGGTCGTAGGACATACTACGCAGACTCCGT  
GCAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGC  
CTGAGAGCCGAGGACACTGCCGTGTATTACTGTGCGAGATTGGTCTCCTATGGTTCCGGGGAGTT  
TCGGTTTTGACTACTGGGGCCAAGGTACACTGGTCACCGTGAGCAGC

SEC. ID. Nº: 6

IEI-G8

Región Variable Ligera (VL)

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCTT  
GTTCTGGAAGCAGCTCCAATATCGGAAGTAATTATGTATCCTGGTATCAGCAGCTCCCAGGAACG  
GCCCCAAACTCCTCATCTATGGTAACTACAATCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGG  
CTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGAT  
TATTACTGTGCAGCATGGGATGACAGCCTGAGTGGTGGGTGTTCCGGCGGAGGAACCAAGCTG  
ACGGTCCTAGGT

SEC. ID. Nº: 7

5 IEI-D8

Región Variable Pesada (VH)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCC  
TGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAACGCCTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGTTCCAGGGA  
AGGGGCTGGAGTGGGTCTCAACTCTTGGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTC  
CGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAAC  
AGCCTGAGAGCCGAGGACACTGCCGTGTATTACTGTGCGAAGTTAGGGGGGCGATCCCGATAT  
GGGCGGTGGCCCCGCCAATTTGACTACTGGGGCCAAGGTACACTGGTCACCGTGAGCAGC

SEC. ID. Nº: 8

IEI-D8

10 Región Variable Ligera (VL)

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCCT  
GCTCTGGAAGCAGCTCCAACATTGGAATAACTATGTATCCTGGTATCAGCAGCTCCCAGGAAC  
GGCCCCAAACTCCTCATCTATAGTAATAATCAGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTG  
GCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTG  
ATTATTACTGTGCAGCATGGGATGACAGCCTGAGTCATTGGCTGTTCCGGCGGAGGAACCAAGCT  
GACGGTCCTAGGT

SEC. ID. Nº: 9

KTT-D6

Región Variable Pesada (VH)

15

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCC  
TGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTACTACTACATGAGCTGGATCCGCCAGGCTCCAGGGA  
AGGGGCTGGAGTGGGTCTCAAGTATCAGTGGCCGTGGGGGTAGTTCCTACTACGCAGACTCCG  
TGAGGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAG  
CCTGAGAGCCGAGGACACTGCCGTGTATTACTGTGCGAGACTTTCCTACAGCTATGGTTACGAG  
GGGGCCTACTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGTACACTGGTCACCGTGAGCAGC

SEC. ID. Nº: 10

KTT-D6

Región Variable Ligera (VL)

CAGTCTGTGCTGA<sup>¯</sup>CTCAG<sup>¯</sup>CCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCCT  
GCTCTGGAAGCAGCTCCAACATTGGGAATAATTATGTATCCTGGTATCAGCAGCTCCCAGGAAC  
GGCCCCAAACTCCTCATCTATAGGAATAATCAGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCT  
GGCTCCAAGTCTGGCACCTTAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCT  
GATTACTGTGCAACCTGGGATGACAGCCTGAATGGTTGGGTGTTTCGGCGGAGGAACCAAGC  
TGACGGTCCTAGGT

SEC. ID. Nº: 11

KTT-B8

Región Variable Pesada (VH)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCC  
TGTGCAGCCTCTGGATCACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA  
AGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCCATTAGTAGTAGTGGTCGTTTCATTTACTACGCAGACTCAATG  
AAGGGCCGCTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCT  
GAGAGCCGAGGACACTGCCGTGTATTACTGTACGAGGCTCCGGAGAGGGAGCTACTTCTGGGC  
TTTTGATATCTGGGGCCAAGGTACACTGGTCACCGTGAGCAGC

5

SEC. ID. Nº: 12

KTT-B8

Región Variable Ligera (VL)

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCCT  
GTTCTGGAAGCAGCTCCAACATTGGCGGTGAGTCTGTATCCTGGTATCAGCAGCTCCCAGGAAC  
GGCCCCAAACTCCTCATCTATAGTAATAATCAGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTG  
GCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTG  
ATTACTGTGCAAGCCTGGGATGACAGCCTGAATGGTTGGGTGTTTCGGCGGAGGAACCAAGCT  
GACGGTCCTAGGT

10

SEC. ID. Nº: 13

5'VH: 5'-GGTGTGCATTCCGAGGTGCAGCTGTTGGAG

SEC. ID. Nº: 14

3'VH: 5'-GACGTACGACTCACCTGAGCTCACGGTGACCAG

15

SEC. ID. Nº: 15

5'VL: 5'-GGTGTGCATTCCAGTCTGTGCTGACTCAG

SEC. ID. Nº: 16

3'VL: 5'-GACGTACGTTCTACTCACCTAGGACCGTCAGCTT

SEC. ID. Nº: 17

20

5'-ATGGGTGACAATGACATC

SEC. ID. Nº: 18

5'-AAGCTTGCTAGCGTACG

1-B12

SEC. ID. Nº: 19

25

Región Variable Pesada (VH)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTC  
TCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGAACGTATTGGATGACCTGGGTCCGCCAGGCT  
CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCTATTAGCAGTAGCAGTAATTACATATTCTAC  
GCAGACTCAGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT  
CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACTGCCGTGTATTACTGTGCGAGACTCAGA  
CGGAGCAGCTGGTACGGGGGGTACTGGTTCGACCCCTGGGGCCAAGGTACACTGGTCACC  
GTGAGCTCA

**SEC. ID. Nº: 20**

Región Variable Ligera (VL)

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATC  
TCCTGCTCTGGAAGCAGCTCCAACATTGGGAATAATTATGTATCCTGGTATCAGCAGCTC  
CCAGGAACGGCCCCAAACTCCTCATCTATAGGAATAATCAGCGGCCCTCAGGGGTCCCT  
GACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGG  
TCCGAGGATGAGGCTGATTACTGTGCAGCATGGGATGACAGCCTGAATGGTCATTGG  
GTGTTCCGGCGGAGGAACCAAGCTGACGGTCCTAGGT

5 **Clon: 1-C07**

**SEC. ID. Nº: 21**

Región Variable Pesada (VH)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCT  
CCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCAACTACATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCC  
AGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCCATTAGTAGTAGTAGTACATATACTACGCA  
GACTCAGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGC  
AAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACTGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGTAGGCCGGTA  
TAACTGGAAGACGGGGCATGCTTTTGATATCTGGGGCCAGGGTACACTGGTCACCGTGAGC  
TCA

**SEC. ID. Nº: 22**

10 **Región Variable Ligera (VL)**

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCT  
CCTGCTCTGGAAGGACCTACAACATTGGAAATAATTATGTATCGTGGTATCAGCAGCTCCC  
AGGAACGGCCCCAAACTCCTCATCTATGGTAACATCAATCGGCCCTCAGGGGTCCCTGAC  
CGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCG  
AGGATGAGGCTGATTACTGTGCAGCATGGGATGTCAGGCTGAATGGTTGGGTGTTCCGG  
CGGAGGAACCAAGCTGACGGTCCTAGGT

**Clon: 1-C12**

**SEC. ID. Nº: 23**

Región Variable Pesada (VH)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTC  
TCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCCGTGACTACTACGTGAGCTGGATCCGCCAGGCT  
CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAAGTATTAGTGGTAGTGGGGGTAGGACATACTAC  
GCAGACTCCGTGGAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT  
CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACTGCCATGTATTACTGTGCCAGAGTATCC  
GCCCTTCGGAGACCCATGACTACAGTAACACTTACTGGTTCGACCCCTGGGGCCAAGGT  
ACACTGGTCACCGTGAGCTCA

15

**SEC. ID. Nº: 24**

Región Variable Ligera (VL)

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATC  
TCCTGCTCTGGAAGGAGCTCCAACATTGGGAATAGTTATGTCTCCTGGTATCAGCAGCTC  
CCAGGAACGGCCCCAACTCCTCATCTATAGGAATAATCAGCGGCCCTCAGGGGTCCCT  
GACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGG  
TCCGAGGATGAGGCTGATTACTGTGCAGGATGGGATGACACCCTGCGTGCTTGGGTG  
TTCGGCGGAGGAACCAAGCTGACGGTCCTAGGT

Clon: 1-G10

5 **SEC. ID. Nº: 25**

Región Variable Pesada (VH)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTC  
TCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAACGCCTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCT  
CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCCGCTATTAGTGGTAGTGGTAACACATACTATGCA  
GACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTG  
CAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACTGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGCCTCCCAC

**SEC. ID. Nº: 26**

Región Variable Ligera (VL)

10

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATC  
TCTTGTCTGGAAGCCGCTCCAACATCGGGAGAAATGCTGTTAGTTGGTATCAGCAGCTC  
CCAGGAACGGCCCCAACTCCTCATCTATGCTAACAGCAATCGGCCCTCAGGGGTCCCT  
GACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGG  
TCCGAGGATGAGGCTGATTACTGTGCAGCATGGGATGGCAGCCTGAATGGTTGGGTG  
TTCGGCGGAGGAACCAAGCTGACGGTCC

Clon: 2-D03

**SEC. ID. Nº: 27**

Región Variable Pesada (VH)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTC  
TCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAACGCCTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCT  
CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAAGTATTAGTGGTGGACATAGGACATATTAT  
GCAGATCCGTGAAGGGCCGGTCCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT  
CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACTGCCGTGTATTACTGTGCACGGATACGG  
GTGGGTCCGTCCGGCGGGGCCCTTTGACTACTGGGGCCAGGGTACACTGGTCACCGTGAGC  
TCA

15

**SEC. ID. Nº: 28**

Región Variable Ligera (VL)

ES 2 387 423 T3

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCAT  
CTCCTGCTCTGGAAGCAACACCAACATTGGGAAGAATATGTATCTTGGTATCAGCAGC  
TCCCAGGAACGGCCCCAACTCCTCATCTATGCTAATAGCAATCGGCCCTCAGGGGTC  
CCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCT  
CCGGTCCGAGGATGAGGCTGATTACTGTGCGTCATGGGATGCCAGCCTGAATGGTT  
GGGTATTCGGCGGAGGAACCAAGCTGACGGTCCTAGGT

Clon: 2-F07

SEC. ID. Nº: 29

Región Variable Pesada(VH)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTC  
TCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAACGCCTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCT  
CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCCATTAGTAGTAGTAGTTACATATACTAC  
GCAGACTCAGTGAAGGGCCGATCCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT  
CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACTGCCGTGTATTACTGTGCGAGGCTCACA  
AATATTTTACTGTTATTATACCTCAGGATATGCTTTTATATCTGGGGCCAAGGTACA  
CTGGTCACCGTGAGCTCA

5

SEC. ID. Nº: 30

Región Variable Ligera (VL)

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATC  
TCCTGCTCTGGAAGCACCTCCAACATTGGGAAGAATTATGTATCCTGGTATCAGCAGCTC  
CCAGGAACGGCCCCAACTCCTCATCTATGGTAACAGCAATCGGCCCTCAGGGGTCCT  
GACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGG  
TCCGAGGATGAGGCTGATTACTGTGCGAGCATGGGATGCCAGCCTCAGTGGTTGGGTG  
TTCGGCGGAGGAACCAAGCTGACGGTCCTAGGT

Clon: 2-F09

10 SEC. ID. Nº: 31

Región Variable Pesada (VH)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTC  
TCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGTTCTTGGATGAGTTGGGTCCGCCAGGCT  
CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCCATTAGTAGTAGTAGTTACATATACTAC  
GCAGACTCAGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT  
CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACTGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGTAGGG  
AACTACGGTTTCTACCACTACATGGACGTCTGGGGCCAAGGTACTGGTCACCGTGAGC  
TCA

SEC. ID. Nº: 32

Región Variable Ligera (VL)

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATC  
TCTTGTCTGAGGCAGCTCAAACATCGGAAAAGAGGTGTAATTGGTATCAGCAGCTC  
CCAGGAACGGCCCCAACTCCTCATCTATGGTAACAGAAATCGGCCCTCAGGGGTCCT  
GACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGG  
TCCGAGGATGAGGCTGATTACTGTGCTACATGGGATTACAGCCTCAATGCTTGGGTG  
TTCGGCGGAGGAACCAAGCTGACGGTCCTAGGT

15

**Clon: 4-A02**

**SEC. ID. Nº: 33**

Región Variable Pesada (VH)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTC  
TCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGTAGCTATTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCT  
CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCCATTAGTAGTAGTAGTTACATATACTAC  
GCAGACTCAGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT  
CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACTGCCGTGTATTACTGTGCGAGAATAAA  
CGGTTACGATTGGCTGGACCCCTTTGACTACTGGGGCCAGGGTACACTGGTCACCGTG  
AGCTCA

5 **SEC. ID. Nº: 34**

Región Variable Ligera (VL)

CAGTCTGTTCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATC  
TCCTGTTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAATAATGGTGAAACTGGTATCAGCAGCTC  
CCAGGAACGGCCCCAAACTCCTCATCTATGGTAACAACAATCGGCCCTCAGGGGTCCCT  
GACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGG  
TCCGAGGATGAGGCTGATTACTGTGCAGCATGGGATGACAGCCTGCGTGGTTGGCTG  
TTCGGCGGAGGAACCAAGCTGACGGTCCTAGGT

**Clon. 4-C03**

**SEC. ID. Nº: 35**

10 Región Variable Pesada (VH)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTC  
TCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAACGCCTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCT  
CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCCATTAGTAGTAGTAGTTACATATACTAC  
GCAGACTCAGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT  
CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACTGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGTCAAT  
AGCAAAAAGTGGTATGAGGGCTACTTCTTTGACTACTGGGGCCAGGGTACACTGGTCACC  
GTGAGCTCA

**SEC. ID. Nº: 36**

Región Variable Ligera (VL)

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATC  
TCCTGCTCTGGAAGCAGCTCCAACATTGGGAATAATTATGTATCCTGGTATCAGCAGCTC  
CCAGGAACGGCCCCAAACTCCTCATCTATGGTAACAGCAATCGGCCCTCAGGGGTCCCT  
GACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGG  
TCCGAGGATGAGGCTGATTACTGTGCAGCATGGGATGACAGTCTGAGTGGTTGGGTG  
TTCGGCGGAGGAACCAAGCTGACGGTCCTAGGT

15 **Clon: 4-D04**

**SEC. ID. Nº: 37**

Región Variable Pesada (VH)

ES 2 387 423 T3

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTC  
TCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAACGCCTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCT  
CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCCATTAGTACTAGTAGTAATTACATATACTAC  
GCAGACTCAGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT  
CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACTGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGTCAAG  
AAGTATAGCAGTGGCTGGTACTCGAATTATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGTACACTG  
GTCACCGTGAGCTCA

SEC. ID. Nº: 38

Región Variable Ligera (VL)

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATC  
TCCTGCTCTGGAAGCAGCTCCAGCATTGGGAATAATTTTGTATCCTGGTATCAGCAGCTC  
CCAGGAACGGCCCCAACTCCTCATCTATGACAATAATAAGCGACCCTCAGGGGTCCCT  
GACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGG  
TCCGAGGATGAGGCTGATTACTGTGCAGCATGGGATGACAGCCTGAATGGTTGGGTG  
TTCGGCGGAGGAACCAAGCTGACGGTCCTAGGT

## REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Uso de al menos un anticuerpo o fragmento de anticuerpo humano aislado dirigido hacia un fragmento oxidado de apolipoproteína B en la fabricación de una composición farmacéutica para tratamiento terapéutico o profiláctico de aterosclerosis por medio de inmunización pasiva, en el cual el fragmento oxidado es: IEIGLEGKGFEPTEALFGK y en donde el anticuerpo o fragmento del mismo está **caracterizado porque** comprende la secuencia de ácido nucleico de la región variable pesada (VH) y la secuencia de ácido nucleico de la región variable ligera (VL) de:  
SEC ID N°:3 y SEC ID N°:4; o SEC ID N°:23 y SEC ID N°:24; o SEC ID N°:27 y SEC ID N°:28.
- 2.** Uso de acuerdo a la Reivindicación 1, en donde el fragmento oxidado ha sido oxidado usando malondialdehído.
- 3.** Uso de acuerdo a las Reivindicaciones 1-2, en donde el fragmento oxidado ha sido oxidado usando cobre.
- 10 **4.** Anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo dirigido hacia un fragmento oxidado de apolipoproteína B, en el cual el fragmento oxidado es: IEIGLEGKGFEPTEALFGK, y en donde el anticuerpo o fragmento del mismo está **caracterizado porque** comprende la secuencia de ácido nucleico de la región variable pesada (VH) y la secuencia de ácido nucleico de la región variable ligera (VL) de: SEC ID N°:3 y SEC ID N°:4; o SEC ID N°:23 y SEC ID N°:24; o SEC ID N°:27 y SEC ID N°:28.
- 15 **5.** Método para la preparación de un anticuerpo aislado como se define en la Reivindicación 4, usando una biblioteca de fragmentos para generar fragmentos específicos de anticuerpo humano contra el fragmento oxidado de apolipoproteína B como se define en la Reivindicación 1, con lo cual fragmentos identificados de anticuerpo que tienen las características deseadas son reconstruidos en inmunoglobulinas humanas de longitud completa para ser usados para fines terapéuticos.
- 20 **6.** Método para amplificación de un anticuerpo humano aislado como se define en la Reivindicación 4, usando una tecnología recombinante, comprendiendo la transferencia de genes codificando las partes variables de scFv seleccionado a vectores IgG1 humanos de longitud completa usando una amplificación PCR en donde los iniciadores usados son:  
iniciadores para amplificación de segmentos VH:  
5'VH: 5'-GGTGTGCATTCCGAGGTGCAGCTGTTGGAG (SEC. ID. N°. 13)  
25 3'VH: 5'-GACGTACGACTCACCTGAGCTCACGGTGACCAG (SEC. ID. N°. 14)  
e iniciadores para amplificación de segmentos VL:  
5'VL: 5'-GGTGTGCATTCCCAGTCTGTGCTGACTCAG (SEC. ID. N°. 15)  
3'VL: 5'-GACGTACGTTCTACTCACCTAGGACCGTCAGCTT (SEC. ID. N°. 16).
- 30 **7.** Método según la Reivindicación 6 en donde las colonias conteniendo plásmidos de regiones de cadena pesada y de regiones de cadena ligera con insertos de región de variable pesada y de cadena de variable ligera son identificados por PCR de colonia usando  
Iniciador hacia delante: 5'-ATGGGTGACAATGACATC (SEC. ID. N°. 17)  
Iniciador reverso 5'-AAGCTTGCTAGCGTACG (SEC. ID. N°. 18).
- 35 **8.** Composición farmacéutica comprendiendo un anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo como se define en la Reivindicación 4 para tratamiento terapéutico o profiláctico de aterosclerosis por medio de inmunización pasiva, cuyo anticuerpo o fragmento de anticuerpo está presente en combinación con un excipiente farmacéutico.
- 40 **9.** Anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo dirigido hacia un fragmento oxidado de apolipoproteína B, en el cual el fragmento oxidado es: IEIGLEGKGFEPTEALFGK, y en donde el anticuerpo o fragmento del mismo está **caracterizado porque** comprende la secuencia de ácido nucleico de la región variable pesada (VH) y la secuencia de ácido nucleico de la región variable ligera (VL) de: SEC ID N°:3 y SEC ID N°:4; o SEC ID N°:23 y SEC ID N°:24; o SEC ID N°:27 y SEC ID N°:28  
para uso en medicina.
- 45 **10.** Anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo dirigido hacia un fragmento oxidado de apolipoproteína B, en el cual el fragmento oxidado es: IEIGLEGKGFEPTEALFGK, y en donde el anticuerpo o fragmento del mismo está **caracterizado porque** comprende la secuencia de ácido nucleico de la región variable pesada (VH) y la secuencia de ácido nucleico de la región variable ligera (VL) de: SEC ID N°:3 y SEC ID N°:4; o SEC ID N°:23 y SEC ID N°:24; o SEC ID N°:27 y SEC ID N°:28.  
para el tratamiento terapéutico o profiláctico de aterosclerosis por medio de inmunización pasiva.
- 50

FIG. 1

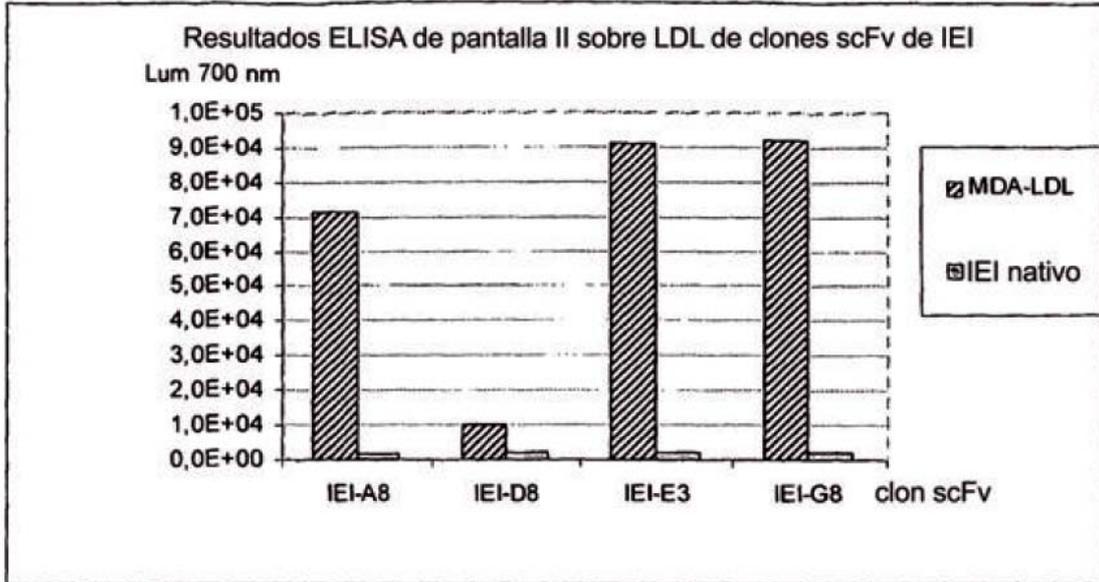


FIG. 1A

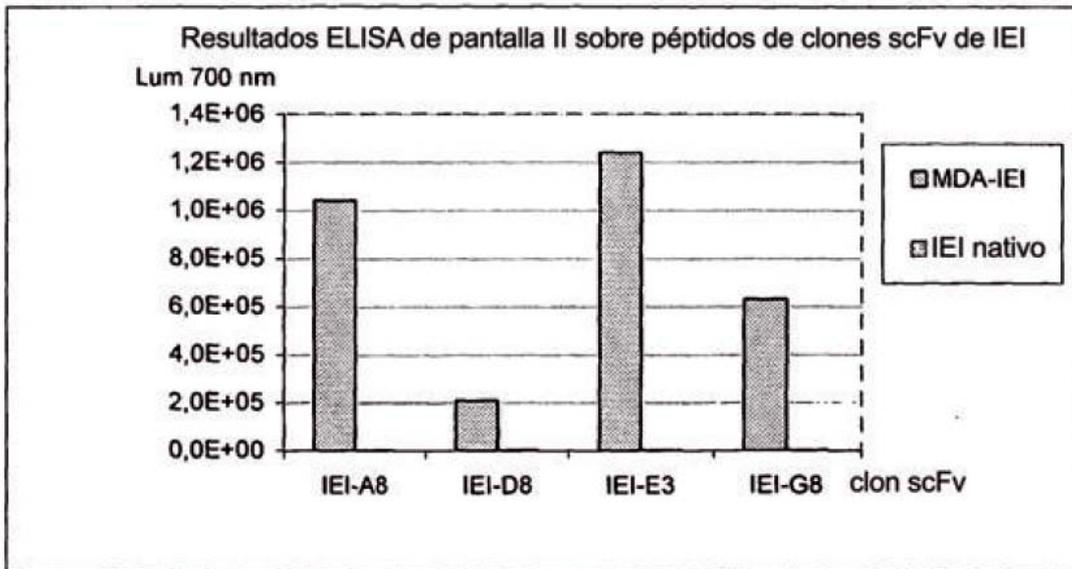


FIG. 1B

FIG. 1 (continuación)

Resultados ELISA de pantalla II sobre LDL de clones scFv de KTT

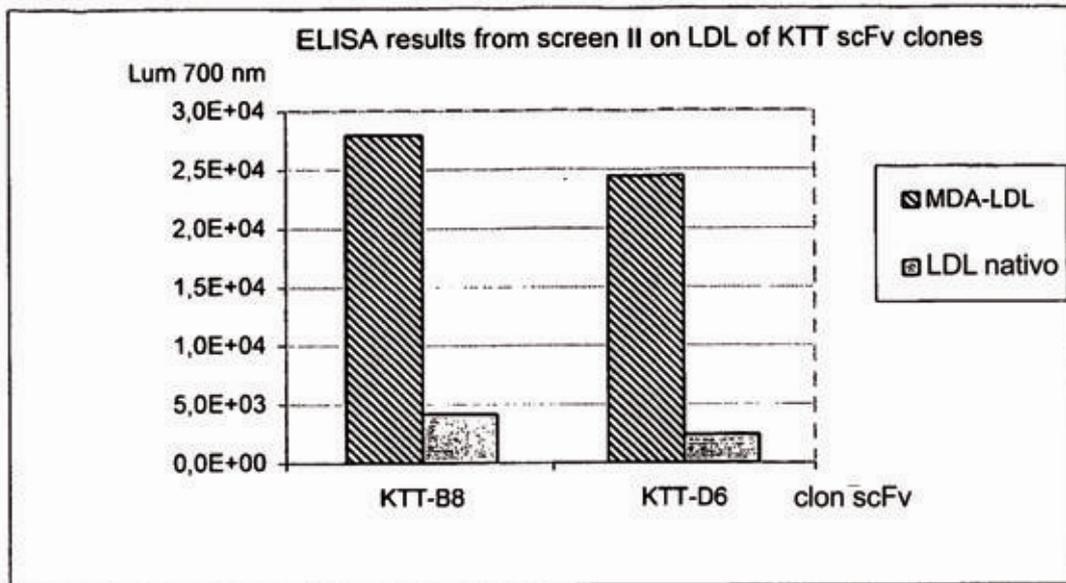


FIG. 1C

Resultados ELISA de pantalla II sobre péptidos de clones scFv de KTT

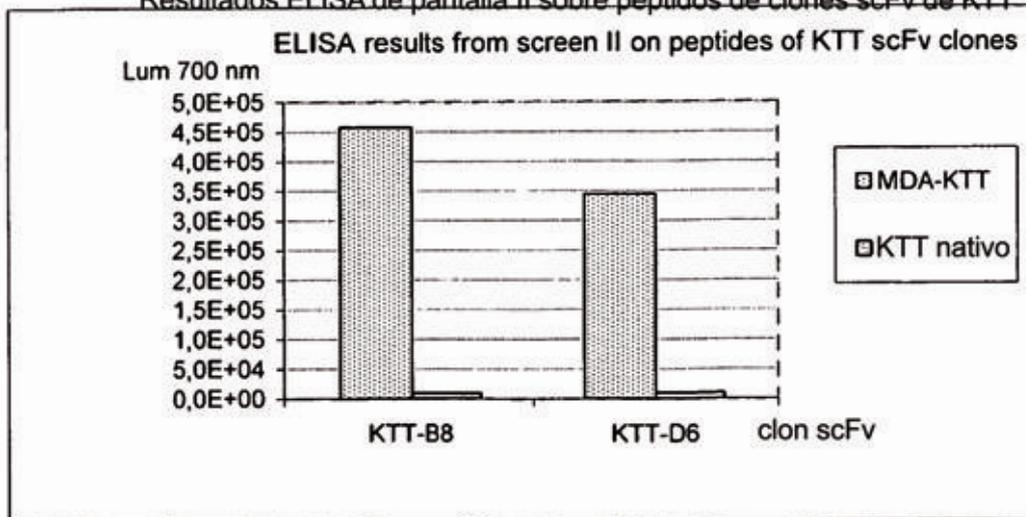


FIG. 1D

FIG. 2

Resultados de visualización III de titración sobre LDL modificado y LDL nativo no modificado

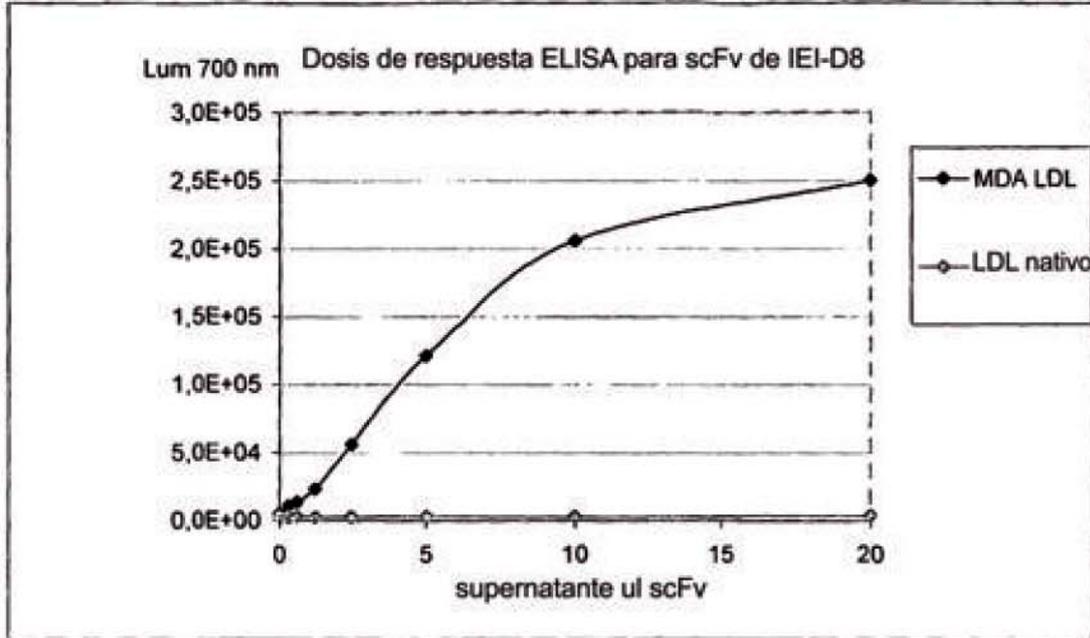


FIG. 2A

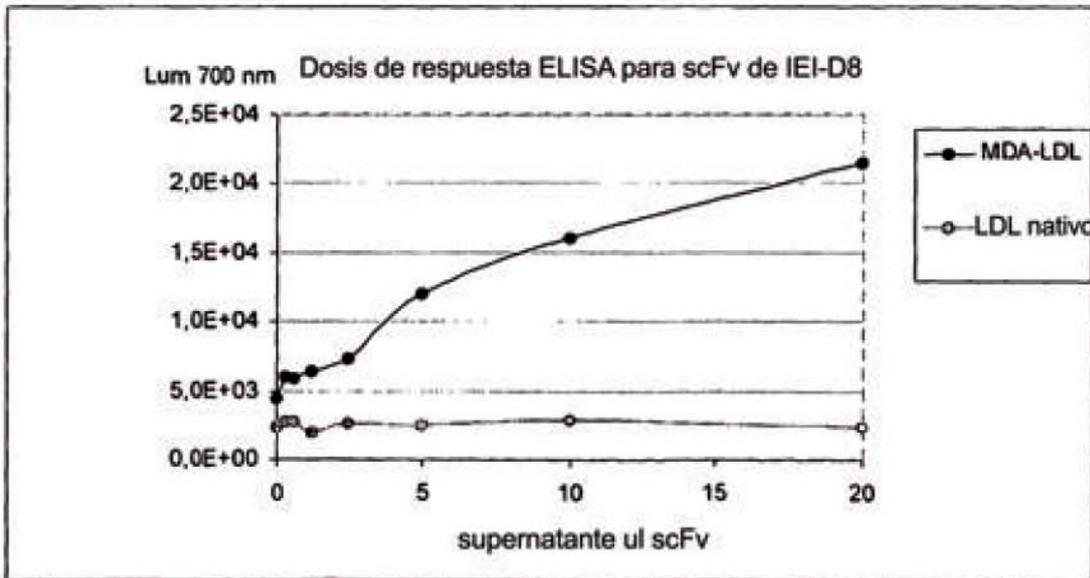


FIG. 2B

FIG. 2 cont'd

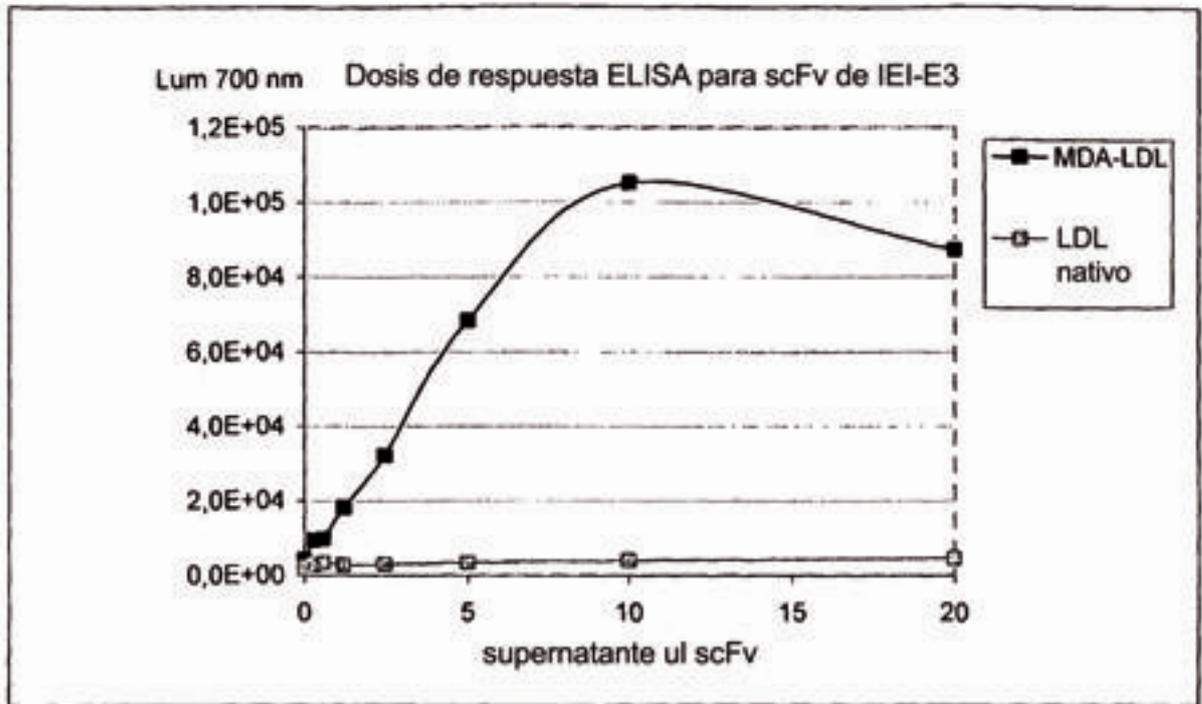


FIG. 2C

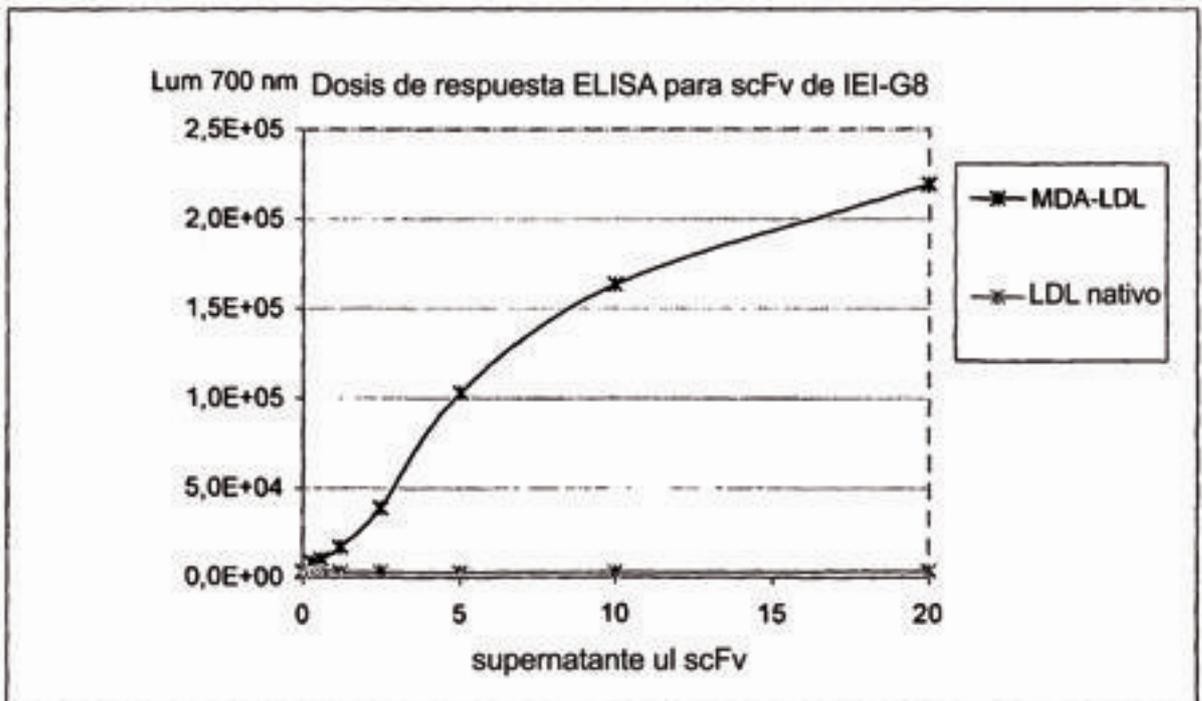


FIG. 2D

FIG. 2 cont'd

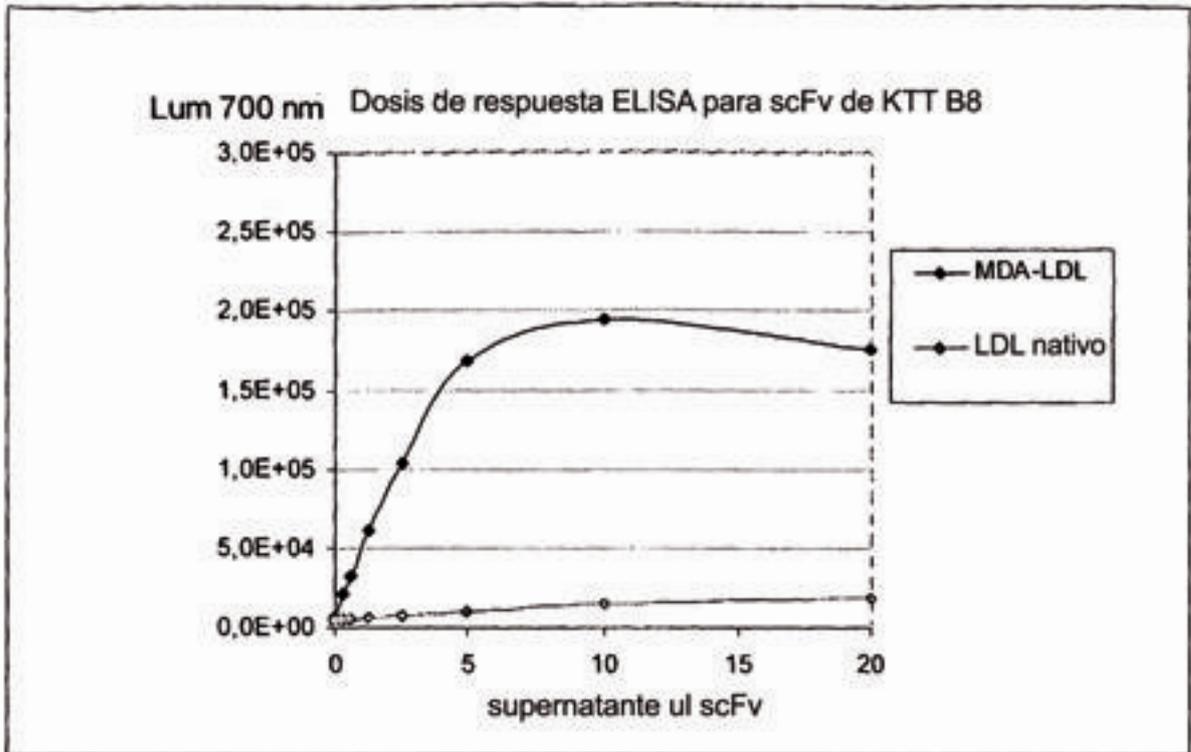


FIG. 2E

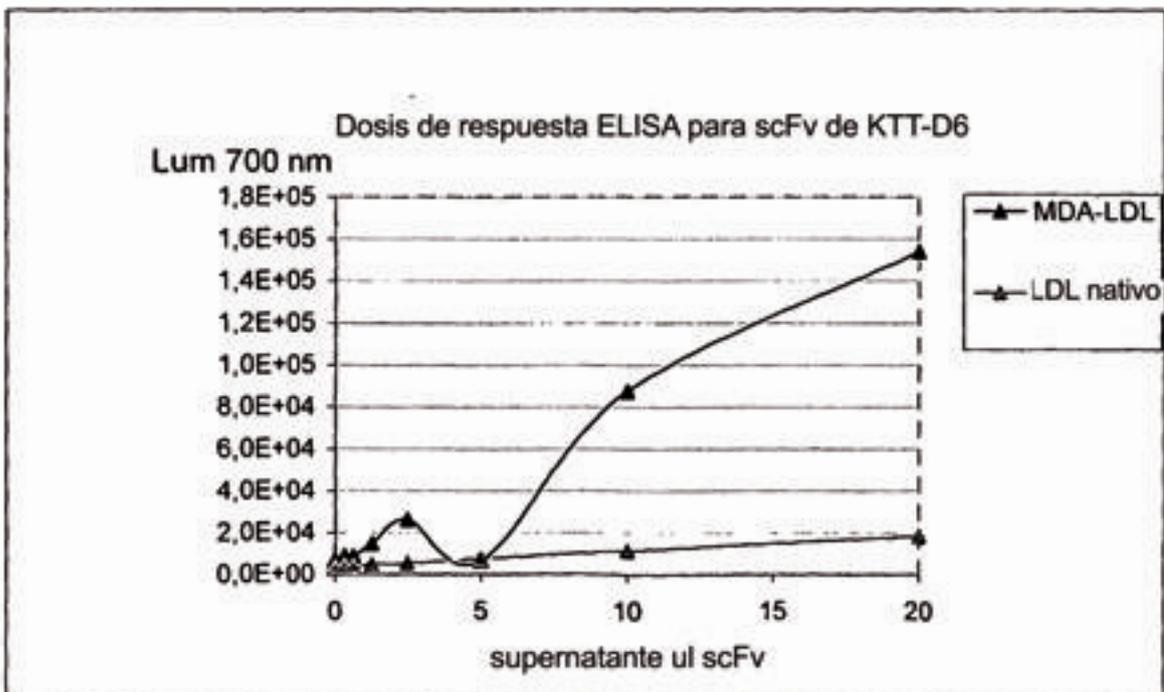


FIG. 2F

## FIG. 3

Secuencias de ADN de las regiones variables en los seis scFv que unen 100 péptidos de ApoB de MDA modificado

**IEIA8****Región Variable pesada (V<sub>H</sub>)**

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTC  
 CTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAATAACGCCTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGG  
 GAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCCATTAGTAGTAGTTACATATACTACGCAGACTC  
 AGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAA  
 CAGCCTGAGAGCCGAGGACACTGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGTCAGTAGGTACTACTACGG  
 ACCATCTTTCTACTTTGACTCCTGGGGCCAGGGTACACTGGTCACCGTGAGCAGC

**Región Variable ligera (V<sub>L</sub>)**

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCC  
 TGCTCTGGAAGCAGGTCCAACATTGGGAATAATTATGTATCCTGGTATCAGCAGCTCCCAGGA  
 ACGGCCCCCAAACCTCCTCATCTATGGTAACAACAATCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCT  
 CTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAG  
 GCTGATTACTGTGCAGCATGGGATGACAGCCTGAATGGTCATTGGGTGTTCCGGCGGAGGA  
 ACCAAGCTGACGGTCCTAGGT

**IEI-E3****Región Variable pesada (V<sub>H</sub>)**

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTC  
 CTGTGCGGCCTCTGGATTCACCTCAGTGACTACTACATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCCGG  
 GAAGGGGCTGGAGTGGGTATCGGGTGTTAGTTGGAATGGCAGTAGGACGCACTATGCAGACT  
 CTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAA  
 CAGCCTGAGAGCCGAGGACACTGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGCGGCTAGGTACTCCTACTA  
 CTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGTACACTGGTCACCGTGAGCAGC

**Región Variable ligera (V<sub>L</sub>)**

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCC  
 TGTTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAATAATGCTGTAAACTGGTATCAGCAGCTCCCAGGA  
 ACGGCCCCCAAACCTCCTCATCTATGGGAATGATCGGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCT  
 TCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAG  
 GCTGATTACTGTGCAGACCTGGGGCACTGGCCGGGGGTATTCGGCGGAGGAACCAAGCT  
 GACGGTCCTAGGT

**IEI-G8****Región Variable pesada (V<sub>H</sub>)**

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTC  
 CTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGTAGCTATTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGG  
 GAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAAGTATCAGTGGTAGTGGTCTAGGACATACTACGCAGACT  
 CCGTGCAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGA  
 ACAGCCTGAGAGCCGAGGACACTGCCGTGTATTACTGTGCGAGATTGGTCTCCTATGGTTCCG  
 GGAGTTTCGGTTTTGACTACTGGGGCCAAGGTACTACTGGTCACCGTGAGCAGC

**Región Variable ligera (V<sub>L</sub>)**

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCT  
 TGTTCTGGAAGCAGCTCCAATATCGGAAGTAATTATGTATCCTGGTATCAGCAGCTCCAGGAA  
 CGGCCCCAAACTCCTCATCTATGGTAACTACAATCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTC  
 TGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGG  
 CTGATTACTGTGCAGCATGGGATGACAGCCTGAGTGGTGGGTGTTCCGGCGGAGGAACCA  
 AGCTGACGGTCTAGGT

**IEI-D8****Región Variable pesada (V<sub>H</sub>)**

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTC  
 CTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAACGCCTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGTTCCAGG  
 GAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAACTCTTGGTGGTAGTGGTGGTGGTAGCACATACTACGCAG  
 ACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAA  
 TGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACTGCCGTGTATTACTGTGCGAAGTTAGGGGGGCGATCC  
 CGATATGGGCGGTGGCCCCGCCAATTTGACTACTGGGGCCAAGGTACTACTGGTCACCGTGAG  
 CAGC

**Región Variable ligera (V<sub>L</sub>)**

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCC  
 TGCTCTGGAAGCAGCTCCAACATTGAAATAACTATGTATCCTGGTATCAGCAGCTCCAGGAA  
 CGGCCCCAAACTCCTCATCTATAGTAATAATCAGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTC  
 TGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGG  
 CTGATTACTGTGCAGCATGGGATGACAGCCTGAGTCATTGGCTGTTCCGGCGGAGGAACCA  
 AGCTGACGGTCTAGGT

**KTT-D6****Región Variable pesada (V<sub>H</sub>)**

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTC  
 CTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTACTACTACATGAGCTGGATCCGCCAGGCTCCAGG  
 GAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAAGTATCAGTGGCCGTGGGGGTAGTTCCTACTACGCAGACT  
 CCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGA  
 ACAGCCTGAGAGCCGAGGACACTGCCGTGTATTACTGTGCGAGACTTTCCTACAGCTATGGTT  
 ACGAGGGGGCCTACTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGTACTACTGGTCACCGTGAGCAGC

**Región Variable ligera (V<sub>L</sub>)**

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCC  
 TGCTCTGGAAGCAGCTCCAACATTGGGAATAATTATGTATCCTGGTATCAGCAGCTCCAGGAA  
 CGGCCCCAAACTCCTCATCTATAGGAATAATCAGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCT  
 CTGGCTCCAAGTCTGGCACCTTAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGG  
 CTGATTACTGTGCAACCTGGGATGACAGCCTGAATGGTGGGTGTTCCGGCGGAGGAACCA  
 AGCTGACGGTCTAGGT

**KTT-B8**

**Región Variable pesada (V<sub>H</sub>)**

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTC  
 CTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGG  
 GAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCCATTAGTAGTAGTGGTCGTTTCATTTACTACGCAGACTC  
 AATGAAGGGCCGCTTCAACATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAAC  
 AGCCTGAGAGCCGAGGACACTGCCGTGTATTACTGTACGAGGCTCCGGAGAGGGGAGCTACTT  
 CTGGGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGTACACTGGTCACCGTGAGCAGC

**Región Variable ligera (V<sub>L</sub>)**

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCC  
 TGTCTGGAAGCAGCTCCAACATTGGCGGTGAGTCTGTATCCTGGTATCAGCAGCTCCAGGA  
 ACGGCCCCAAACTCCTCATCTATAGTAATAATCAGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCT  
 CTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAG  
 GCTGATTACTGTGCAGCATGGGATGACAGCCTGAATGGTTGGGTGTTCCGGCGAGGAACC  
 AAGCTGACGGTCCTAGGT

**1-B12**

**Región Variable pesada (V<sub>H</sub>)**

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTC  
 TCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGAACGTATTGGATGACCTGGGTCCGCCAGGCT  
 CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCTATTAGCAGTAGCAGTAATTACATATTCTAC  
 GCAGACTCAGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT  
 CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACTGCCGTGTATTACTGTGCGAGACTCAGA  
 CGGAGCAGCTGGTACGGGGGGTACTGGTTCGACCCCTGGGGCCAAGGTACACTGGTCACC  
 GTGAGCTCA

**Región Variable ligera (V<sub>L</sub>)**

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATC  
 TCCTGCTCTGGAAGCAGCTCCAACATTGGGAATAATTATGTATCCTGGTATCAGCAGCTC  
 CCAGGAACGGCCCCAAACTCCTCATCTATAGGAATAATCAGCGGCCCTCAGGGGTCCCT  
 GACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGG  
 TCCGAGGATGAGGCTGATTACTGTGCAGCATGGGATGACAGCCTGAATGGTCATTGG  
 GTTTCGGCGGAGGAACCAAGCTGACGGTCCTAGGT

**Clon: 1-C07**

**Región Variable pesada (V<sub>H</sub>)**

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCT  
CCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCAACTACATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCC  
AGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCCATTAGTAGTAGTAGTTACATATACTACGCA  
GACTCAGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGC  
AAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACTGCCGTGTACTGTGCGAGAGTAGGCCGGTA  
TAACTGGAAGACGGGGCATGCTTTTGATATCTGGGGCCAGGGTACACTGGTCACCGTGAGC  
TCA

**Región Variable ligera (V<sub>L</sub>)**

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCT  
CCTGCTCTGGAAGGACCTACAACATTGGAAATAATTATGTATCGTGGTATCAGCAGCTCCC  
AGGAACGGCCCCAACTCCTCATCTATGGTAACATCAATCGGCCCTCAGGGGTCCCTGAC  
CGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCG  
AGGATGAGGCTGATTACTGTGCAGCATGGGATGTCAGGCTGAATGGTTGGGTGTTCCG  
CGGAGGAACCAAGCTGACGGTCCTAGGT

**Clon: 1-C12**

**Región Variable pesada (V<sub>H</sub>)**

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTC  
TCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCCGTGACTACTACGTGAGCTGGATCCGCCAGGCT  
CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAAGTATTAGTGGTAGTGGGGGTAGGACATACTAC  
GCAGACTCCGTGGAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT  
CTGCAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACTGCCATGTACTGTGCCAGAGTATCC  
GCCCTTCGGAGACCCATGACTACAGTAACTACTTACTGGTTCGACCCCTGGGGCCAAGGT  
ACACTGGTCACCGTGAGCTCA

**Región Variable ligera (V<sub>L</sub>)**

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATC  
TCCTGCTCTGGAAGGAGCTCCAACATTGGGAATAGTTATGTCTCCTGGTATCAGCAGCTC  
CCAGGAACGGCCCCAACTCCTCATCTATAGGAATAATCAGCGGCCCTCAGGGGTCCCT  
GACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGG  
TCCGAGGATGAGGCTGATTACTGTGCAGGATGGGATGACACCCTGCGTGCTTGGGTG  
TTCGGCGGAGGAACCAAGCTGACGGTCCTAGGT

**Clon: 1-G10**

**Región Variable pesada (V<sub>H</sub>)**

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTC  
TCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAACGCCTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCT  
CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCCGCTATTAGTGGTAGTGGTAACACATACTATGCA  
GACTCCGTGAAGGGCCGTTCCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTG  
CAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACTGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGCCTCCCAC  
CGTATATTAGTTATGCTTTTGATATCTGGGGCCAGGGTACACTGGTCACCGTGAGCTCA

**Región Variable ligera (V<sub>L</sub>)**

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATC  
TCTTGTCTGGAAGCCGCTCCAACATCGGGAGAAATGCTGTTAGTTGGTATCAGCAGCTC  
CCAGGAACGGCCCCAACTCCTCATCTATGCTAACAGCAATCGGCCCTCAGGGGTCCCT  
GACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGG  
TCCGAGGATGAGGCTGATTACTGTGCAGCATGGGATGGCAGCCTGAATGGTTGGGTG  
TTCGGCGGAGGAACCAAGCTGACGGTCC

**Clon: 2-D03**

**Región Variable pesada (V<sub>H</sub>)**

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTC  
TCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAACGCCTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCT  
CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAAGTATTAGTGTGGTGGACATAGGACATATTAT  
GCAGATTCCGTGAAGGGCCGTTCCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT  
CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACTGCCGTGTATTACTGTGCACGGATACGG  
GTGGGTCCGTCCGGCGGGGCCTTTGACTACTGGGGCCAGGGTACACTGGTCACCGTGAGC  
TCA

**Región Variable ligera (V<sub>L</sub>)**

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCAT  
CTCCTGCTCTGGAAGCAACACCAACATTGGGAAGAACTATGTATCTTGGTATCAGCAGC  
TCCCAGGAACGGCCCCAACTCCTCATCTATGCTAATAGCAATCGGCCCTCAGGGGTC  
CCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCT  
CCGTCGAGGATGAGGCTGATTACTGTGCGTCATGGGATGCCAGCCTGAATGGTT  
GGGTATTCGGCGGAGGAACCAAGCTGACGGTCTAGGT

**Clon: 2-F07**

**Región Variable pesada (V<sub>H</sub>)**

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTC  
TCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAACGCCTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCT  
CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCCATTAGTAGTAGTAGTACATATACTAC  
GCAGACTCAGTGAAGGGCCGATCCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT  
CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACTGCCGTGTATTACTGTGCGAGGCTCACA  
AATATTTTGACTGGTTATTATACCTCAGGATATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGTACA  
CTGGTACCCTGAGCTCA

**Región Variable ligera (V<sub>L</sub>)**

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATC  
TCCTGCTCTGGAAGCACCTCCAACATTGGGAAGAATTATGTATCCTGGTATCAGCAGCTC  
CCAGGAACGGCCCCAAACTCCTCATCTATGGTAACAGCAATCGGCCCTCAGGGGTCCCT  
GACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGG  
TCCGAGGATGAGGCTGATTACTGTGCAGCATGGGATGCCAGCCTCAGTGGTTGGGTG  
TTCGGCGGAGGAACCAAGCTGACGGTCCTAGGT

**Clon: 2-F09**

**Región Variable pesada (V<sub>H</sub>)**

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTC  
TCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGTTCTTGGATGAGTTGGGTCCGCCAGGCT  
CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCCATTAGTAGTAGTAGTACATATACTAC  
GCAGACTCAGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT  
CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACTGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGTAGGG  
AACTACGGTTTCTACCACTACATGGACGTCTGGGGCCAAGGTACACTGGTCACCCTGAGC  
TCA

**Región Variable ligera (V<sub>L</sub>)**

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATC  
TCTTGTCTGGAGGCAGCTCAAACATCGGAAAAAGAGGTGTAAATTGGTATCAGCAGCTC  
CCAGGAACGGCCCCAAACTCCTCATCTATGGTAACAGAAATCGGCCCTCAGGGGTCCCT  
GACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGG  
TCCGAGGATGAGGCTGATTACTGTGCTACATGGGATTACAGCCTCAATGCTTGGGTG  
TTCGGCGGAGGAACCAAGCTGACGGTCCTAGGT

**Clon : 4-A02**

**Región variable pesada (V<sub>H</sub>)**

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTC  
TCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCTAGTAGCTATTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCT  
CCAGGGAAGGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCCATTAGTAGTAGTAGTTACATATACTAC  
GCAGACTCAGTGAAGGGCCGATTACCCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT  
CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACTGCCGTGTATTACTGTGCGAGAATTA  
CGGTTACGATTTCGGCTGGACCCCTTTTACTACTGGGGCCAGGGTACACTGGTCACCGTG  
AGCTCA

**Región variable ligera (V<sub>L</sub>)**

CAGTCTGTTCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATC  
TCCTGTTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAATAATGGTGTAACTGGTATCAGCAGCTC  
CCAGGAACGGCCCCAACTCCTCATCTATGGTAACAACAATCGGCCCTCAGGGGTCCCT  
GACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGG  
TCCGAGGATGAGGCTGATTACTGTGCAGCATGGGATGACAGCCTGCGTGGTTGGCTG  
TTCGGCGGAGGAACCAAGCTGACGGTCCTAGGT

**Clon 4-C03**

**Región variable pesada (V<sub>H</sub>)**

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTC  
TCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAACGCCTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCT  
CCAGGGAAGGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCCATTAGTAGTAGTAGTTACATATACTAC  
GCAGACTCAGTGAAGGGCCGATTACCCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT  
CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACTGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGTCAAT  
AGCAAAAAGTGGTATGAGGGCTACTTCTTTGACTACTGGGGCCAGGGTACACTGGTCACC  
GTGAGCTCA

**Región variable ligera (V<sub>L</sub>)**

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATC  
TCCTGCTCTGGAAGCAGCTCCAACATTGGGAATAATTATGTATCCTGGTATCAGCAGCTC  
CCAGGAACGGCCCCAACTCCTCATCTATGGTAACAGCAATCGGCCCTCAGGGGTCCCT  
GACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGG  
TCCGAGGATGAGGCTGATTACTGTGCAGCATGGGATGACAGTCTGAGTGGTTGGGTG  
TTCGGCGGAGGAACCAAGCTGACGGTCCTAGGT

**Clon: 4-D04**

**Región Variable pesada (V<sub>H</sub>)**

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTC  
TCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAACGCCTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCT  
CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCCATTAGTACTAGTAGTAATTACATATACTAC  
GCAGACTCAGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT  
CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACTGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGTCAAG  
AAGTATAGCAGTGGCTGGTACTCGAATTATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGTACACTG  
GTCACCGTGAGCTCA

**Región Variable ligera (V<sub>L</sub>)**

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATC  
TCCTGCTCTGGAAGCAGCTCCAGCATTGGGAATAATTTTGTATCCTGGTATCAGCAGCTC  
CCAGGAACGGCCCCAACTCCTCATCTATGACAATAATAAGCGACCCTCAGGGGTCCCT  
GACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGG  
TCCGAGGATGAGGCTGATTACTGTGCAGCATGGGATGACAGCCTGAATGGTTGGGTG  
TTCGGCGGAGGAACCAAGCTGACGGTCCTAGGT

FIG. 4

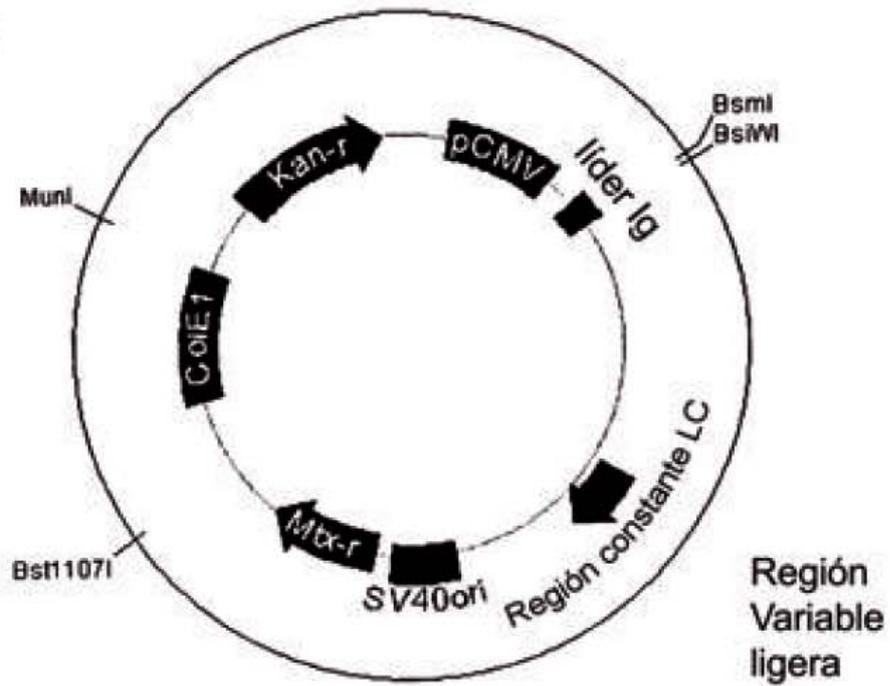


FIG. 4A

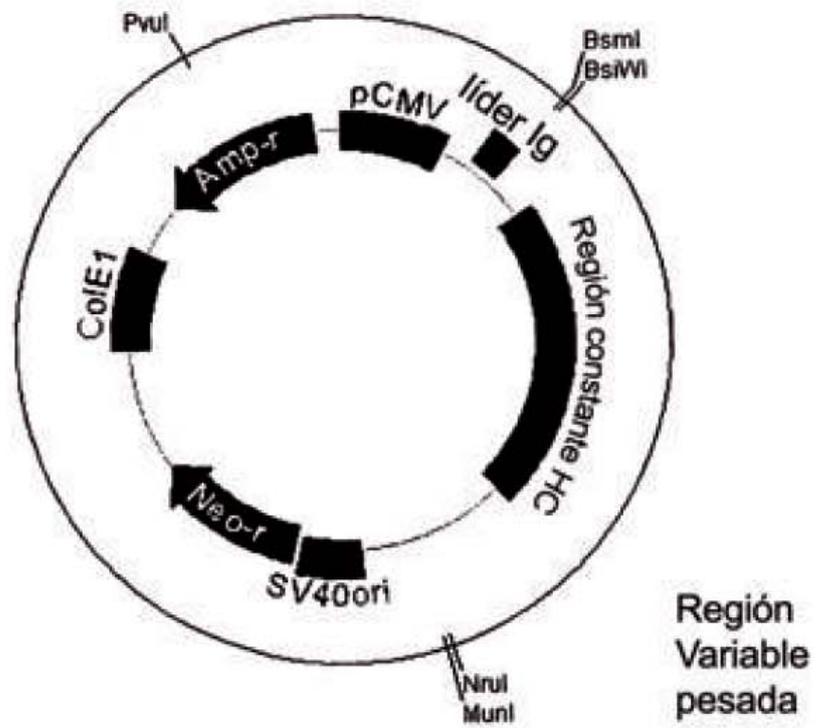
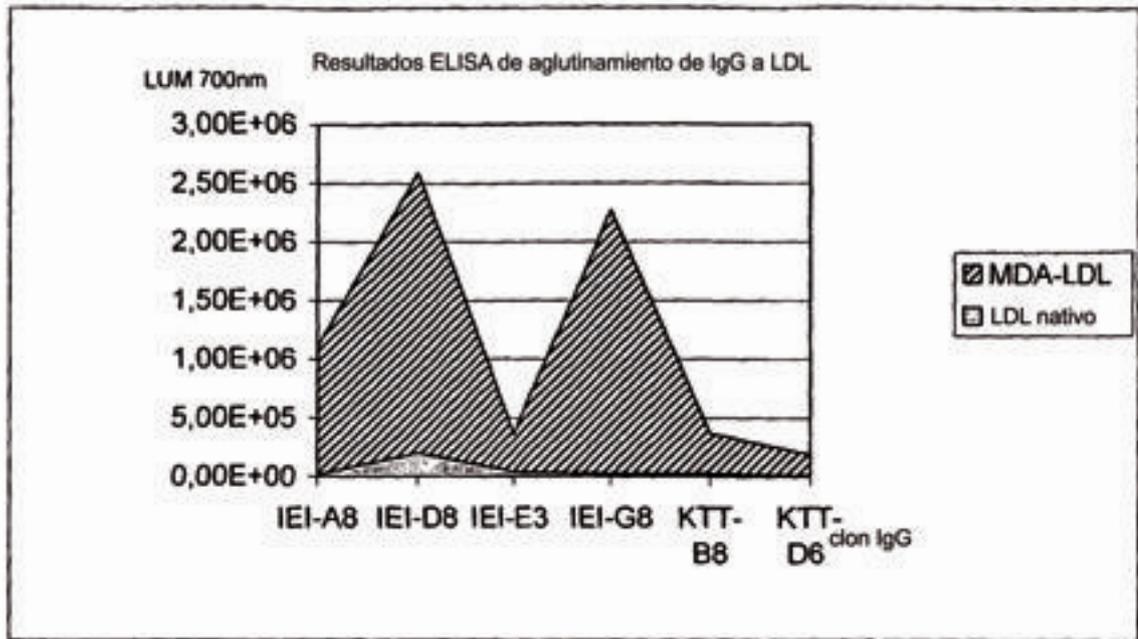


FIG. 4B

FIG. 5



Este gráfico muestra el resultado de 25ng de IgG purificado detectado con IgG-HRP antihumano de conejo (DAKO P214) y luminiscencia en 700nm. La placa era recubierta con 0.5 µg LDL/pocillo

FIG. 6

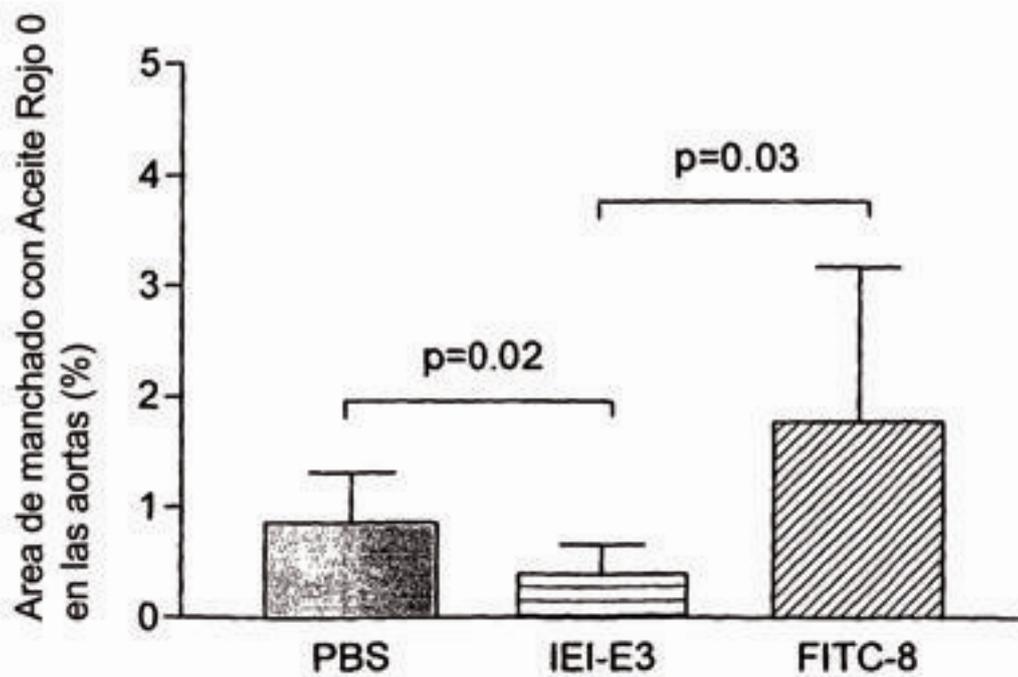


FIG. 7

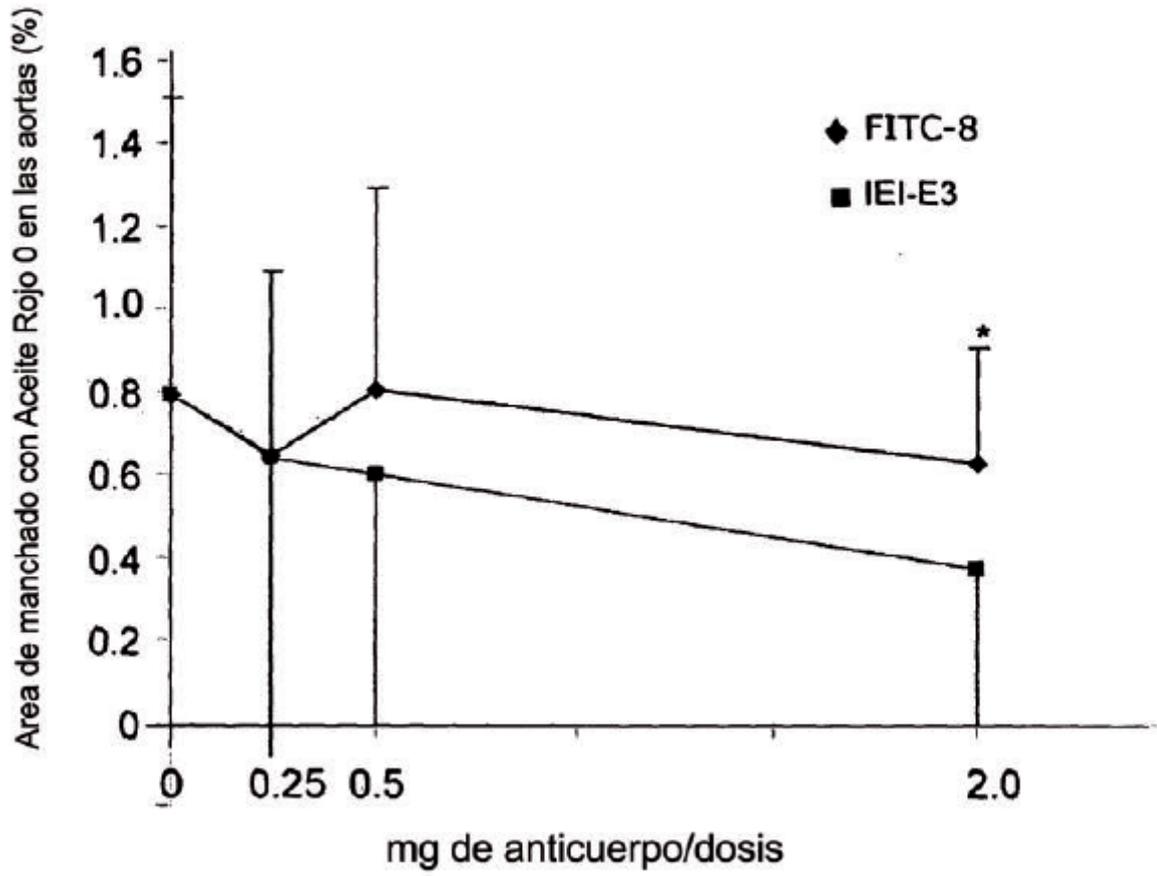
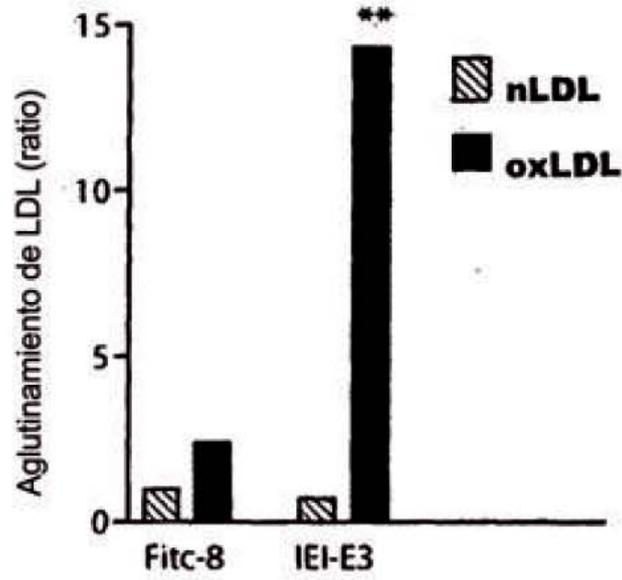


FIG. 8

a.



b.

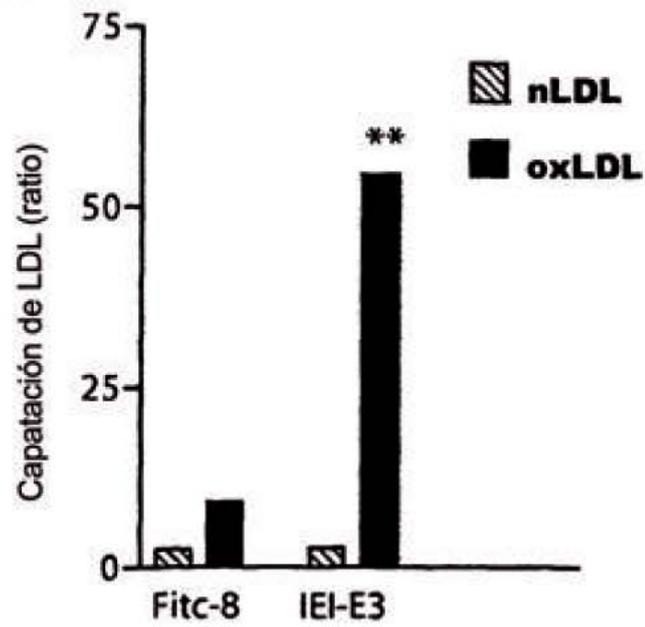


FIG. 9

