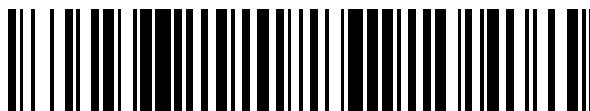


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 428 068**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)
C07K 16/44 (2006.01)
C12N 5/16 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/531 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C07K 16/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.04.2007 E 07861291 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2013 EP 2019842**

54 Título: **Anticuerpos de unión inmunosupresores y procedimientos para la obtención y la utilización de los mismos**

30 Prioridad:

24.04.2006 US 794370 P
03.11.2006 US 856614 P
23.04.2007 US 788949

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.11.2013

73 Titular/es:

ABBOTT LABORATORIES (100.0%)
100 ABBOTT PARK ROAD
ABBOTT PARK, IL 60064, US

72 Inventor/es:

SIEGEL, ROBERT, W.;
TYNER, JOAN, D. y
NAKAGAWA, TERRY, Y.

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 428 068 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos de unión inmunosupresores y procedimientos para la obtención y la utilización de los mismos

5 **Campo de la invención**

Entre otras cosas, la presente invención se refiere a anticuerpos aislados que se unen inmunoespecíficamente con una elevada afinidad de unión al agente inmunosupresor tacrolimus. La presente invención también se refiere a un inmunoensayo diagnóstico *in vitro* para el tacrolimus, en el que dicho inmunoensayo comprende un anticuerpo de la presente invención.

Antecedentes de la invención

El tacrolimus, también conocido como FK506, es el nombre genérico del macrólido inmunosupresor producido por la bacteria *Streptomyces tsukubaensis*, en el suelo (véase, Inamura, N., y col., Transplantation, 45 (1): 206 - 209 (1988)). La primera generación principal de metabolitos del tacrolimus son tacrolimus 13-O-desmetilados ("M-I"), tacrolimus 31-O-desmetilados ("M-II"), y tacrolimus 15-O-desmetilados ("M-III"). El tacrolimus se ha usado por vía intravenosa y oral para la prevención del rechazo de órganos, particularmente en pacientes que reciben un trasplante de hígado, de riñón o de médula ósea.

La ciclosporina ("CsA") es un fármaco inmunosupresor obtenido a partir de ciertos hongos del suelo. Aunque principalmente se usa para prevenir el rechazo de órganos después del trasplante, la CsA también se ha usado para tratar otras enfermedades, tales como la anemia aplásica, o para prevenir la enfermedad del injerto frente al hospedador (GVHD).

El tacrolimus tiene una potencia *in vivo* 50 - 100 veces mayor que la ciclosporina CsA (véase, Murthy, J. N., y col., Clinical Biochemistry, 31 (8): 613 - 617 (1998)). El efecto inmunosupresor del tacrolimus es similar al de la CsA y se cree que es a través de la inhibición selectiva de la producción de linfocitos T citotóxicos. *Id.* A nivel molecular, parece que el tacrolimus bloquea selectivamente las actividades transcripcionales tempranas en la respuesta de los linfocitos T. *Id.* Esta acción del tacrolimus se atribuye a la unión del fármaco a unas proteínas citosólicas específicas denominadas inmunofilinas para formar un complejo. *Id.* este complejo interactúa con una calcineurina dependiente de calcio-vías de translocación de calmodulina, e inhibe la translocación nuclear de un factor transcripcional ("NF-AT"), que se une a una secuencia de polinucleótidos promotora de los genes de la IL-2, necesarios para la transcripción del ARNm de la IL-2.

Clínicamente, se sabe que el tacrolimus reduce los episodios de rechazo en los pacientes trasplantados. Aunque es terapéuticamente beneficioso, el tacrolimus muestra una cierta toxicidad similar a la de la CsA, que incluye nefrotoxicidad, complicaciones del tracto gastrointestinal y neurotoxicidad. *Id.* Al contrario que la CsA, el tacrolimus no provoca hirsutismo ni hipercolesterolemia. *Id.* En vista de los problemas de toxicidad relacionados con el tacrolimus, se usan inmunoensayos para monitorizar las concentraciones sanguíneas de tacrolimus en pacientes que reciben tratamiento con este fármaco.

En el mercado hay disponible una variedad de diferentes inmunoensayos diagnósticos para monitorizar las concentraciones sanguíneas de tacrolimus. Muchos de estos inmunoensayos usan disolventes orgánicos para extraer el tacrolimus de las muestras de sangre completa. El disolvente orgánico aumenta la constante de disociación en equilibrio (K_D) y/o disminuye la actividad funcional del anticuerpo usado en los ensayos. La reducida actividad del anticuerpo conduce a una menor sensibilidad del ensayo y potencialmente reduce la precisión y la robustez. Se han realizado intentos de aumentar la sensibilidad del ensayo reduciendo la cantidad de disolvente orgánico usada durante el proceso de extracción. Sin embargo, se encontró que la reducción en la cantidad de disolvente afectaba a la eficacia de extracción, y por lo tanto, a la reproducibilidad del ensayo.

De forma análoga, en el mercado hay disponible una variedad de diferentes inmunoensayos diagnósticos para monitorizar las concentraciones sanguíneas de CsA, por ejemplo, utilizando un anticuerpo anti-ciclosporina. La bibliografía actual sugiere que la generación de metabolitos de la CsA puede enmascarar la concentración del fármaco parental activo (CsA). La dosis apropiada del inmunosupresor CsA es crítica para los pacientes con trasplantes de órganos.

El artículo de Takamura K. y col. ("A Highly Sensitive method to Assay FK-506 Levels in Plasma", Transplantation Proceedings, 1 de octubre de 1987 - 19: 23 - 29) desvela anticuerpos anti-tacrolimus 1-60-46 y un anticuerpo policlonal con una mayor sensibilidad que el anticuerpo 1-60-46.

Por lo tanto, hay una necesidad en la técnica de nuevos anticuerpos que tengan unas características de unión mejoradas (tales como afinidad y especificidad) que puedan ser usados en dichos inmunoensayos diagnósticos *in vitro*.

Resumen de la invención

En un aspecto, la presente invención se refiere a un anticuerpo aislado que se une específicamente al agente inmunosupresor tacrolimus, donde dicho anticuerpo tiene un dominio pesado variable y un dominio ligero variable, comprendiendo el dominio pesado variable una región determinante de la complementariedad de la cadena pesada ("CDR") 1, una CDR 2 de la cadena pesada y una CDR 3 de la cadena pesada, comprendiendo el dominio de cadena ligera variable una CDR 1 de la cadena ligera, una CDR 2 de la cadena ligera y una CDR 3 de la cadena ligera, donde

(a) la CDR 1 de la cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos de: Gly - Phe - Thr - Phe - Ser - Ser - Tyr - Gly - Met - Ser (SEC ID N°: 2);

(b) la CDR 2 de la cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos con una fórmula de:
Thr - Ile - Ser - Ser - Gly - Gly - Xaa₁ - Xaa₂ - Xaa₃ - Phe (SEC ID N°: 33)

donde Xaa₁ se elige de entre el grupo que consiste en treonina (Thr), alanina (Ala), lisina (Lys) y ácido glutámico (Glu);

donde Xaa₂ se elige de entre el grupo que consiste en tirosina (Tyr) y triptófano (Trp); y

donde Xaa₃ se elige de entre el grupo que consiste en treonina (Thr) y valina (Val);

(c) la CDR 3 de la cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos con una fórmula de: Gln - Thr - Asp - Gly - Tyr - Ser - Trp - Phe - Pro - Tyr (SEC ID N°: 6);

(d) la CDR 1 de la cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos con una fórmula de:

Lys - Ser - Ser - Xaa₄ - Xaa₅ - Xaa₆ - Val - His - Ser - Thr - Gly - Asn - Thr - Phe - Leu - Glu (SEC ID N°: 34)

donde Xaa₄ se elige de entre el grupo que consiste en: glutamina (Gln), alanina (Ala) y glicina (Gly);

donde Xaa₅ se elige de entre el grupo que consiste en: serine (Ser) y glicina (Gly); y

donde Xaa₆ se elige de entre el grupo que consiste en: isoleucina (Ile) y leucina (Leu);

(e) la CDR 2 de la cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos con una fórmula de:

Lys - Ile - Ser - Asn - Arg - Phe - Ser (SEC ID N°: 11)

(f) la CDR 3 de la cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos con una fórmula de:

Phe - Gln - Gly - Xaa₇ - Xaa₈ - Xaa₉ - Pro - Leu - Thr (SEC ID N°: 35),

donde Xaa₇ se elige de entre el grupo que consiste en: Serina (Ser) y Glicina (Gly);

donde Xaa₈ se elige de entre el grupo que consiste en: histidina (His), arginina (Arg), valina (Val), treonina (Thr), lisina (Lys) y serina (Ser); y

donde Xaa₉ se elige de entre el grupo que consiste en: valina (Val), alanina (Ala), ácido aspártico (Asp), cisteína (Cys) y Serina (Ser);

con la condición de que si en la CDR 2 de la cadena pesada Xaa₁ es Thr, Xaa₂ es Tyr y Xaa₃ es Thr y en la CDR 1 de la cadena ligera Xaa₄ es Gln, Xaa₅ es Ser y Xaa₆ es Ile, entonces en la CDR 3 de la cadena ligera Xaa₉ es distinto a Val si Xaa₇ es Ser y Xaa₈ es His, o Xaa₈ es distinto a His si Xaa₇ es Ser y Xaa₉ es Val o Xaa₇ es distinto a Ser si Xaa₈ es His y Xaa₉ es Val; donde el anticuerpo tiene una K_D de entre 1,89 x 10⁻¹¹ M y 1,0 x 10⁻¹³ M cuando el anticuerpo no ha sido expuesto ni se ha incubado con al menos un diluyente de selección, y una K_D de entre 1,51 x 10⁻¹⁰ y 1,0 x 10⁻¹² M cuando el anticuerpo se ha expuesto a, o incubado con, o está en presencia de, al menos un diluyente de selección.

El al menos un diluyente de selección puede comprender un tampón, una sal, un detergente, un competidor de unión, un disolvente o combinaciones de los mismos. El tampón puede ser MES, MOPS, HEPES, TRIS, fosfato, citrato o borato. La sal puede ser NaCl, KCl o sulfato de cinc. El detergente puede ser un detergente aniónico, un detergente catiónico, un detergente no iónico o un detergente anfótero. El competidor de unión puede ser un hapteno metabolito, una hormona, un fármaco, una enzima, un receptor, una proteína, un péptido, un polipéptido, oligonucleótidos, un polinucleótido o un reactivo con una menor afinidad cruzada que un epítipo de interés. El disolvente puede ser dimetilformamida, dimetilsulfóxido, polietilenglicol, etilenglicol, metanol, etanol o combinaciones de los mismos.

En otros aspectos, la presente invención se refiere a la línea celular de ovario de hámster chino 1-60-46 AM2 de CHO 2-577 (también conocida como "línea celular CHO: Tacrolimus 1-60-46 AM2 de CHO 2-577" o "Tacrolimus 1-60-46 AM2 de CHO 2-577") con un número de acceso de la A.T.C.C. PTA-7436, a un anticuerpo elaborado partir del ADN extraído de una línea celular de ovario de hámster chino 1-60-46 AM2 de CHO 2-577 con un número de acceso de la A.T.C.C. PTA-7436, y a un anticuerpo o un fragmento de unión al tacrolimus del mismo producido por una línea celular de ovario de hámster chino 1-60-46 AM2 de CHO 2-577, donde dicha línea celular tiene un número de acceso de la A.T.C.C. PTA-7436.

En otros aspectos más, la presente invención se refiere a una línea celular de ovario de hámster chino 1-60-46 AM2 de CHO 1-1157 (también conocida como "línea celular CHO: Tacrolimus 1-60-46 AM2 de CHO 1-1157" o "Tacrolimus 1-60-46 AM2 de CHO 1-1157" o "1-1157") con un número de acceso de la A.T.C.C. PTA-7446, a un anticuerpo elaborado partir del ADN extraído de una línea celular de ovario de hámster chino 1-60-46 AM2 de CHO 1-1157 con un número de acceso de la A.T.C.C. PTA-7446 y a un anticuerpo quimérico o un fragmento de unión al tacrolimus del mismo producido por una línea celular de ovario de hámster chino 1-60-46 AM2 de CHO 1-1157, donde dicha línea celular tiene un número de acceso de la A.T.C.C. PTA-7446.

En el anticuerpo descrito anteriormente: (1) Xaa₁ es Thr, Xaa₂ es Trp, Xaa₃ es Thr, Xaa₄ es Gln, Xaa₅ es Ser, Xaa₆ es Ile, Xaa₇ es Ser, Xaa₈ es Hes y Xaa₉ es Val; (2) Xaa₁ es Ala, Xaa₂ es Trp, Xaa₃ es Thr, Xaa₄ es Gln, Xaa₅ es Ser, Xaa₆ es Ile, Xaa₇ es Ser, Xaa₈ es Hes y Xaa₉ es Val; (3) Xaa₁ es Lys, Xaa₂ es Trp, Xaa₃ es Val, Xaa₄ es Gln, Xaa₅ es Ser, Xaa₆ es Ile, Xaa₇ es Ser, Xaa₈ es Hes y Xaa₉ es Val; (4) Xaa₁ es Glu, Xaa₂ es Trp, Xaa₃ es Thr, Xaa₄ es Gln, Xaa₅ es Ser, Xaa₆ es Ile, Xaa₇ es Ser, Xaa₈ es Hes, y Xaa₉ es Val; (5) Xaa₁ es Glu, Xaa₂ es Trp, Xaa₃ es Thr, Xaa₄ es Gln, Xaa₅ es Ser, Xaa₆ es Ile, Xaa₇ es Gly, Xaa₈ es Val, y Xaa₉ es Cys; (29) Xaa₁ es Glu, Xaa₂ es Trp, Xaa₃ es Thr, Xaa₄ es Gly, Xaa₅ es Gly, Xaa₆ es Leu, Xaa₇ es Ser, Xaa₈ es His y Xaa₉ es Ser; o (30) Xaa₁ es Ala, Xaa₂ es Trp, Xaa₃ es Thr, Xaa₄ es Gln, Xaa₅ es Gly, Xaa₆ es Leu, Xaa₇ es Ser, Xaa₈ es His y Xaa₉ es Ser.

El anticuerpo descrito anteriormente puede ser un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo humano, un anticuerpo totalmente humanizado, un anticuerpo parcialmente humanizado, un anticuerpo animal, un anticuerpo recombinante, un anticuerpo quimérico, un Fv de cadena individual, un anticuerpo de cadena individual, un anticuerpo de dominio individual, un fragmento Fab, un fragmento F(ab'), un Fvs unido por disulfuro, un anticuerpo anti-idiotípico o a un fragmento de unión al epítipo funcionalmente activo de los mismos.

En otro aspecto adicional más, la presente invención se refiere a un inmunoensayo diagnóstico *in vitro* para el tacrolimus, donde dicho inmunoensayo comprende cualquiera de los anticuerpos descritos anteriormente. Adicionalmente, dicho inmunoensayo puede comprender: (1) un anticuerpo individual que se une específicamente al tacrolimus o (2) un compañero de unión específico adicional del tacrolimus.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1A muestra la estructura del tacrolimus. La Figura 1B muestra un esquema de la expresión del anticuerpo scFv de la superficie de una célula de levadura. La Figura 1C muestra un diagrama bivariado que representa la expresión de scFv frente a la unión al antígeno del scFv de la cepa natural ("WT") 1-60-46 de levadura determinada mediante un ensayo de citometría de flujo. La Figura 1D muestra un diagrama de la velocidad de disociación del ensayo de citometría de flujo del scFv 1-60-46 de la WT de tacrolimus.

Las Figuras 2A y 2B muestran las secuencias de ácidos nucleicos de la secuencia 1-60-46 de la cadena variable pesada ("VH") de la WT de tacrolimus (SEC ID N°: 43) (Figura 2A) y la secuencia de la cadena variable ligera ("VL") (SEC ID N°: 45) (Figura 2B). Los códigos de tres letras que representan los aminoácidos codificados por las secuencias de ácidos nucleicos se muestran en la parte superior. La Figura Comparativa 3 muestra una representación esquemática de las genotecas mutagénicas de la región determinante de complementariedad ("CDR") de la 1-60-46 de la VH de tacrolimus. Los nombres de las genotecas se indican a la izquierda de cada una de las 3 secuencias de aminoácidos sometidas a una aleatorización. Las secuencias de aminoácidos de las CDRs 1-60-46 de las VH de tacrolimus se muestran debajo de cada CDR.

La Figura Comparativa 4 muestra una representación esquemática de las shows genotecas mutagénicas de la CDR 1-60-46 de la VL de tacrolimus. Los nombres de las genotecas se indican a la izquierda de cada una de las 3 secuencias de aminoácidos sometidas a una aleatorización. Las secuencias de aminoácidos de las CDRs 1-60-46 de las VL de tacrolimus se muestran debajo de cada CDR.

Las Figuras Comparativas 5A - 5C muestran diagramas bivariados de una genoteca mutagénica de la CDR 1-60-46 representativa de tacrolimus durante 3 rondas de selección. La expresión del ScFv está indicada en el eje X y está representada frente a la unión al antígeno, que se muestra en el eje Y. Unos filtros de clasificación representativa aislaron el 0,1% - 1,0% más brillante de los clones de unión al antígeno, y éstos se representan en cada diagrama.

La Figura Comparativa 6 muestra una tabla que compara las secuencias de aminoácidos de las regiones 1-60-46 de la VH de la WT de tacrolimus (SEC ID N°: 1 - 7) con los clones mutantes aislados a partir de genotecas mutagénicas de CDR de la VH. Los nombres de los clones se indican a la izquierda y las diversas regiones que comprenden la secuencia de la VH se muestran en la parte superior. Los aminoácidos que difieren de la secuencia 1-60-46 de la WT están en negrita y subrayados. Las regiones H2 de las CDR de los diversos clones mutantes se muestran en las SEC ID N°: 15 - 18.

Las Figuras Comparativas 7A - 7B muestran un diagrama que compara las secuencias de aminoácidos de las regiones 1-60-46 de la VL de la WT de tacrolimus (SEC ID N°: 8 - 14) los clones mutantes aislados a partir de genotecas mutagénicas de CDR de la VL. Los nombres de los clones se indican a la izquierda y las diversas regiones que comprenden la secuencia de la VH se muestran en la parte superior. Los aminoácidos que difieran de la secuencia 1-60-46 de la WT están en negrita y subrayados (Figura 7A). Las regiones L1 de la CDR de los clones mutantes se muestran en las SEC ID N°: 19 - 22 (Figura 7B). Las regiones L3 de la CDR de los clones mutantes se muestran en las SEC ID N°: 23 - 32.

La Figura Comparativa 8 muestra un diagrama que compara los parámetros de afinidad del clon de scFv 1-60-46 de la WT de tacrolimus con mutantes únicos. Los nombres de los clones se indican a la izquierda. Los clones que contienen varias mutaciones de combinación se nombran mediante la lista secuencial de los clones que contienen las mutaciones individuales. Los parámetros de afinidad ensayados (con o sin metanol al 10%) se muestran en la parte superior. Los valores de mejora se determinaron usando la proporción entre el valor del scFv 1-60-46 de la WT y el valor del scFv mutante para el parámetro descrito.

Las Figuras Comparativas 9A - 9B muestra un análisis de afinidad del scFv 1-60-46 de la WT de tacrolimus y los clones mutantes de combinación (H2 1A / L1 - 1B / L3-2B, H2 - 1A / L1 - 1B / L3 -A, H2 - 1A / L3 - 1B y H2 -1B / L1 - 1B / L3 -1B) en un diluyente de selección (formado por PBS, BSA al 1% y metanol al 10%). La Figura 9A muestra el análisis de la velocidad de disociación. Las señales de unión al antígeno se normalizaron frente a un control de rx sin disociación para cada clon y se representaron gráficamente frente al tiempo, medido en segundos. La Figura 9B muestra un análisis de la constante de disociación en equilibrio (K_D). Las señales de unión al antígeno se normalizaron al valor máximo de intensidad de fluorescencia media en condiciones de saturación de antígeno para cada clon, y se representaron gráficamente frente a la concentración de antígeno (que se denomina "bt-tacro"). La Figura Comparativa 10A muestra un diagrama que compara los residuos de aminoácidos de todas las regiones CDR de VH y VL de los clones mutantes 1-60-46 de tacrolimus convertidos en IgG con la secuencia 1-60-46 de la WT (WT). Las diversas mutaciones de combinación presentes en cualquier secuencia dada se indican a la izquierda mediante una lista secuencial de los clones que contienen las mutaciones individuales. La nomenclatura resultante para cada IgG 1-60-46 mutante producida se muestra a la derecha (a saber, AM1, AM2, AM3, AM4 o AM5). Los aminoácidos que difieren de la secuencia 1-60-46 de la WT están en negrita y subrayados. La Figura 10B muestra un diagrama que muestra los resultados del inmunoensayo que compara la IgG 1-60-46 de la WT con varias IgG 1-60-46 mutantes (AM1, AM2 o AM3) usando un tampón de extracción de ensayo (el tampón de extracción de ensayo contenía metanol al 90%, etilenglicol al 10% y sulfato de cinc 100 mM). Las micropartículas recubiertas con las IgG nombradas se incubaron con antígeno de tacrolimus marcado (que se usó como trazador) a varias concentraciones de antígeno de tacrolimus sin marcar (0 ng/ ml - 30 ng/ ml). La proporción entre la señal del trazador (que se muestra en el eje X) está representada frente a la concentración de tacrolimus sin marcar (que se muestra en el eje Y).

La Figura 11 muestra la secuencia de ácidos nucleicos de la IgG 1-60-46 de la cadena pesada de AM2 del tacrolimus murino (SEC ID Nº: 39). La correspondiente secuencia de aminoácidos (SEC ID Nº: 40) codificada por la secuencia de ácidos nucleicos se muestra en la parte superior. La Figura 12 muestra la secuencia de ácidos nucleicos 1-60-46 de la cadena ligera de la AM2 del tacrolimus murino (SEC ID Nº: 41). La correspondiente secuencia de aminoácidos (SEC ID Nº: 42) codificada por la secuencia de ácidos nucleicos está en la parte superior. Las Figuras Comparativas 13A y 13B muestran las secuencias de ácidos nucleicos de la secuencia 29-56-14 de la cadena pesada variable (VH) de ciclosporina del hibridoma de la WT (SEC ID Nº: 55) y la secuencia de la cadena ligera variable (VL) (SEC ID Nº: 57). Los códigos de tres letras que representan los aminoácidos (SEC ID Nº: 56 y 58, respectivamente) codificados por las secuencias de ácidos nucleicos se muestran en la parte superior.

La Figura Comparativa 14 muestra las secuencias 29-56-14 de la WT y de la CDR de la mutante de combinación R2-9. Se identificaron las mutaciones de aminoácidos que contribuyen a mejorar la reactividad cruzada para la mutante R2-9 en CDR-H2, H3, L2, y L3. Las secuencias mutadas que difieren de la 29-56-14 de la WT de la CsA están indicadas en negrita y subrayada.

Las Figuras Comparativas 15A y 15B muestran los datos de la CI50 para la 29-56-14 de la WT y los clones mutantes de R2-9 de levadura para la unión de la bt-CsA medida con concentraciones crecientes del metabolito M17 ensayadas en (a) un diluyente fisiológico (formado por PBS, pH 7,4 y BSA al 1%); o (b) un diluyente de selección (formado por PBS, BSA al 1% y metanol al 10%). La Figura Comparativa 16 muestra la estructura de la ciclosporina A (a la izquierda) y de un metabolito de la ciclosporina A (a la derecha), que se denomina en este documento "AM1 o M17". La fórmula molecular y el peso molecular de la ciclosporina A y del metabolito M17 (AM1) están indicados después de la correspondiente estructura.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Según se usa en este documento, los términos "anticuerpo" y "anticuerpos" se refieren a anticuerpos monoclonales, anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados (completamente o parcialmente humanizados), anticuerpos animales (tales como, pero no limitados a, un ave (por ejemplo, un pato o un ganso), un tiburón o una ballena, un mamífero, incluyendo un no primate (por ejemplo, una vaca, un cerdo, un camello, una llama, un caballo, una cabra, un conejo, una oveja, hámsteres, un cobaya, un gato, un perro, una rata, un ratón, etc.) o un primate no humano (por ejemplo, un mono, tal como un mono cinomólogo, un chimpancé, etc.), anticuerpos recombinantes, anticuerpos quiméricos, Fvs de cadena individual ("scFv"), anticuerpos de cadena individual, anticuerpos de dominio individual, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), Fvs unidos por disulfuro ("sdFv"), y anticuerpos anti-idiotípicos ("anti-Id") (incluyendo, por ejemplo, anticuerpos anti-Id contra los anticuerpos de la presente invención), y fragmentos de unión al epítipo funcionalmente activos de cualquiera de los anteriores. En particular, los anticuerpos incluyen moléculas de inmunoglobulina y fragmentos inmunológicamente activos de moléculas de inmunoglobulina, a saber, moléculas que contienen un sitio de unión al antígeno. Las moléculas de

inmunoglobulina pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA y IgY), clase (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ y IgA₂) o subclase. Un anticuerpo cuya afinidad (a saber, K_D , k_d o k_a) ha sido aumentada o mejorada a través del cribado de una genoteca de anticuerpos de combinación que ha sido preparada mediante el uso de la bioexpresión, se denomina este documento "anticuerpo de afinidad madurado".

Según se usa en este documento, "específico" o "especificidad" en el contexto de una interacción entre miembros de un par de unión específico (según se define en este documento, por ejemplo, un antígeno y un anticuerpo) se refiere a la reactividad selectiva de la interacción.

Según se usa en este documento, el término "constante de la velocidad de asociación", " k_{on} " o " k_a " según se usa de forma intercambiable en este documento, se refiere al valor que indica la fuerza de unión (grado) de un anticuerpo con su antígeno objetivo con la velocidad de formación del complejo entre un anticuerpo y un antígeno, según se muestra mediante lo siguiente:



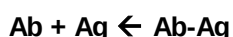
Los procedimientos para determinar las constantes de la velocidad de asociación son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede usarse un ensayo Biacore® (Suecia). Adicionalmente, también puede usarse un ensayo KinExA® (*Kinetic Exclusion Assay*, ensayo de exclusión cinética), disponible en Sapidyne Instruments (Boise, Idaho).

Según se usa en este documento, el término "bioexpresión" o "formato de bioexpresión" se refiere a cualquier sistema o metodología de expresión *in vitro* que acopla el genotipo de un gen de interés con su fenotipo codificado, permitiendo así que la secuencia de polinucleótidos (ADN) que codifica para la proteína que muestra un rasgo de interés pueda ser recuperada. Algunos ejemplos de sistemas o metodologías de bioexpresión incluyen, pero no se limitan a, expresión en levadura, expresión en fago, expresión bacteriana, expresión ribosómica/ARNm, expresión de ADN y compartimentalización *in vitro*. Más específicamente, según se describe con más detalle en este documento, se construyó un anticuerpo 1-60-46 de tacrolimus, se clonó en un plásmido permitiendo así su expresión inducible en la superficie de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, y se transformó de forma estable en dicha levadura hospedadora en virtud de un marcador auxótrofo presente en el plásmido.

Según se usa en este documento, el término "competidor de unión" se refiere a cualquier molécula que compita o reaccione de forma cruzada con una molécula que contiene un epítipo de interés, impidiendo que interactúe o se una con su compañero de unión específico. Preferiblemente, la molécula que compite o reacciona de forma cruzada con la molécula que contiene el epítipo de interés se une al compañero de unión específico con una afinidad menor (tal como, pero no se limita a, una menor K_D , una mayor k_d o una menor k_a) que la molécula que contiene el epítipo de interés. Algunos ejemplos de competidor de unión incluyen, pero no se limitan a, metabolitos (por ejemplo, metabolitos de fármacos, incluyendo, pero no limitándose a, agentes inmunodepresores), tales como tacrolimus 13-O-desmetilado ("M-I"), tacrolimus 31-O-desmetilado ("M-II") y tacrolimus 15-O-desmetilado ("M-III"), que son metabolitos de tacrolimus o M1, M8, M9, M13 M17, M18 o M21, que son los metabolitos de ciclosporina, haptenos, hormonas, fármacos, enzimas, receptores, proteínas, péptidos, polipéptidos, oligonucleótidos o polinucleótidos. Por ejemplo, el anticuerpo de ciclosporina tiene una K_D para el fármaco de ciclosporina parental de $9,5 \times 10^{-10}$ M y una K_D para el metabolito M17 de $1,45 \times 10^{-8}$ M.

Según se usa en este documento, los términos "reaccionar de forma cruzada" o "reactividad cruzada" se refieren a la capacidad de dos epítopos, moléculas o ligandos para reaccionar con el mismo sitio del mismo compañero de unión específico, típicamente con unas afinidades diferentes.

Según se usa en este documento, el término "constante de la velocidad de disociación", " k_{off} " o " k_d " según se usa de forma intercambiable en este documento, se refiere al valor que indica la fuerza de disociación (grado) de un anticuerpo de su antígeno objetivo, o la separación del complejo Ab-Ag con el tiempo en Ab y antígeno libres, según se muestra mediante lo siguiente:



Los procedimientos para determinar las constantes de la velocidad de asociación son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede usarse un ensayo Biacore® (Suecia). Adicionalmente, también puede usarse un ensayo KinExA® (*Kinetic Exclusion Assay*, ensayo de exclusión cinética), disponible en Sapidyne Instruments (Boise, Idaho).

Según se usa en este documento, el término "constante de inhibición", " K_i ", se refiere a la concentración del competidor de unión que ocuparía el 50% de los sitios de unión disponibles de un miembro de un par de unión específico (por ejemplo, un anticuerpo) en ausencia del otro miembro del par de unión específico (por ejemplo, el antígeno reconocido específicamente por dicho anticuerpo) según se muestra mediante la siguiente ecuación:

$$K_i = C_{I_{50}} / (1 + ([A] / K_D))$$

donde $C_{I_{50}}$ equivale a la concentración del competidor de unión que desplaza el 50% de la unión específica a una concentración en particular de antígeno marcado, $[A]$ equivale a la concentración del antígeno marcado usado en el ensayo, y K_D equivale a la constante de disociación en equilibrio de los miembros del par de unión (por ejemplo, antígeno y anticuerpo).

Según se usa en este documento, el término "epítipo", "epítipos" o "epítipos de interés" se refieren a un(os) sitio(s) de cualquier molécula que es (son) reconocidos y es (son) capaz (ces) de unirse a un(os) sitio(s) complementario(s) de su compañero de unión específico. La molécula y el compañero de unión específicos son parte de un par de unión específico. Por ejemplo, un epítipo puede ser un polipéptido, una proteína, un hapteno, un antígeno de carbohidrato (tal como, pero no se limita a, glucolípidos, glucoproteínas o lipopolisacáridos) o un polisacárido y su compañero de unión específico puede ser, pero no se limita a, un anticuerpo.

Según se usa en este documento, el término "constante de disociación en equilibrio" o " K_D " según se usa de forma intercambiable en este documento, se refiere al valor obtenido dividiendo la constante de la velocidad de disociación (k_{off}) por la constante de la velocidad de asociación (k_{on}). La constante de la velocidad de asociación, la constante de la velocidad de disociación y la constante de disociación en equilibrio se usan para representar la afinidad de unión del anticuerpo a un antígeno.

Según se usa en este documento, el término anticuerpo "humanizado" se refiere a una variante de una inmunoglobulina o un fragmento de la misma que es capaz de unirse a un antígeno predeterminado y que comprende regiones en marco que tienen sustancialmente la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana y CDRs que tienen sustancialmente la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina no humana. Habitualmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en él procedentes de una fuente que no es humana. En general, el anticuerpo humanizado incluirá sustancialmente todos o al menos uno, típicamente dos, dominios variables (tales como Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fabc, Fv) en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR se corresponden con aquellas de una inmunoglobulina no humana, y todas o sustancialmente todas las regiones en marco ("FR") son aquellas de una secuencia consenso de una inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado comprende óptimamente al menos una porción de una región constante de una inmunoglobulina ("Fc"), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Generalmente, el anticuerpo contendrá tanto la cadena ligera como al menos el dominio variable de una cadena pesada. El anticuerpo humanizado puede elegirse de entre cualquier clase de inmunoglobulinas, incluyendo IgM, IgG, IgD, IgA y IgE, y cualquier isotipo, incluyendo IgG₁, IgG₂, IgG₃ y IgG₄. El anticuerpo humanizado puede comprender secuencias de más de una clase o isotipo, y la selección de los dominios constantes en particular para optimizar las funciones efectoras deseadas, está en el conocimiento de los expertos en la técnica.

Según se usa en este documento, la frase "se une específicamente a un agente inmunosupresor" y términos análogos de la misma, se refieren a péptidos, polipéptidos, proteínas, proteínas de fusión y anticuerpos que se unen específicamente al agente inmunosupresor tacrolimus y que no se unen específicamente a otros competidores (tales como, pero no se limitan a, metabolitos, péptidos, polipéptidos, proteínas, agentes o fármacos). Un péptido, un polipéptido, una proteína o un anticuerpo que se une específicamente a un agente inmunosupresor puede unirse a otros metabolitos, péptidos, polipéptidos, proteínas, agentes o fármacos con una afinidad de unión menor según se determina mediante, por ejemplo, inmunoensayos diagnósticos, BIAcore®, KinExA® u otros ensayos conocidos en la técnica. Los anticuerpos o los fragmentos de anticuerpos que se unen inmuno-específicamente a un agente inmunosupresor pueden ser identificados, por ejemplo, mediante inmunoensayos diagnósticos, BIAcore®, KinExA® u otras técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Un anticuerpo se une inmuno-específicamente a un agente inmunosupresor con una afinidad de unión mayor que a un antígeno de reactividad cruzada, según se determina mediante el uso de técnicas experimentales, tales como, pero no se limitan a, radioinmunoensayos ("RIA") y ensayos de inmunoabsorción enzimática ("ELISAs") (véase, por ejemplo, Paul, ed., Fundamental Immunology, 2^a ed., Raven Press, Nueva York, páginas 332 - 336 (1989)). Por ejemplo, en la presente invención, un anticuerpo se une inmuno-específicamente a un agente inmunosupresor cuando muestra, como una inmunoglobulina, una constante de disociación en equilibrio (K_D) para el agente inmunosupresor de al menos $1,9 \times 10^{-11}$ M en ausencia de un diluyente de selección (tal como un diluyente de selección que contiene disolución salina tamponada con fosfato ("PBS"), albúmina sérica bovina al 1% ("BSA"), y metanol al 10%) o menos de $1,52 \times 10^{-10}$ M cuando se expone a, se incuba con, o está en presencia de, un diluyente de selección (tal como un agente de selección que contiene PBS, BSA al 1% y metanol al 10%) según se determina mediante un ensayo KinExA® en unas condiciones de ensayo estándar (según las recomendaciones del fabricante), y en particular, el ensayo KinExA® descrito en el Ejemplo 10.

Según se usa en este documento, el término "agente inmunosupresor" es tacrolimus y se refiere a un fármaco que disminuye o detiene la actividad del sistema inmunitario en un sujeto. Los agentes inmunosupresores pueden ser administrados a un sujeto para prevenir que el sistema inmunitario del sujeto produzca una respuesta inmunitaria después de un trasplante de un órgano, o para el tratamiento de una enfermedad que está provocada por un sistema inmunitario hiperactivo.

Según se usa en este documento, el término "aislado" en el contexto de moléculas de ácidos nucleicos se refiere a

una molécula de ácido nucleico que se separa de otras moléculas de ácidos nucleicos que están presentes en la fuente natural de la molécula de ácido nucleico. Además, una molécula de ácido nucleico "aislada", tal como una molécula de ADNc, puede estar sustancialmente exenta de otro material o medio de cultivo celular cuando se produce mediante técnicas recombinantes, o sustancialmente exenta de precursores químicos o de otros compuestos químicos cuando se sintetiza químicamente.

Según se usa en este documento, la frase "diluyente fisiológico" se refiere a cualquier material líquido o sólido que pueda ser usado para imitar, aproximarse a, o simular, las condiciones fisiológicas *in vivo* del sujeto (preferiblemente un ser humano), del que deriva dicha muestra (tal como una muestra de ensayo). La composición del diluyente fisiológico no es crítica, y variará dependiendo de cómo se vaya a usar el disolvente. Por ejemplo, un diluyente fisiológico puede comprender al menos un tampón (el al menos un tampón puede usarse para modular (aumentar o disminuir) el pH de la muestra), al menos una sal (la al menos una sal puede usarse para modular (aumentar o disminuir) la concentración salina de la muestra), al menos una proteína (la al menos una proteína puede usarse para evitar una unión no específica o para estabilizar otras proteínas contenidas en la muestra), etc. Además, un diluyente fisiológico puede comprender cualquier combinación de al menos un tampón, al menos una sal, al menos una proteína, etc.

Por ejemplo, es bien conocido en la técnica que una vez que se obtiene una muestra de prueba a partir de un sujeto, dicha muestra de prueba ya se considera que no está en "condiciones fisiológicas" o es "no fisiológica". Antes de usar dicha muestra en un ensayo, puede usarse un diluyente fisiológico y añadirse a la muestra de prueba para imitar, aproximarse a, o simular, las fundiciones fisiológicas *in vivo* del sujeto a partir del cual deriva la muestra, o, en otras palabras, para hacer que la muestra de prueba sea más "de tipo fisiológico". Una muestra de ensayo se considera que imita, se aproxima o simula las condiciones fisiológicas, que es "de tipo fisiológico", cuando dicha muestra de prueba (a) tiene un pH de entre 7,35 y 7,45; (b) contiene una sal sódica en la cantidad de 136 a 146 mmol/l; (c) contiene una sal potásica en la cantidad de 3,5 a 5,1 mmol/l; (d) contiene cinc en la cantidad de 10,7 a 22,9 mmol/l; (e) contiene metanol en una cantidad menor de 0,05 mmol/l; o (f) cualquier combinación de (a) - (e). (Las condiciones fisiológicas de las muestras de ensayo se describen en Tietz, ed., Clinical Guide to Laboratory Tests, WB Saunders, Filadelfia, PA, página 695 (1983)).

Algunos ejemplos de los tampones que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, tampones de MES, MOPS, HEPES, TRIS, fosfato, citrato, borato o combinaciones de los mismos.

Algunos ejemplos de sales que pueden usarse son cloruro sódico, cloruro potásico, sulfato de cinc o combinaciones de las mismas.

Algunos ejemplos de proteínas que pueden usarse son albúmina sérica bovina ("BSA"), gelatina de pescado, gammaglobulina bovina o combinaciones de las mismas.

Según se usa en este documento, el término "diluyente de selección" se refiere a cualquier material líquido o sólido que: (a) es conocido por el experto en la materia por alterar la constante de disociación en equilibrio (K_D) de al menos un anticuerpo, o el experto en la materia cree que es probable que altere la K_D de al menos un anticuerpo si dicho anticuerpo se incubara con, se usara con o se expusiera a, dicho diluyente de selección; (b) es conocido por el experto en la materia por alterar la actividad funcional de al menos un anticuerpo, o el experto en la materia cree probable que altere la actividad funcional de al menos un anticuerpo si dicho anticuerpo se incubara con, se usara con o se expusiera a, dicho diluyente de selección; o (c) cualquier combinación de los (a) - (b) descritos anteriormente. El diluyente de selección descrito en este documento puede usarse de varias formas, sin embargo, preferiblemente, el diluyente de selección se usa para aproximar, imitar o simular las condiciones de reacción de un inmunoensayo diagnóstico. La composición del diluyente de selección no es crítica, y variará dependiendo de cómo se vaya a usar el diluyente de selección. Por ejemplo, un diluyente de selección puede comprender al menos un tampón, al menos una sal, al menos un detergente, al menos un competidor de unión, al menos un disolvente, etc. Además, un diluyente de selección puede comprender cualquier combinación de al menos un tampón, al menos una sal, al menos un detergente, al menos un competidor de unión, al menos un disolvente, etc. A modo de otro ejemplo, un diluyente de selección puede comprender PBS (pH 7,4), BSA al 1% y metanol al 10%. A modo de otro ejemplo más, un diluyente de selección puede comprender PBS (pH 7,4), BSA al 1% y entre aproximadamente 5 hasta aproximadamente 200 nM de un competidor de unión. Sin embargo, según se indicó previamente, la cantidad en exceso de un competidor de unión puede variar, de forma que la cantidad de competidor de unión en el diluyente de selección puede variar, por ejemplo, desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 100 nM, desde aproximadamente 100 hasta aproximadamente 1000 nM, aproximadamente 5 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 25 nM, aproximadamente 100 nM, o aproximadamente 200 nM.

Puede usarse un tampón de extracción de ensayo usado en un ensayo diagnóstico que comprende una combinación de disolventes y al menos una sal, tal como metanol al 90%, etilenglicol al 10% y sulfato de cinc (tal como sulfato de cinc 100 mM), para extraer el tacrolimus a partir de las proteínas séricas contenidas en una muestra de prueba de sangre completa obtenida de un sujeto que está recibiendo dicho agente inmunosupresor como parte del tratamiento del sujeto. El tampón de extracción de ensayo usado para extraer el tacrolimus de las muestras de prueba de sangre completa se diluye subsiguientemente antes de que se encuentre con un reactivo de detección, tal

como un anticuerpo. A pesar de la dilución, todavía hay presente (o queda) una cierta cantidad de tampón de extracción (por ejemplo, metanol al 10%) en la muestra de ensayo y se sabe que aumenta la K_D , disminuye la actividad funcional o aumenta la K_D y disminuye la actividad funcional de los anticuerpos usados en los inmunoensayos diagnósticos para monitorizar las concentraciones sanguíneas de tacrolimus en los sujetos descritos anteriormente. El experto en la técnica puede esperar que dichos tampones de extracción que contienen estos disolventes orgánicos aumentarían probablemente la K_D (y por lo tanto disminuirían la k_a y aumentarían la k_d), disminuirían probablemente la actividad funcional, o aumentarían probablemente la K_D y disminuiría la actividad funcional de futuros anticuerpos desarrollados para su uso en dichos inmunoensayos diagnósticos. Por lo tanto, puede usarse un diluyente de selección, tal como un diluyente de selección que contiene PBS, BSA al 1% y metanol al 10%, para imitar, aproximarse o simular las condiciones de reacción de un inmunoensayo diagnóstico que es probable que aumente la K_D , que es probable que disminuye la actividad funcional, o que es probable que aumente la K_D y disminuya la actividad funcional de un anticuerpo que se va a ensayar.

A modo de otro ejemplo, puede usarse un diluyente de selección que comprende uno o más competidores de unión para competir con una u otras moléculas por la unión a un epítipo de interés o que interfiera en la unión de una u otras moléculas de interés a un epítipo de interés en la muestra de prueba. Específicamente, un diluyente de selección que comprende uno o más competidores de unión puede alterar las condiciones de una muestra de prueba desplazando o impidiendo la unión de un analito de interés a otro componente de la muestra de prueba. Alternativamente, puede usarse un diluyente de selección que comprende uno o más competidores de unión con objeto de ensayar y/o aislar reactivos de detección (tal como un anticuerpo marcado) con una especificidad mayor por el analito de interés. Por ejemplo, puede usarse un diluyente de selección que comprende uno o más competidores de unión para determinar el grado de reactividad cruzada que tiene un anticuerpo por uno o más competidores de unión, o puede usarse para proporcionar unas condiciones para aislar un anticuerpo con una reactividad cruzada mejorada (es decir, disminuida) hacia uno o más competidores de unión. A lo largo de estas líneas, la presente invención proporciona, entre otras cosas, la mejora en el reconocimiento por parte del anticuerpo del fármaco parental activo (por ejemplo, ciclosporina o tacrolimus) en presencia de uno o más de sus respectivos metabolitos principales (por ejemplo, M-I, M-II, M-III, M1, M8, M9, M13, M17, M18 y M21).

Algunos ejemplos de los tampones que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, tampones de MES, MOPS, HEPES, TRIS, fosfato, citrato, borato o combinaciones de los mismos.

Algunos ejemplos de sales que pueden usarse son cloruro sódico, cloruro potásico, sulfato de cinc o combinaciones de las mismas.

Algunos ejemplos de detergentes que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, detergentes aniónicos, detergentes catiónicos, detergentes no iónicos o detergentes anfóteros. Puede usarse un diluyente de selección que contenga uno o más detergentes para estabilizar y/o solubilizar proteínas u otros analitos de interés contenidos en una muestra, tal como una muestra de prueba, para evitar una unión no específica durante el transcurso de un inmunoensayo diagnóstico, para romper las células contenidas en una muestra, etc. Algunos detergentes aniónicos incluyen, pero no se limitan a, ácido cenodesoxicólico, sal sódica del ácido cenodesoxicólico, ácido cólico, ácido deshídrocólico, digitonina, digitoxigenina, N-óxido de N,N-dimetildodecilamina, sal sódica de docusato, sal sódica del ácido glicocenosodesoxicólico, ácido glicocólico hidratado, sal sódica del ácido glicocólico hidratado, ácido glicodesoxicólico monohidratado, sal disódica del ácido glicolítico 3-sulfatado, éster etílico del ácido glicolítico, sal sódica de la N-lauroilsarcosina, disolución de N-lauroilsarcosina, dodecil sulfato de litio, disolución de lugol, sal sódica del ácido 1-octanosulfónico, 1-butanosulfonato de sodio, 1-decanosulfonato de sodio, de sodio 1-dodecanosulfonato, 1-heptanosulfonato de sodio anhidro, 1-nonanosulfonato de sodio, 1-propanosulfonato de sodio monohidratado, 2-bromoetanosulfonato de sodio, colato de sodio hidratado, coleato de sodio, desoxicolato de sodio, desoxicolate de sodio monohidratado, dodecil sulfato de sodio, de sodio hexano sulfonato anhidro, sodium octil sulfato, pentanosulfonato de sodio anhidro, taurocolato de sodio, sal sódica del ácido tauroquenosodesoxicólico, sal sódica del ácido taurodeoxicólico monohidratado, sal sódica del ácido taurodeoxicólico hidratado, sal disódica del ácido tauroglicolítico 3-sulfatado, sal sódica del ácido tauroursodesoxicólico, ácido ursodesoxicólico o combinaciones de los mismos, todos disponibles en Sigma-Aldrich, St. Louis, MI.

Algunos detergentes catiónicos incluyen, pero no se limitan a, bromuro de alquiltrimetilamonio, cloruro de benzalconio, cloruro de bencildimetilhexadecilamonio, bromuro de bencildimetilhexadecilamonio, tetracloroyodato de benciltrimetilamonio, bromuro de dimetildioctadecilamonio, bromuro de dodeciletildimetilamonio, bromuro de dodeciltrimetilamonio, bromuro de etilhexadeciltrimetilamonio, reactivo T de Girard, bromuro de hexadeciltrimetilamonio o combinaciones de los mismos, todos disponibles en Sigma-Aldrich, St. Louis, MI.

Algunos detergentes no iónicos, incluyen, pero no se limitan a, BigCHAP, bis(polietilenglicol bis[imidazoilcarbonil]), Brij®35, Brij®56, Brij®72, Cremophor® EL, decaetilenglicol monododecil éter, N-decanoil-N-metilglucamina, n-decil α -D-maltósido, n-dodecil β -D-maltósido, heptaetilenglicol monododecil éter, hexaetilenglicol monododecil éter, octaetilenglicol monododecil éter, octaetilenglicol monohexadecil éter, octaetilenglicol monooctadecil éter, octaetilenglicol monotetradecil éter, pentaetilenglicol monododecil éter, pentaetilenglicol monododecil éter, pentaetilenglicol monohexadecil éter, pentaetilenglicol monohexil éter, pentaetilenglicol monooctadecil éter, polietilenglicol diglicidil éter, polietilenglicol éter W-1, polioxietileno 10 tridecil éter, estearato de

polioxietileno 100, polioxietileno 20 isohexadecil éter, saponina, Span®20, Span®40, Span®60, Span®65, Span®80, Span®85, Terigol, Triton CF-21, Triton CF-32, Triton DF-12, Triton DF-16, Triton GR-5M, Triton QS-15, Triton QS-44, Triton X-100, Triton X-102, Triton X-15, Triton®X-100, Triton® X-114, TWEEN®20, TWEEN®21, TWEEN®40, TWEEN®60, TWEEN®61, TWEEN®65, TWEEN®80, TWEEN®81, TWEEN®85 o combinaciones de los mismos,

Algunos detergentes anfóteros incluyen, pero no se limitan a, CHAPS, sal interna de propanosulfonato de 3-(decildimetilamonio), sal interna de propanosulfonato de (dodecildimetilamonio), propanosulfonato de 3-(N,N-dimetilmiristilamonio), propanosulfonato de 3-(N,N-dimetiloctadecilamonio), sal interna de propanosulfonato de 3-(N,N-dimetiloctilamonio), propanosulfonato de 3-(N,N-dimetilpalmitilamonio) o combinaciones de los mismos,

Algunos ejemplos de disolventes que pueden usarse son disolventes orgánicos. Algunos ejemplos de disolventes orgánicos que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, dimetilformamida, dimetilsulfóxido, polietilenglicol, etilenglicol, metanol, etanol o combinaciones de los mismos. Un disolvente preferido es metanol al 90% que puede ser reducido al 10% antes de la incubación con un reactivo de detección, tal como, pero no limitándose a, un anticuerpo.

Según se usa en este documento, el término "compañero de unión específico" significa un miembro de un par de unión específico. Los miembros de un par de unión específico comprenden al menos dos moléculas, cada una de las cuales tiene al menos una estructura complementaria de una estructura de la otra molécula, siendo capaces las al menos dos moléculas de unirse mediante una unión de las estructuras complementarias. El término molécula también incluye complejos moleculares tales como, por ejemplo, enzimas que consisten en apoenzima y coenzima, proteínas que consisten en una pluralidad de subunidades, lipoproteínas que consisten en proteínas y lípidos, etc. Los compañeros de unión específicos pueden ser sustancias que aparecen de forma natural o que han sido preparadas de otro modo, por ejemplo, mediante síntesis química, técnicas microbiológicas y/o procedimientos de manipulación genética. Algunos ejemplos de compañeros de unión específicos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos, antígenos, haptenos, enzimas, lectinas, ácidos nucleicos, represores, oligo y polinucleótidos, proteína A, proteína G, avidina, estreptavidina, biotina, componente del complemento Clq, proteínas de unión a ácidos nucleicos, etc. Algunos pares de unión específicos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpo-antígeno, anticuerpo-hapteno, operador-represor, nucleasa-nucleótido, biotina-avidina, lectina-polisacárido, esteroide-proteína de unión a esteroides, fármaco-receptor del fármaco, hormona-receptor de hormona, enzima-sustrato, IgG-proteína A, oligo o polinucleótidos complementarios, etc.

Según se usa en este documento, el término "condiciones rigurosas" se refiere a una hibridación para filtrar el ADN unido en 6 x cloruro sódico/citrato de sodio ("SSC") a aproximadamente 45°C seguido de uno o más lavados en 0,2 x SSC/0,1% de SDS a aproximadamente 50 - 65°C. El término "en unas condiciones muy rigurosas", se refiere a una hibridación para filtrar el ADN unido en 6 x SSC a aproximadamente 45°C seguido de uno o más lavados en 0,1 x SSC/0,2% de SDS a aproximadamente 68°C, o en otras condiciones de hibridación rigurosas que son conocidas por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Ausubel, F. M. y col., eds., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. I, Green Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., Nueva York en las páginas 6.3.1 - 6.3.6 y 2.10.3).

Según se usa en este documento, los términos "sujeto" y "paciente" se usan de forma intercambiable. Según se usa en este documento, los términos "sujeto" y "paciente" se refieren a un animal, en un aspecto, un ave (por ejemplo, un pato o un ganso), en otro aspecto, a un tiburón o una ballena, o, en un aspecto adicional, a un mamífero, incluyendo un no primate (por ejemplo, una vaca, un cerdo, un camello, una llama, un caballo, una cabra, un conejo, una oveja, hámsteres, un cobaya, un gato, un perro, una rata y un ratón) y a un primate (por ejemplo, un mono, tal como un mono, tal como un mono cinomólogo, un chimpancé y un ser humano).

Según se usa en este documento, el término "muestra de prueba" se refiere a un componente del cuerpo de un sujeto que es la fuente del analito (tal como los anticuerpos de interés o los antígenos de interés). Estos componentes son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, una muestra de prueba puede ser cualquier muestra biológica derivada de suero, plasma, sangre completa, linfoma, líquido cefalorraquídeo, orina u otros fluidos corporales de un sujeto. La muestra de prueba puede prepararse usando técnicas rutinarias conocidas por los expertos en la técnica.

II. Anticuerpos de la presente invención

La presente invención proporciona anticuerpos aislados que se unen inmuno-específicamente a al menos un epítipo del agente inmunosupresor tacrolimus. Más particularmente, la presente invención proporciona anticuerpos que tienen una elevada afinidad de unión por al menos un agente inmunosupresor. En un aspecto, los anticuerpos descritos en este documento se unen inmuno-específicamente a al menos un epítipo de al menos un agente inmunosupresor y pueden mostrar una mejora de al menos 1,1 veces, una mejora de al menos 2 veces, una mejora de al menos 3 veces, una mejora de al menos 4 veces, una mejora de al menos 5 veces, una mejora de al menos 6 veces, una mejora de al menos 7 veces, una mejora de al menos 8 veces, una mejora de al menos 9 veces, una

mejora de al menos 10 veces, una mejora de al menos 11 veces, una mejora de al menos 12 veces, una mejora de al menos 13 veces, una mejora de al menos 14 veces, una mejora de al menos 15 veces, una mejora de al menos 16 veces, una mejora de al menos 17 veces, una mejora de al menos 18 veces, una mejora de al menos 19 veces o una mejora de al menos 20 veces en su constante de disociación en equilibrio (K_D) o en su constante de velocidad de disociación (k_d o k_{off}) cuando se compara con la K_D o con la k_d de un anticuerpo producido por una línea celular de hibridoma de ratón 1-60-46 (disponible en Astellas Pharma, Inc., Tokio, Japón) (que también se denomina en este documento "natural"). El número de veces de mejora descrito anteriormente en la K_D o en la k_d puede mostrarse cuando dichos anticuerpos no han sido expuestos a (tal como en un inmunoensayo diagnóstico) o incubados con, al menos un diluyente de selección (tal como, pero no se limita a, al menos un disolvente). Adicionalmente, estos anticuerpos, como las inmunoglobulinas, se unen al agente inmunosupresor tacrolimus con una K_D de entre $1,89 \times 10^{-11}$ M y $1,0 \times 10^{-13}$ M. Más preferiblemente, estos anticuerpos muestran una K_D de entre $1,89 \times 10^{-11}$ M y $1,0 \times 10^{-12}$ M. Además, estos anticuerpos, como los scFvs, se unen a al menos un agente inmunosupresor con una k_d de menos de $1,3 \times 10^{-4}$ /s. Preferiblemente, estos anticuerpos se unen a al menos un agente inmunosupresor con una k_d de entre $1,29 \times 10^{-4}$ /s y $1,0 \times 10^{-6}$ /s. Más preferiblemente, estos anticuerpos muestran una k_d de entre $1,29 \times 10^{-4}$ /s y $1,0 \times 10^{-5}$ /s.

Cuando los anticuerpos descritos anteriormente se exponen a (tal como antes o durante un inmunoensayo diagnóstico; el tiempo de exposición del anticuerpo a al menos un diluyente de selección no es crítico), se incuban con, o están en presencia de, al menos un diluyente de selección (tal, pero no se limita a, al menos un diluyente de selección), entonces estos anticuerpos pueden mostrar una mejora de al menos 1,1 veces, una mejora de al menos 2 veces, una mejora de al menos 3 veces, una mejora de al menos 4 veces, una mejora de al menos 5 veces, una mejora de al menos 6 veces, una mejora de al menos 7 veces, una mejora de al menos 8 veces, una mejora de al menos 9 veces, una mejora de al menos 10 veces, una mejora de al menos 11 veces, una mejora de al menos 12 veces, una mejora de al menos 13 veces, una mejora de al menos 14 veces, una mejora de al menos 15 veces, una mejora de al menos 16 veces, una mejora de al menos 17 veces, una mejora de al menos 18 veces, una mejora de al menos 19 veces o una mejora de al menos 20 veces en su K_D o k_d cuando se comparan con la K_D o con la k_d de tipo natural después de la exposición a o la incubación del tipo natural con al menos un diluyente de selección. Adicionalmente, estos anticuerpos, como las inmunoglobulinas, se unen a al menos un agente inmunosupresor con una K_D de entre $1,51 \times 10^{-10}$ M y $1,0 \times 10^{-12}$ M. Más preferiblemente, estos anticuerpos tienen una K_D de entre $1,51 \times 10^{-10}$ M y $1,0 \times 10^{-11}$ M. Adicionalmente, estos anticuerpos, como los scFvs, se unen a al menos un agente inmunosupresor con una k_d de menos de $9,38 \times 10^{-4}$ /s. Preferiblemente, estos anticuerpos se unen a al menos un agente inmunosupresor con una k_d de entre $9,37 \times 10^{-4}$ /s y $1,0 \times 10^{-6}$ /s. Más preferiblemente, estos anticuerpos muestran una k_d de entre $9,37 \times 10^{-4}$ /s y $1,0 \times 10^{-5}$ /s.

En otro aspecto más, la presente invención proporciona anticuerpos producidos por la línea celular de ovario de hámster chino (en lo sucesivo "CHO") 1-60-46 AM2 CHO 2-577 o la línea celular CHO 1-60-46 AM2 CHO 1-1157. Los anticuerpos producidos por cada una de estas líneas celulares se unen inmuno-específicamente a al menos un epítipo de tacrolimus. Más específicamente, los anticuerpos producidos por cada una de estas líneas celulares se unen a al menos un epítipo del tacrolimus con una K_D de menos de $1,9 \times 10^{-11}$ M, cuando dichos anticuerpos no han sido expuestos a (tal como antes de o durante un inmunoensayo diagnóstico de prior), incubado con, o están en presencia de, al menos un diluyente de selección (tal como, pero no se limita a, al menos un disolvente). Preferiblemente, estos anticuerpos muestran una K_D de $1,2 \times 10^{-12}$ M. Sin embargo, si dichos anticuerpos se exponen a (tal como antes de o durante un inmunoensayo diagnóstico) o se incuban con, al menos un diluyente de selección, entonces dichos anticuerpos se unen inmuno-específicamente a al menos un epítipo del tacrolimus con una K_D de menos de $1,52 \times 10^{-10}$ M. Preferiblemente, estos anticuerpos muestran una K_D de $1,3 \times 10^{-11}$ M en metanol al 10% metanol. Adicionalmente, la presente invención también contempla los anticuerpos elaborados a partir de ácidos nucleicos (ADN) extraídos de la línea celular CHO 1-60-46 AM2 CHO 2-577 o de la línea celular CHO 1-60-46 AM2 CHO 1-1157. Adicionalmente, la presente invención también se refiere a un anticuerpo quimérico o un fragmento de unión del mismo producido por la línea celular CHO 1-60-46 AM2 CHO 2-577 o por la línea celular CHO 1-60-46 AM2 CHO 1-1157.

En otro aspecto, los anticuerpos de la presente invención son derivados o variantes de los anticuerpos producidos por la línea celular de hibridoma 1-60-46. Más específicamente, los inventores de la presente invención han descubierto que los anticuerpos que son derivados o variantes de los anticuerpos producidos por la línea celular de hibridoma 1-60-46 pueden ser producidos para que muestren una elevada afinidad de unión con al menos un epítipo de al menos un agente inmunosupresor, independientemente de si dichos anticuerpos están o no expuestos a, o incubados con, al menos un diluyente de selección. Más específicamente, los anticuerpos de la presente invención, como las inmunoglobulinas, se unen a al menos un epítipo en al menos un agente inmunosupresor con una K_D de menos de $1,9 \times 10^{-11}$ M, preferiblemente con una K_D que varía entre $1,89 \times 10^{-11}$ M y $1,0 \times 10^{-13}$ M, y más preferiblemente, con una K_D que varía entre $1,89 \times 10^{-11}$ M y $1,0 \times 10^{-12}$ M, cuando dichos anticuerpos no son expuestos a, incubados con, o están en presencia de, al menos un diluyente de selección. Como los scFvs, los anticuerpos de la presente invención se unen a al menos un epítipo de al menos un agente inmunosupresor con una k_d de menos de $1,3 \times 10^{-4}$ /s, preferiblemente con una k_d que varía entre $1,29 \times 10^{-4}$ /s y $1,0 \times 10^{-6}$ /s, y más preferiblemente, una k_d que varía entre $1,29 \times 10^{-4}$ /s y $1,0 \times 10^{-5}$ /s.

Por el contrario, cuando estos anticuerpos se exponen a, se incuban con, o están en presencia de, al menos un

diluyente de selección, estos anticuerpos, como las inmunoglobulinas, se unen a al menos un epítipo de al menos un agente inmunosupresor con una K_D de menos de $1,52 \times 10^{-10}$ M, preferiblemente con una K_D que varía entre $1,51 \times 10^{-10}$ M y $1,0 \times 10^{-12}$ M, y más preferiblemente con una K_D que varía entre $1,51 \times 10^{-10}$ M y $1,0 \times 10^{-11}$ M. Como los scFvs, estos anticuerpos de la presente invención se unen a al menos un epítipo de al menos un agente inmunosupresor con una k_d de menos de $9,38 \times 10^4$ /s, preferiblemente con una k_d que varía entre $9,37 \times 10^4$ /s y $1,0 \times 10^6$ /s, y más preferiblemente con una k_d que varía entre $9,37 \times 10^4$ /s y $1,0 \times 10^5$ /s. Los anticuerpos derivados o las variantes de la presente invención pueden comprender al menos una mutación (tal como al menos una delección, una adición, una sustitución o cualquier combinación de las mismas) en al menos una de las regiones determinantes de complementariedad de la cadena pesada ("CDR") (por ejemplo, la CDR 1 de la cadena pesada, la CDR 2 de la cadena pesada y/o la CDR 3 de la cadena pesada), al menos una mutación (tal como al menos una delección, una adición, una sustitución o cualquier combinación de las mismas) en al menos una de las regiones CDR de la cadena ligera (por ejemplo, por ejemplo, la CDR 1 de la cadena ligera, la CDR 2 de la cadena ligera y/o la CDR 3 de la cadena ligera) o al menos una mutación (tal como al menos una delección, una adición, una sustitución o cualquier combinación de las mismas) en al menos una de las regiones CDR de la cadena pesada y al menos una mutación en al menos una de las regiones CDR de la cadena ligera, cuando se comparan con la secuencia de aminoácidos del anticuerpo producido por el tipo natural. Además, los anticuerpos de la presente invención también pueden contener una o más de otras mutaciones (tal como al menos una delección, una adición, una sustitución o cualquier combinación de las mismas) en una parte o porción del anticuerpo distinta a la CDR, tal como, pero no se limita a, la región en marco ("FR") de un anticuerpo. Los procedimientos para crear dichos derivados son bien conocidos en la técnica e incluyen el uso de mutagénesis dirigida y mutagénesis mediada por PCR, que se analizarán con más detalle a continuación.

El anticuerpo de la presente invención se une específicamente a al menos un epítipo de al menos un agente inmunosupresor y tiene una CDR 1 de una cadena pesada, una CDR 2 de una cadena pesada, una CDR 3 de una cadena pesada, una CDR 1 de una cadena ligera, una CDR 2 de una cadena ligera y una CDR 3 variable ligera que comprende las siguientes secuencias de aminoácidos:

(a) la CDR 1 de la cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos de: Gly - Phe - Thr - Phe - Ser - Ser - Tyr - Gly - Met - Ser (SEC ID N°: 2);

(b) la CDR 2 de la cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos con una fórmula de:

Thr - Ile - Ser - Ser - Gly - Gly Xaa₁ - Xaa₂ - Xaa₃ - Phe (SEC ID N°: 33)

donde Xaa₁ se elige de entre el grupo que consiste en treonina (Thr), alanina (Ala), lisina (Lys) y ácido glutámico (Glu);

donde Xaa₂ se elige de entre el grupo que consiste en tirosina (Tyr) y triptófano (Trp); y

donde Xaa₃ se elige de entre el grupo que consiste en treonina (Thr) y valina (Val);

(c) la CDR 3 de la cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos de: Gln - Thr - Asp - Gly - Tyr - Ser - Trp - Phe - Pro - Tyr (SEC ID N°: 6);

(d) la CDR 1 de la cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos con una fórmula de:

Lys - Ser - Ser - Xaa₄ - Xaa₅ - Xaa₆ - Val - His - Ser - Thr - Gly - Asn - Thr - Phe - Leu - Glu (SEC ID N°: 34)

donde Xaa₄ se elige de entre el grupo que consiste en: glutamina (Gln), alanina (Ala) y glicina (Gly);

donde Xaa₅ se elige de entre el grupo que consiste en: serine (Ser) y glicina (Gly); y

donde Xaa₆ se elige de entre el grupo que consiste en: isoleucina (Ile) y leucina (Leu);

(e) la CDR 2 de la cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos con una fórmula de:

Lys - Ile - Ser - Asn - Arg - Phe - Ser (SEC ID N°: 11)

(f) la CDR 3 de la cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos con una fórmula de:

Phe - Gln - Gly - Xaa₇ - Xaa₈ - Xaa₉ - Pro - Leu - Thr (SEC ID N°: 35),

donde Xaa₇ se elige de entre el grupo que consiste en: Serina (Ser) y Glicina (Gly);

donde Xaa₈ se elige de entre el grupo que consiste en: histidina (His), arginina (Arg), valina (Val), treonina (Thr),

lisina (Lys) y serine (Ser); y

donde Xaa₉ se elige de entre el grupo que consiste en: valina (Val), alanina (Ala), ácido aspártico (Asp), cisteína (Cys) y Serina (Ser);

con la condición de que si en la CDR 2 de la cadena pesada Xaa₁ es Thr, Xaa₂ es Tyr y Xaa₃ es Thr y en la CDR 1 de la cadena ligera Xaa₄ es Gln, Xaa₅ es Ser y Xaa₆ es Ile, entonces en la CDR 3 de la cadena ligera Xaa₉ es distinto a Val si Xaa₇ es Ser y Xaa₈ es His, o Xaa₈ es distinto a His si Xaa₇ es Ser y Xaa₉ es Val o Xaa₇ es distinto a Ser si Xaa₈ es His y Xaa₉ es Val; donde el anticuerpo tiene una K_D de entre $1,89 \times 10^{-11}$ M y $1,0 \times 10^{-13}$ M cuando el anticuerpo no ha sido expuesto a, o incubado con, al menos un diluyente de selección, y una K_D de entre $1,51 \times 10^{-10}$

M y $1,0 \times 10^{-12}$ M cuando el anticuerpo se expone a, se incuba con, o está en presencia de, al menos un diluyente de selección.

- 5 Preferiblemente, los anticuerpos con las fórmulas descritas anteriormente comprenden una CDR 1 de una cadena pesada, una CDR 2 de una cadena pesada, una CDR 3 de una cadena pesada, una CDR 1 de una cadena ligera, una CDR 2 de una cadena ligera y una CDR 3 de una cadena ligera donde los Xaa₁ - Xaa₈ en las fórmulas descritas anteriormente tienen los residuos de aminoácidos mostrados a continuación en la Tabla A:

Tabla A

Xaa ₁	Xaa ₂	Xaa ₃	Xaa ₄	Xaa ₅	Xaa ₆	Xaa ₇	Xaa ₈	Xaa ₉
Thr	Trp	Thr	Gln	Ser	Ile	Ser	His	Val
Ala	Trp	Thr	Gln	Ser	Ile	Ser	His	Val
Lys	Trp	Val	Gln	Ser	Ile	Ser	His	Val
Glu	Trp	Thr	Gln	Ser	Ile	Ser	His	Val
Thr	Tyr	Thr	Gln	Gly	Ile	Ser	His	Val
Thr	Tyr	Thr	Ala	Gly	Ile	Ser	His	Val
Thr	Tyr	Thr	Gly	Gly	Leu	Ser	His	Val
Thr	Tyr	Thr	Gln	Gly	Leu	Ser	His	Val
Thr	Tyr	Thr	Gln	Ser	Ile	Ser	His	Ala
Thr	Tyr	Thr	Gln	Ser	Ile	Ser	Arg	Ala
Thr	Tyr	Thr	Gln	Ser	Ile	Ser	His	Asp
Thr	Tyr	Thr	Gln	Ser	Ile	Ser	His	Cys
Thr	Tyr	Thr	Gln	Ser	Ile	Ser	His	Ser
Thr	Tyr	Thr	Gln	Ser	Ile	Gly	Arg	Cys
Thr	Tyr	Thr	Gln	Ser	Ile	Gly	Val	Cys
Thr	Tyr	Thr	Gln	Ser	Ile	Ser	Thr	Cys
Thr	Tyr	Thr	Gln	Ser	Ile	Ser	Lys	Cys
Thr	Tyr	Thr	Gln	Ser	Ile	Ser	Ser	Ser
Ala	Trp	Thr	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Ser
Ala	Trp	Thr	Gln	Gly	Leu	Ser	His	Ala
Ala	Trp	Thr	Gln	Ser	Ile	Gly	Arg	Cys
Ala	Trp	The	Gln	Ser	Ile	Ser	Ser	Ser
Ala	Trp	Thr	Gln	Gly	Leu	Gly	Arg	Cys
Thr	Tyr	Thr	Gln	Gly	Leu	Gly	Arg	Cys
Thr	Thr	Thr	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Ser
Lys	Trp	Val	Gln	Gly	Leu	Ser	His	Ser
Glu	Trp	Thr	Gln	Gly	Leu	Ser	His	Ser
Glu	Trp	Thr	Gln	Ser	Ile	Gly	Val	Lys
Glu	Trp	Thr	Gly	Gly	Leu	Ser	His	Ser
Ala	Trp	Thr	Gln	Gly	Leu	Ser	His	Ser

III. Moléculas de ácidos nucleicos

La presente invención proporciona una o más moléculas de ácidos nucleicos, generalmente aisladas, que codifican para un anticuerpo de la presente invención que se une específicamente a al menos un epítipo de al menos el agente inmunosupresor tacrolimus. En un aspecto, la invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica para un anticuerpo que se une a al menos un epítipo de al menos un agente inmunosupresor y que puede mostrar al menos una mejora de 1,1 veces, al menos una mejora de 2 veces, al menos una mejora de 3 veces, al menos una mejora de 4 veces, al menos una mejora de 5 veces, al menos una mejora de 6 veces, al menos una mejora de 7 veces, al menos una mejora de 8 veces, al menos una mejora de 9 veces, al menos una mejora de 10 veces, al menos una mejora de 11 veces, al menos una mejora de 12 veces, al menos una mejora de 13 veces, al menos una mejora de 14 veces, al menos una mejora de 15 veces, al menos una mejora de 16 veces, al menos una mejora de 17 veces, al menos una mejora de 18 veces, al menos una mejora de 19 veces o al menos una mejora de 20 veces en su K_D o en su k_d cuando se compara con un anticuerpo producido por el tipo natural. La presente invención también proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de polinucleótidos que hibrida, en condiciones rigurosas, con la molécula de ácido nucleico descrita en este documento. Los números de veces de mejora descritos anteriormente en la K_D o en la k_d pueden mostrarse cuando dichos anticuerpos no han sido expuestos a (tal como antes de o durante un inmunoensayo diagnóstico) o incubados con al menos un diluyente de selección (tal como, pero no se limita a, al menos un disolvente).

En otro aspecto, la invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislado que codifica para un anticuerpo que se une a al menos un epítipo de al menos un agente inmunosupresor con al menos un agente inmunosupresor, y que puede mostrar al menos una mejora de 1,1 veces, al menos una mejora de 2 veces, al menos una mejora de 3 veces, al menos una mejora de 4 veces, al menos una mejora de 5 veces, al menos una mejora de 6 veces, al menos una mejora de 7 veces, al menos una mejora de 8fold, al menos una mejora de 9 veces, al menos una mejora de 10 veces, al menos una mejora de 11 veces, al menos una mejora de 12 veces, al menos una mejora de 13 veces, al menos una mejora de 14 veces, al menos una mejora de 15 veces, al menos una mejora de 16 veces, al menos una mejora de 17 veces, al menos una mejora de 18 veces, al menos una mejora de 19 veces o al menos una mejora de 20 veces en su K_D o en su k_d cuando se compara con un anticuerpo producido por el "tipo natural". La presente invención también proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de polinucleótidos que hibrida, en condiciones rigurosas, con la molécula de ácido nucleico descrita en este documento. Los números de veces de mejora en la constante de disociación en equilibrio pueden mostrarse cuando dichos anticuerpos han sido o son expuestos a (tal como antes de o durante un inmunoensayo diagnóstico) o incubados con, al menos un diluyente de selección (tal como, pero no se limita a, al menos un disolvente).

Todavía en otro aspecto más, la invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica para un anticuerpo que, como una inmunoglobulina, se une específicamente a al menos un epítipo de al menos un agente inmunosupresor, y que tiene una K_D de menos de $1,9 \times 10^{-11}$ M, preferiblemente, una K_D de entre $1,89 \times 10^{-11}$ M y $1,0 \times 10^{-13}$ M y más preferiblemente, una K_D de entre $1,89 \times 10^{-11}$ M y $1,0 \times 10^{-12}$ M. La presente invención también proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica para un anticuerpo que, como un scFv, se une específicamente a al menos un epítipo de al menos un agente inmunosupresor, y que tiene una k_d de menos de $1,3 \times 10^{-4}$ /s, preferiblemente con una k_d que varía entre $1,29 \times 10^{-4}$ /s y $1,0 \times 10^{-6}$ /s, y más preferiblemente, con una k_d que varía entre $1,29 \times 10^{-4}$ /s y $1,0 \times 10^{-5}$ /s. La presente invención también proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de polinucleótidos que hibrida, en condiciones rigurosas, con las moléculas de ácidos nucleicos descritas en este documento. Los anteriores valores de K_D o de k_d se muestran cuando dichos anticuerpos no han sido expuestos a (tal como en un inmunoensayo diagnóstico), incubados con, o están en presencia de, al menos un diluyente de selección (tal como, pero no se limita a, al menos un disolvente).

Todavía en otro aspecto más, la invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica para un anticuerpo que, como una inmunoglobulina, se une específicamente a al menos un epítipo de al menos un agente inmunosupresor, y que tiene una K_D de menos de $1,52 \times 10^{-10}$ M, preferiblemente, una K_D entre $1,51 \times 10^{-10}$ M y $1,0 \times 10^{-12}$ M, y más preferiblemente, una K_D entre $1,51 \times 10^{-10}$ M y $1,0 \times 10^{-11}$ M. La presente invención también proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica para un anticuerpo que, como un scFv, se une específicamente a al menos un epítipo de al menos un agente inmunosupresor, y que tiene una k_d de menos de $9,38 \times 10^{-4}$ /s, preferiblemente con una k_d que varía entre $9,37 \times 10^{-4}$ /s y $1,0 \times 10^{-6}$ /s, y más preferiblemente con una k_d que varía entre $9,37 \times 10^{-4}$ /s y $1,0 \times 10^{-5}$ /s. La presente invención también proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de polinucleótidos que hibrida, en condiciones rigurosas, con las moléculas de ácidos nucleicos descritas en este documento. Los anteriores valores de K_D o k_d se muestran cuando dichos anticuerpos han sido o son expuestos a (tal como en un inmunoensayo diagnóstico), incubados con, o están en presencia de, al menos un diluyente de selección (tal como, pero no se limita a, al menos un disolvente).

En otro aspecto más, la invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica para un anticuerpo que se une específicamente a al menos un epítipo de al menos un agente inmunosupresor, donde dicha molécula de ácido nucleico comprende la secuencia de polinucleótidos del anticuerpo producida por la célula CHO 1-60-46 AM2 CHO 2-577 o por la línea celular CHO 1-60-46 AM2 CHO 1-1157. La presente invención también proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de polinucleótidos que hibrida,

en condiciones rigurosas, con la molécula de ácido nucleico descrita en este documento.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica para un anticuerpo que se une específicamente a al menos un epítipo de al menos un agente inmunosupresor, donde dichos anticuerpos comprenden derivados o variantes de los anticuerpos producidos por la línea celular de hibridoma de ratón 1-60-46. Según se analizó previamente en este documento, los inventores de la presente invención han descubierto que los anticuerpos que son derivados o variantes de los anticuerpos producidos por la línea celular de hibridoma de ratón 1-60-46 pueden ser producidos para que muestren una elevada afinidad de unión, específicamente, como las inmunoglobulinas, con una K_D que varía entre $1,89 \times 10^{-11}$ M y $1,0 \times 10^{-13}$ M, y más preferiblemente, una K_D que varía entre $1,89 \times 10^{-11}$ M y $1,0 \times 10^{-12}$ M, o como los scFvs, con una k_d de menos de $1,3 \times 10^{-4}$ /s, preferiblemente con una k_d que varía entre $1,29 \times 10^{-4}$ /s y $1,0 \times 10^{-6}$ /s, y más preferiblemente, con una k_d que varía entre $1,29 \times 10^{-4}$ /s y $1,0 \times 10^{-5}$ /s, cuando dichos anticuerpos no son expuestos a, incubados con, o están en presencia de, al menos un diluyente de selección. Por el contrario, cuando estos anticuerpos son expuestos a, incubados con, o están en presencia de al menos un diluyente de selección, estos anticuerpos se unen a al menos un epítipo de al menos un agente inmunosupresor, como las inmunoglobulinas, con una K_D que varía entre $1,51 \times 10^{-10}$ M y $1,0 \times 10^{-12}$ M, y, más preferiblemente, una K_D que varía entre $1,51 \times 10^{-10}$ M y $1,0 \times 10^{-11}$ M o como los scFvs, con una k_d de menos de $9,38 \times 10^{-4}$ /s, preferiblemente con una k_d que varía entre $9,37 \times 10^{-4}$ /s y $1,0 \times 10^{-6}$ /s, y más preferiblemente con una k_d que varía entre $9,37 \times 10^{-4}$ /s y $1,0 \times 10^{-5}$ /s.

Los anticuerpos derivados o variantes de la presente invención comprenden al menos una mutación (tal como al menos una delección, una adición, una sustitución o cualquier combinación de las mismas) en al menos una de las regiones CDR de la cadena pesada (por ejemplo, la CDR 1 de la cadena pesada, la CDR 2 de la cadena pesada o la CDR 3 de la cadena pesada), al menos una mutación (tal como al menos una delección, una adición, una sustitución o cualquier combinación de las mismas) las regiones CDR de la cadena ligera (por ejemplo, la CDR 1 de la cadena ligera, la CDR 2 de la cadena ligera o la CDR 3 de la cadena ligera) o al menos una mutación en al menos una de las regiones CDR de la cadena pesada y al menos una mutación en al menos una de las regiones CDR de la cadena ligera cuando se compara con la secuencia de aminoácidos del anticuerpo producido por el tipo natural. Pueden usarse técnicas estándar conocidas por el experto en la técnica para introducir las mutaciones (tal como al menos una delección, una adición, una sustitución o cualquier combinación de las mismas) en la molécula de ácido nucleico que codifica para un anticuerpo de la presente invención, incluyendo, por ejemplo, mutagénesis dirigida y mutagénesis mediada por PCR, que dan como resultado sustituciones de aminoácidos. En un aspecto, los derivados incluyen menos de 15 sustituciones de aminoácidos o menos de 10 sustituciones de aminoácidos o menos de 7 sustituciones de aminoácidos con respecto al anticuerpo original producido por el tipo natural. En un aspecto, los derivados que tienen sustituciones conservativas de aminoácidos se elaboran en uno o más residuos de aminoácidos de dichos no esenciales (es decir, residuos de aminoácidos que no son críticos para que el anticuerpo se una inmunoespecíficamente a al menos un epítipo de al menos un agente inmunosupresor). Una "sustitución de aminoácidos conservativa" es aquella en la que el residuo de aminoácido es sustituido por un residuo de aminoácido con una cadena lateral con una carga similar. Las familias de residuos de aminoácidos con cadenas laterales con carga similares han sido definidas en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, glicina, asparragina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales ramificadas en beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Alternativamente, las mutaciones pueden introducirse aleatoriamente a lo largo de toda o parte de la secuencia codificante, tal como mediante una mutagénesis de saturación, y los mutantes resultantes pueden ser cribados según su actividad biológica para identificar mutantes que muestren una afinidad de unión aumentada por al menos un epítipo de al menos un agente inmunosupresor. Después de la mutagénesis, el anticuerpo codificado puede ser expresado, y puede determinarse la actividad del anticuerpo.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica para un anticuerpo que se une específicamente a al menos un epítipo de al menos un agente inmunosupresor, teniendo dicho anticuerpo una CDR 2 de una cadena pesada con una secuencia de aminoácidos de la fórmula de:

una CDR 2 de una cadena pesada con una secuencia de aminoácidos de la fórmula de:

Thr - Ile - Ser - Ser - Gly - Gly - Xaa₁ - Xaa₂ - Xaa₃ - Phe (SEC ID N°: 33)

donde Xaa₁ se elige de entre el grupo que consiste en treonina (Thr), alanina (Ala), lisina (Lys) y ácido glutámico (Glu);

donde Xaa₂ se elige de entre el grupo que consiste en tirosina (Tyr) y triptófano (Trp); y

donde Xaa₃ se elige de entre el grupo que consiste en treonina (Thr) y valina (Val);

siempre que Xaa₁ sea distinto a treonina (Thr) cuando Xaa₂ es tirosina (Tyr) y Xaa₃ es treonina (Thr).

La presente invención también proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia

de polinucleótidos que hibrida, en condiciones rigurosas, con la molécula de ácido nucleico descrita en este documento que codifica para un anticuerpo con una CDR 2 de una cadena pesada con una secuencia de aminoácidos descrita anteriormente.

En otro aspecto, la invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica para un anticuerpo que se une específicamente a al menos un epítipo de al menos un agente inmunosupresor, comprendiendo dicho anticuerpo (como alternativa, que consiste en) una CDR 2 de una cadena pesada con una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 15, 16, 17 ó 18. La presente invención también proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de polinucleótidos que hibrida, en condiciones rigurosas, con la molécula de ácido nucleico descrita en este documento que codifica para un anticuerpo que comprende una CDR 2 de una cadena pesada con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 15, 16, 17 ó 18.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica para un anticuerpo que se une específicamente a al menos un epítipo de al menos un agente inmunosupresor, teniendo dicho anticuerpo una CDR 1 de una cadena ligera con una secuencia de aminoácidos de la fórmula de:

Lys-Ser-Ser-Xaa₄-Xaa₅-Xaa₆-Val-His-Ser-Thr-Gly-Asn-Thr-Phe-Leu-Glu (SEC ID N°: 34)

donde Xaa₄ se elige de entre el grupo que consiste en: glutamina (Gln), alanina (Ala) y glicina (Gly);

donde Xaa₅ se elige de entre el grupo que consiste en: serina (Ser) y glicina (Gly); y

donde Xaa₆ se elige de entre el grupo que consiste en: isoleucina (Ile) y leucina (Leu);

siempre que Xaa₄ es distinto a glutamina (Gln) cuando Xaa₅ es serina (Ser) y Xaa₆ es isoleucina (Ile).

La presente invención también proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de polinucleótidos que hibrida, en condiciones rigurosas, con la molécula de ácido nucleico descrita en este documento que codifica para un anticuerpo con una CDR1 de una cadena ligera con una secuencia de aminoácidos descrita anteriormente.

En otro aspecto, la invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica para un anticuerpo que se une específicamente a al menos un epítipo de al menos un agente inmunosupresor, comprendiendo dicho anticuerpo (como alternativa, que consiste en) una CDR 1 de una cadena ligera con una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 19, 20, 21 ó 22. La presente invención también proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de polinucleótidos que hibrida, en condiciones rigurosas, con la molécula de ácido nucleico descrita en este documento que codifica para un anticuerpo con una CDR 1 de una cadena ligera con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 19, 20, 21 ó 22.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica para un anticuerpo que se une específicamente a al menos un epítipo de al menos un agente inmunosupresor, teniendo dicho anticuerpo una CDR 3 de una cadena ligera con una secuencia de aminoácidos de la fórmula de:

Phe Gln Gly Xaa₇ Xaa₈ Xaa₉ Pro Leu Thr (SEC ID N°: 35),

donde Xaa₇ se elige de entre el grupo que consiste en: serina (Ser) y glicina (Gly);

donde Xaa₈ se elige de entre el grupo que consiste en: histidina (His), arginina (Arg), valina (Val), treonina (Thr), lisina (Lys) y serina (Ser); y

donde Xaa₉ se elige de entre el grupo que consiste en: valina (Val), alanina (Ala), ácido aspártico (Asp), cisteína (Cys) y serina (Ser);

siempre que Xaa₇ es distinto a serina (Ser) cuando Xaa₈ es histidina (His) y Xaa₉ es valina (Val).

La presente invención también proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de polinucleótidos que hibrida, en condiciones rigurosas, con la molécula de ácido nucleico descrita en este documento que codifica para un anticuerpo con una CDR 3 de una cadena ligera con una secuencia de aminoácidos descrita anteriormente.

En otro aspecto, la invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica para un anticuerpo que se une específicamente a al menos un epítipo de al menos un agente inmunosupresor, comprendiendo dicho anticuerpo (como alternativa, que consiste en) una CDR 3 de una cadena ligera con una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 ó 32. La presente invención también proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de polinucleótidos que hibrida, en condiciones rigurosas, con la molécula de ácido nucleico descrita en este documento que codifica para un anticuerpo con una CDR 3 de una cadena ligera con una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 ó 32.

En otro aspecto, la invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica para un anticuerpo que se une específicamente a al menos un epítipo de al menos un agente inmunosupresor, comprendiendo dicho anticuerpo (como alternativa, que consiste en) una CDR 2 de una cadena pesada con una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 15, 16, 17 ó 18, una CDR 1 de una cadena ligera con una secuencia de aminoácidos

de la SEC ID Nº: 19, 20, 21 ó 22, una CDR 3 de una cadena ligera con una secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº: 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 ó 32, o cualquier combinación de estas secuencias de aminoácidos. La presente invención también proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de polinucleótidos que hibrida, en condiciones rigurosas, con la molécula de ácido nucleico descrita en este documento

que codifica para un anticuerpo con una CDR 2 de una cadena pesada con una secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº: 15, 16, 17 ó 18, una CDR 1 de una cadena ligera con una secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº: 19, 20, 21 ó 22, una CDR 3 de una cadena ligera con una secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº: 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 ó 32, o cualquier combinación de estas secuencias de aminoácidos.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica para un anticuerpo que se une específicamente a al menos un epítipo de al menos un agente inmunosupresor, teniendo dicho anticuerpo una CDR 1 de una cadena pesada, una CDR 2 de una cadena pesada, una CDR 3 de una cadena pesada, una CDR 1 de una cadena ligera, una CDR 2 de una cadena ligera y una CDR 3 ligera variable que comprende las siguientes secuencias de aminoácidos:

(a) la CDR 1 de la cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos de: Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met Ser (SEC ID Nº: 2);

(b) la CDR 2 de la cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos con una fórmula de:

Thr - Ile - Ser - Ser - Gly - Gly - Xaa₁ - Xaa₂ - Xaa₃ - Phe (SEC ID Nº: 33)

donde Xaa₁ se elige de entre el grupo que consiste en treonina (Thr), alanina (Ala), lisina (Lys) y ácido glutámico (Glu);

donde Xaa₂ se elige de entre el grupo que consiste en tirosina (Tyr) y triptófano (Trp); y

donde Xaa₃ se elige de entre el grupo que consiste en treonina (Thr) y valina (Val);

(c) la CDR 3 de la cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos de: Gln - Thr - Asp - Gly - Tyr - Ser - Trp - Phe - Pro - Tyr (SEC ID Nº: 6);

(d) la CDR 1 de la cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos con una fórmula de:

Lys - Ser - Ser - Xaa₄ - Xaa₅ - Xaa₆ - Val - His - Ser - Thr - Gly - Asn - Thr - Phe - Leu - Glu (SEC ID Nº: 34)

donde Xaa₄ se elige de entre el grupo que consiste en glutamina (Gln), alanina (Ala) y glicina (Gly);

donde Xaa₅ se elige de entre el grupo que consiste en: serina (Ser) y glicina (Gly); y

donde Xaa₆ se elige de entre el grupo que consiste en: isoleucina (Ile) y leucina (Leu);

(e) la CDR 2 de la cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos con una fórmula de:

Lys - Ile - Ser - Asn - Arg - Phe - Ser (SEC ID Nº: 11)

(f) la CDR3 de la cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos con una fórmula de:

Phe - Gln - Gly - Xaa₇ - Xaa₈ - Xaa₉ - Pro - Leu - Thr (SEC ID Nº: 35),

donde Xaa₇ se elige de entre el grupo que consiste en: Serina (Ser) y Glicina (Gly);

donde Xaa₈ se elige de entre el grupo que consiste en: histidina (His), arginina (Arg), valina (Val), treonina (Thr), lisina (Lys) y serina (Ser); y

donde Xaa₉ se elige de entre el grupo que consiste en: valina (Val), alanina (Ala), ácido aspártico (Asp), cisteína (Cys) y Serina (Ser);

con la condición de que si en la CDR 2 de la cadena pesada Xaa₁ es Thr, Xaa₂ es Tyr y Xaa₃ es Thr y en la CDR 1 de la cadena ligera Xaa₄ es Gln, Xaa₅ es Ser y Xaa₆ es Ile, entonces en la CDR 3 de la cadena pesada Xaa₉ es distinto a Val si Xaa₇ es Ser y Xaa₈ es His, o Xaa₈ es distinto a His si Xaa₇ es Ser y Xaa₉ es Val o Xaa₇ es distinto a Ser si Xaa₈ es His y Xaa₉ es Val.

La presente invención también proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de polinucleótidos que hibrida, en condiciones rigurosas, con la molécula de ácido nucleico descrita en este documento que codifica para un anticuerpo con una región CDR 1 de una cadena pesada, una región CDR 2 de una cadena pesada, una región CDR 3 de una cadena pesada, una región CDR 1 de una cadena ligera, una región CDR 2 de una cadena ligera y una región CDR 3 de una cadena ligera con las secuencias de aminoácidos descritas anteriormente.

Adicionalmente, la presente invención también proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica para un anticuerpo que se une específicamente a al menos un epítipo de al menos un agente inmunosupresor donde dichos anticuerpos comprenden una CDR 1 de una cadena pesada, una CDR 2 de una cadena pesada, una CDR 3 de una cadena pesada, una CDR 1 de una cadena ligera, una CDR 2 de una cadena ligera y una CDR 3 de una cadena ligera con las secuencias descritas anteriormente, y donde Xaa₁ - Xaa₈ tienen los residuos de aminoácidos

mostrados en la Tabla A, que se describió previamente en este documento. La presente invención también proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de polinucleótidos que hibrida, en condiciones rigurosas, con la molécula de ácido nucleico descrita en este documento que codifica para un anticuerpo con una región CDR 1 de una cadena pesada, una región CDR 2 de una cadena pesada, una región CDR 3 de una cadena pesada, una región CDR 1 de una cadena ligera, una región CDR 2 de una cadena ligera y una región CDR 3 de una cadena ligera con las secuencias de aminoácidos descritas anteriormente, y donde Xaa₁ - Xaa₈ tienen los residuos de aminoácidos mostrados en la Tabla A.

Todavía en otro aspecto más, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica para un anticuerpo que se une específicamente a al menos un epítipo de al menos un agente inmunosupresor, donde dicho anticuerpo es producido por la línea celular CHO 1-60-46 AM2 CHO 2-577 o por la línea celular CHO 1-60-46 AM2 CHO 1-1157. La presente invención también proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de polinucleótidos que hibrida, en condiciones rigurosas, con la molécula de ácido nucleico que codifica para un anticuerpo que se une específicamente a al menos un epítipo de al menos un agente inmunosupresor, dicho anticuerpo es producido por la línea celular CHO 1-60-46 M2 CHO 2-577 o por la línea celular CHO 1-60-46 AM2 CHO 1-1157.

IV. Procedimientos para la preparación de los anticuerpos de la presente invención

Los anticuerpos de la presente invención pueden prepararse usando técnicas rutinarias conocidas por los expertos en la técnica.

En un aspecto, los anticuerpos de la presente invención pueden prepararse mediante la expresión recombinante de los genes de la cadena ligera y pesada de una inmunoglobulina en una célula hospedadora. Para expresar recombinantemente un anticuerpo se transfecta una célula hospedadora con uno o más vectores de expresión recombinantes portadores de las moléculas de ácido nucleico que codifican para las cadenas ligera y pesada de una inmunoglobulina del anticuerpo, de forma que las cadenas ligera y pesada son expresadas en la célula hospedadora y, preferiblemente, secretadas al medio en el que se cultiva la célula hospedadora, medio del que pueden recuperarse los anticuerpos. Se usan metodologías estándar recombinantes de ácidos nucleicos (ADN) para obtener los genes de las cadenas ligera y pesada de un anticuerpo, incorporando estos genes en vectores de expresión recombinantes e introduciendo los vectores anticuerpo en células hospedadoras, tales como las descritas en Sambrook, Fritsch y Maniatis (eds), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición, Cold Spring Harbor, Nueva York, (1989), Ausubel, F. M. y col. (eds.) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1989) y en la Patente de EE.UU. N° 4.816.397.

Para expresar los anticuerpos de la invención, en primer lugar se obtienen las moléculas de ácidos nucleicos que codifican para las regiones de la cadena ligera y pesada. Estas moléculas de ácidos nucleicos pueden obtenerse a partir de la línea celular de hibridoma de ratón que expresa el anticuerpo 1-60-46 y modificarse mediante procedimientos bien conocidos en la técnica (tal como mutagénesis dirigida) para generar los anticuerpos de la presente invención, incluyendo, por ejemplo, los anticuerpos producidos por la línea celular CHO 1-60-46 AM2 CHO 2-577 o por la línea celular CHO 1-60-46 AM2 CHO 1-1157. Una línea celular de hibridoma de ratón que expresa el anticuerpo 1-60-46 está disponible en Astellas Pharma, Inc., Tokio, Japón. Las secuencias de ácidos nucleicos de los genes de la VH y VL del anticuerpo 1-60-46 se muestran en la Figura 2 y en la SEC ID N°: 43 y 45.

Por ejemplo, una vez obtenidos los fragmentos de ácidos nucleicos de la pesada variable (VH) y la variable (VL) de 1-60-46, estas secuencias, o regiones específicas dentro de estas secuencias, tales como las CDR, pueden mutarse para que codifiquen las secuencias de aminoácidos relacionadas con AM2 o AM2- (véanse las Figuras 6 - 7 y 10) desveladas en este documento. Las secuencias de aminoácidos codificadas por las secuencias de ADN de VH y VL de 1-60-46 se comparan con las secuencias relacionadas con AM2 o AM2 para identificar residuos de aminoácidos de las secuencias relacionadas con AM2 que difieren. Se mutan los nucleótidos apropiados del anticuerpo 1-60-46 de forma que la secuencia mutada codifique para la secuencia de aminoácidos relacionada con AM2 o AM2, usando el código genético para determinar qué cambios de nucleótidos deben realizarse. La mutagénesis de las secuencias de 1-60-46 puede realizarse mediante procedimientos estándar, tales como una mutagénesis mediada por PCR (en la que los ácidos nucleicos mutados son incorporados en los cebadores de la PCR, de forma que el producto de la PCR contiene las mutaciones) o mutagénesis dirigida.

Alternativamente, en otro aspecto, las moléculas de ácidos nucleicos que codifican para las cadenas VH y VL pueden sintetizarse en un sintetizador químico, usando técnicas rutinarias conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las cadenas VH y VL de las moléculas de ácidos nucleicos descritas en la Sección III pueden sintetizarse químicamente usando técnicas rutinarias conocidas en la técnica. Partiendo de la base terminal en 3', que está fijada a un soporte, se acoplan los nucleótidos paso a paso. Después de la adición de la mayoría de los nucleótidos en 5', el nucleótido se escinde del soporte sólido y se purifica mediante una desalinización seguida de una electroforesis en gel de poliacrilamida (en lo sucesivo "PAGE") (Midly Certified Reagents, Midland, TX).

Una vez obtenidos los fragmentos de ácidos nucleicos que codifican para los segmentos de VH y VL relacionados con AM2 o AM2 (mediante la amplificación y la mutagénesis de los genes de VH y VL, como se ha descrito

anteriormente), estos fragmentos de ácidos nucleicos pueden manipularse adicionalmente mediante técnicas estándar de ADN recombinante, por ejemplo, para convertir los genes de la región variable en un anticuerpo (tal como, pero no se limita a, unos genes de la cadena completa de un anticuerpo, en genes del fragmento Fab o en un gen del scFv). En estas manipulaciones se une operativamente un fragmento de ácido nucleico que codifica para VL o VH a otro fragmento de ácido nucleico que codifica para otra proteína, tal como la región constante de un anticuerpo o un conector flexible. El término "unido operativamente", según se usa en este contexto, pretende indicar que se unen dos fragmentos de ácidos nucleicos de forma que las secuencias de aminoácidos codificados por los dos fragmentos de ácidos nucleicos permanecen en marco.

En un procedimiento alternativo puede construirse un gen de las regiones de CDR del scFv del tipo natural (tales como aquellas del anticuerpo 1-60-46) y mutarse después usando técnicas conocidas en la técnica.

La molécula de ácido nucleico aislada que codifica para la región VH puede convertirse en un gen completo de la cadena pesada uniéndolo operativamente a la molécula de ácido nucleico que codifica para la VH a otra molécula de ácido nucleico que codifica para las regiones constantes de la cadena pesada (CH1, CH2 y CH3). Las secuencias de los genes de la región constante de la cadena pesada humana son conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Kabat, E. A., y col., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edición, Department of Health and Human Services de EE.UU., Publicación del NIH N° 91 - 3242 (1991)). En otro aspecto, la presente invención engloba adicionalmente todas las regiones constantes de la cadena pesada humana conocidas, incluyendo, pero no limitándose a, todos los alotipos conocidos de la región constante de la cadena pesada humana. Los fragmentos de ácidos nucleicos que engloban estas regiones pueden obtenerse mediante una amplificación estándar por PCR. La región constante de la cadena pesada puede ser una región constante de IgG1, de IgG2, de IgG3, de IgG4, de IgA, de IgE, de IgM o de IgD.

La molécula de ácido nucleico aislada que codifica para la región VL puede convertirse en un gen completo de la cadena ligera (así como un gen de la cadena ligera de Fab) uniéndolo operativamente a la molécula de ácido nucleico que codifica para la VL a otra molécula de ácido nucleico que codifique para la región constante de la cadena ligera, CL. Las secuencias de los genes de la región constante de la cadena ligera humana son conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Kabat, E.A., y col., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services de EE.UU., Publicación del NIH N° 91 - 3242 (1991)). La presente invención engloba todas las regiones constantes de la cadena ligera humana conocidas, incluyendo, pero no limitándose a, los alotipos conocidos de la región constante de la cadena ligera humana. Los fragmentos de ácidos nucleicos que engloban estas regiones pueden obtenerse mediante una amplificación estándar por PCR. La región constante de la cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda, pero muy preferiblemente es una región constante kappa.

Debe apreciarse que las designaciones específicas de las regiones FR y CDR dentro de una región de una cadena pesada y ligera en particular pueden variar dependiendo de la convención o el sistema de numeración usado para identificar dichas regiones (por ejemplo, Chotia, Kabat, programa informático de modelado Oxford Molecular's *AbM*, todos los cuales son conocidos por los expertos habituales en la técnica). Para los propósitos de la presente invención, se usa el sistema de numeración del programa informático de modelado Oxford Molecular's *AbM*.

Para crear un gen del scFv, se unen operativamente los fragmentos de ácidos nucleicos que codifican para VH y VL a otro fragmento que codifica para un conector flexible, tal como, un conector que está codificado por la secuencia de aminoácidos GPAKELTPLKEAKVS (SEC ID N°: 36). Algunos ejemplos de otras secuencias conectoras que pueden usarse en la presente invención pueden encontrarse en Bird y col., *Science* 242: 423 - 426 (1988), Huston y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 85: 5879 - 5883 (1988) y McCafferty y col., *Nature*, 348: 552 - 554 (1990).

Para expresar los anticuerpos, o las porciones de anticuerpo de la invención, las moléculas de ácidos nucleicos que codifican para las cadenas ligera y pesada parciales o completas, obtenidas como se ha descrito anteriormente, se insertan en vectores de expresión de forma que los genes están unidos operativamente a las secuencias de control de la transcripción y de la traducción. En este contexto, el término "unido operativamente" pretende indicar que un gen de un anticuerpo está ligado de todo, de forma que las secuencias de la transcripción y la traducción del vector sirven para su función esperada de regular la transcripción y la traducción del gen del anticuerpo. Las secuencias del vector de expresión y del control de expresión se eligen para que sean compatibles con la célula hospedadora de expresión usada. El gen de la cadena ligera del anticuerpo y el gen de la que en la pesada del anticuerpo pueden insertarse en vectores distintos o, más típicamente, ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión. Los genes del anticuerpo se insertan en el vector de expresión mediante procedimientos estándar (por ejemplo, ligación de sitios de restricción complementarios del fragmento de gen del anticuerpo y vector, o ligación en extremos romos sino hay sitios de restricción presentes). Antes de la inserción de las secuencias de la cadena ligera o pesada, el vector de expresión pueden portar previamente las secuencias de la región constante del anticuerpo. Por ejemplo, una metodología para convertir las secuencias de VH y VL en genes del anticuerpo completo es insertar las en vectores de expresión que ya codifican para las regiones constantes de cadena pesada y constante de cadena ligera heavy, respectivamente, de forma que el segmento de la VH esté unido operativamente al "segmento" CH del vector, y el segmento de la VL esté unido operativamente al segmento CL del vector. Adicionalmente o como alternativa, el vector de expresión recombinante puede codificar para un péptido de señalización que facilite la secreción de la cadena de anticuerpo desde una célula hospedadora. El gen de la cadena

del anticuerpo puede clonarse en el vector, de forma que el péptido de señalización esté unido en marco al amino terminal del gen de la cadena del anticuerpo. El péptido individual puede ser un péptido de señalización de una inmunoglobina o un péptido de señalización heterólogo (es decir, un péptido de señalización de una proteína no inmunoglobulina).

Además de los genes de la cadena del anticuerpo, los vectores de expresión recombinantes pueden portar secuencias reguladoras que controlen la expresión de los genes de la cadena del anticuerpo en una célula hospedadora. Se pretende que el término "secuencia reguladora" incluya promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación) que controlen la transcripción y la traducción de los genes de la cadena del anticuerpo. Dichas secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel; Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990). Los expertos en la materia apreciarán que el diseño del vector de expresión, incluyendo la selección de las secuencias reguladoras, puede depender de factores tales como la elección de la célula hospedadora que se va a transformar, el nivel de expresión de proteína deseado, etc. Algunas secuencias reguladoras preferidas para la expresión en una célula hospedadora de mamífero incluyen elementos críticos que dirigen unos elevados niveles de expresión de la proteína en células de mamífero, tales como promotores y/o potenciadores derivados de citomegalovirus (en lo sucesivo "CMV") (tal como el promotor/potenciador de CMV), el virus simian Virus 40 (en lo sucesivo "SV40") (tal como el promotor/potenciador de SV40), adenovirus, (tal como el promotor tardío principal de adenovirus ("AdMLP")) y polio. Para una descripción adicional de los elementos reguladores víricos, y de las secuencias de los mismos, véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N° 5.168.062, la Patente de EE.UU. N° 4.510.245 y la Patente de EE.UU. N° 4.968.615.

Además de los genes de la cadena de anticuerpo y de las secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinantes pueden portar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células hospedadoras (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. Los genes marcadores seleccionables facilitan la selección de las células hospedadoras en las que ha sido introducido el vector (véanse, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. N° 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017). Por ejemplo, típicamente los genes marcadores seleccionables confieren resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, en una célula hospedadora la que se ha introducido el vector. Algunos genes marcadores seleccionables preferidos incluyen el gen de la reductasa de dihidrofolato (en lo sucesivo "DHFR") para su uso en células hospedadoras de dhfr con selección/amplificación de metotrexato y el gen de neomicina (en lo sucesivo "neo") para la selección en G418.

Para la expresión de las cadenas ligera y pesada, el (los) vector(es) de expresión que codifica(n) para las cadenas pesada y ligera se transfecta(n) en una célula hospedadora mediante técnicas convencionales. Se pretende que las diversas formas del término "transfección" engloben la gran diversidad de técnicas usadas habitualmente para la introducción de ADN exógeno en una célula hospedadora procariota o eucariota, por ejemplo, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, transfección con DEAE-dextrano y similares. Aunque teóricamente es posible expresar los anticuerpos de la invención en células hospedadoras tanto procariotas como eucariotas, la expresión de los anticuerpos en células eucariotas, y muy preferiblemente en células hospedadoras de mamífero, es la más preferida porque es más probable que en dichas células eucariotas, más que en células procariotas, y en particular en las células de mamífero, se ensamblen y secreten unos anticuerpos inmunológicamente activos adecuadamente plegados. Se ha informado de que la expresión procariota de genes de anticuerpos es ineficaz para la producción de anticuerpo activo con unos rendimientos elevados (véase, Boss, M. A. y Wood, C. R., Immunology Today 6: 12 - 13 (1985)).

Las células hospedadoras de mamífero preferidas para la expresión de los anticuerpos recombinantes de la invención incluyen las células CHO (incluyendo las células dhfr-CHO, descritas en Urlaub y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 77: 4216 - 4220 (1980), usadas con un marcador seleccionable de DHFR, por ejemplo, según se describe en R. J. Kaufman y P.A. Sharp, Mol. Biol. 159: 601 - 621 (1982)), las células de mieloma NSO, las células COS, las células HEK-293 y las células SP2. Cuando los vectores de expresión recombinantes que codifican para los genes del anticuerpo se introducen en células hospedadoras de mamífero, los anticuerpos son producidos mediante el cultivo de las células hospedadoras durante un período de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células hospedadoras, o más preferiblemente la secreción del anticuerpo en un medio de cultivo en el que se hacen crecer las células hospedadoras. Los anticuerpos pueden recuperarse del medio de cultivo usando procedimientos estándar de purificación de proteínas.

Las células hospedadoras también pueden usarse para producir porciones de anticuerpos intactos, tales como fragmentos Fab, fragmentos F(ab') o moléculas de scFv. Se entenderá que las variaciones del procedimiento anterior están dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, puede ser deseable transfectar una célula hospedadora con una molécula de ácido nucleico que codifica para la cadena ligera o para la cadena pesada (pero no ambas), de un anticuerpo de la presente invención. También puede usarse la tecnología del ADN recombinante para eliminar todas o parte de las moléculas de ácido nucleico que codifican para una o ambas de la cadena ligera y pesada que no son necesarias para la unión a al menos un epítipo de al menos un agente inmunosupresor. Las moléculas expresadas a partir de dichas moléculas de ácidos nucleicos truncadas también están englobadas por los anticuerpos de la invención.

En un sistema preferido para la expresión recombinante de un anticuerpo, o de la porción de unión al antígeno del mismo, de la invención, se introduce un vector de expresión recombinante que codifica tanto para la cadena pesada del anticuerpo como para la cadena ligera del anticuerpo, en células dhfr-CHO mediante una transacción mediada por liposomas. Dentro del vector de expresión recombinante, los genes de la cadena pesada y ligera del anticuerpo se unen cada uno operativamente a los elementos reguladores del potenciador de CMV / promotor de AdMLP para dirigir unos elevados niveles de transcripción de los genes. El vector de expresión recombinante también porta un gen de DHFR, que permite la selección de las células CHO que han sido transfectadas con el vector. Las células se cultivaron en medio sin hipoxantina ni timidina para obtener aquellas células CHO que habían adquirido el gen DHFR del vector transfectante. Se usaron unos procedimientos de cribado específicos del antígeno para identificar aquellos clones que expresaban la mayor cantidad de anticuerpo. Aquellos clones individuales se expandieron y se volvieron activar de forma rutinaria. Se elegirán dos líneas celulares para una caracterización adicional, CHO 2-577 1-60-46 AM2 de Tacrolimus y CHO 1-1157 1-60-46 AM2 de Tacrolimus. Las células hospedadoras transformantes seleccionadas se cultivan para permitir la expresión de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo, y el anticuerpo intacto se recupera del medio de cultivo. Se usaron técnicas estándar de biología molecular para preparar el vector de expresión recombinante, transfectar las células hospedadoras, seleccionar los transformantes, cultivar las células hospedadoras y recuperar el anticuerpo del medio de cultivo.

En vista del anterior, otro aspecto de la invención pertenece a composiciones de ácido nucleico, vector y célula hospedadora que pueden ser usadas para la expresión recombinante de los anticuerpos y las porciones de anticuerpo de la invención. La secuencia de aminoácidos que codifica para la región CDR 2 de la cadena pesada de AM2 y las variantes de la misma se muestran en la SEC ID N°: 16. La secuencia de aminoácidos que codifica para la región CDR 1 de la cadena ligera de AM2 se muestra en la SEC ID N°: 22. La secuencia de aminoácidos que codifica para la región CDR 3 de la cadena ligera de AM2 se muestra en la SEC ID N°: 23.

V. Selección de anticuerpos recombinantes (no incluida en la presente invención)

Los anticuerpos de la presente invención, incluyendo los anticuerpos AM2 o relacionados con AM2 desvelados en este documento, pueden aislarse mediante el cribado de una genoteca de combinación de anticuerpos. La genoteca de combinación de anticuerpos puede prepararse mediante el uso de técnicas de bioexpresión conocidas en la técnica, tales como, pero no limitadas a, expresión en fagos, expresión bacteriana, expresión ribosómica/ARNm, expresión de ADN y compartimentalización *in vitro*. Por ejemplo, la genoteca de combinación de anticuerpos es una genoteca de combinación recombinante, tal como una genoteca de expresión en levadura del scFv, preparada usando ADNcs de VL y VH murinos, quiméricos, humanizados o humanos. Las metodologías de preparación y cribado de dichas genotecas son conocidas en la técnica. Además de los vectores disponibles comercialmente para la generación de genotecas de expresión en levaduras (tales como el vector pYD1, Invitrogen, Carlsbad, California), algunos ejemplos de procedimientos y reactivos particularmente susceptibles para su uso en la generación y el cribado de genotecas de expresión de anticuerpos pueden encontrarse, por ejemplo, en Boder E. T. y Wittrup K. D., Yeast surface display for directed evolution of protein expression, affinity, and stability, *Methods Enzymol.*, 328: 430 - 44 (2000), Boder E. T. y Wittrup K. D., Yeast surface display for screening de combinaciónl polipeptide libraries, *Nat Biotechnol.* 15 (6): 553 - 7 (Junio de 1997) y Hawley y Hawley, eds., *Methods in Molecular Biology: Flow Cytometry Protocols*, 2ª ed., Humana Press, Totowa, NJ, páginas 311 - 332 (2004).

En una forma de realización preferida, para aislar los anticuerpos con una elevada afinidad de unión, tales como cualquiera de los anticuerpos descritos en la Sección II de este documento, se usa en primer lugar un anticuerpo del que se sabe que se une inmunoespecíficamente con al menos un epítipo de al menos un agente inmunosupresor para generar las secuencias de la cadena pesada y ligera murina expresadas como scFvs en la superficie de levaduras (preferiblemente, *Saccharomyces cerevisiae*). Estos anticuerpos (tales como los anticuerpos producidos por la línea celular de hibridoma 1-60-46) scFvs se analizan para determinar la constante de la velocidad de disociación (a saber, la k_{off} o la k_d) de estos anticuerpos. Dichos constructos se criban después, usando preferiblemente un antígeno de tacrolimus biotinilado (denominado en lo sucesivo "bt-tacro"). Entonces pueden representarse gráficamente los datos de las constantes de la velocidad de disociación como una intensidad de fluorescencia media ("MFI") frente al tiempo (en segundos). Puede usarse una ecuación de disminución de primer orden para ajustar los datos. Un ejemplo de dicha fórmula que puede usarse es:

$$y = m1 * \exp(-m2 * M0) + m3$$

donde m1 es la fluorescencia máxima en el momento cero (* = multiplicación y exp = exponencial);

donde m2 es la constante de la velocidad de disociación (la fórmula para la determinación de la constante de disociación es bien conocida por los expertos en la técnica);

donde M0 es el momento x (siendo x el momento que está siendo medido); y

donde m3 es el fondo que está siendo generado desde el sistema.

Los datos de la constante de la velocidad de disociación pueden usarse para identificar los anticuerpos de la

presente invención con unas velocidades de disociación mejoradas a partir de genotecas mutagénicas.

Los segmentos VH y VL del (los) par(es) preferido(s) de VHNL pueden mutarse aleatoriamente, preferiblemente dentro de la región CDR 2 de la VH, de la región CDR 1 y/o de la región CDR 3 de la VL en un proceso análogo al proceso de mutación somática *in vivo* responsable de la maduración de afinidad de los anticuerpos durante una respuesta inmunitaria natural. Esta maduración de afinidad *in vitro* puede realizarse sustituyendo una porción de cada CDR con un oligonucleótido monocatenario degenerado que codifica para tres aminoácidos dentro de la CDR objetivo. La sustitución de una porción de cada CDR con una nueva secuencia aleatorizada (hasta 8.000 posibilidades) puede realizarse mediante recombinación homóloga en levadura (véase, por ejemplo, el Ejemplo 4). Estos segmentos de VH y VL mutados aleatoriamente puede ser analizados para encontrar al menos un epítipo de al menos un agente inmunosupresor en el contexto de un scFv. Los ScFvs muestran una fluorescencia mejorada y que (a) en presencia de un diluyente fisiológico (PBS (pH 7,4) y BSA al 1%), se unen a al menos un epítipo de al menos un agente inmunosupresor y tienen una k_d de menos de $1,3 \times 10^{-4}$ /s, preferiblemente con una k_d que varía entre $1,29 \times 10^{-4}$ /s y $1,0 \times 10^{-6}$ /s, y más preferiblemente, con una k_d que varía entre $1,29 \times 10^{-4}$ /s y $1,0 \times 10^{-5}$ /s; o (b) en presencia de al menos un diluyente de selección, se unen a al menos un epítipo de al menos un agente inmunosupresor y tienen una k_d de menos de $9,38 \times 10^{-4}$ /s, preferiblemente con una k_d que varía entre $9,37 \times 10^{-4}$ /s y $1,0 \times 10^{-6}$ /s, y más preferiblemente con una k_d que varía entre $9,37 \times 10^{-4}$ /s y $1,0 \times 10^{-5}$ /s, después pueden ser aislados e identificarse la mutación en la can CDR mediante secuenciación.

Para aumentar adicionalmente la afinidad de unión, se combinan las mutaciones individuales aisladas a partir de genotecas mutagénicas descritas anteriormente. En una forma de realización preferida, se construyen los genes de los scFv que contienen las diferentes mutaciones obtenidas en la región CDR 2 del gen de VH acopladas con diferentes mutaciones obtenidas en la región CDR 1 del gen de VL y/o diferentes mutaciones obtenidas en la región CDR 3 del gen de VL. Como otra forma de realización, se construyen los genes de los scFv que contienen las diferentes mutaciones obtenidas en la región CDR 1 del gen VL y las diferentes mutaciones obtenidas en la región CDR 3 del gen de VL. Las manipulaciones genéticas para crear estas combinaciones mutantes usan técnicas conocidas en la técnica. La combinación de clones mutantes de los scFv que muestran una fluorescencia mejorada y que (a) en presencia de al menos un diluyente fisiológico (PBS (pH 7,4) y BSA al 1%), se unen a al menos un epítipo de al menos un agente inmunosupresor y tienen una k_d de menos de $1,3 \times 10^{-4}$ /s, preferiblemente con una k_d que varía entre $1,29 \times 10^{-4}$ /s y $1,0 \times 10^{-6}$ /s, y más preferiblemente, con una k_d que varía entre $1,29 \times 10^{-4}$ /s y $1,0 \times 10^{-5}$ /s; o (b) en presencia de al menos un diluyente de selección, tras la exposición a al menos un diluyente de selección o después de la incubación con, al menos un diluyente de selección, se unen a al menos un epítipo de al menos un agente inmunosupresor y tienen una k_d de menos de $9,38 \times 10^{-4}$ /s, preferiblemente con una k_d que varía entre $9,37 \times 10^{-4}$ /s y $1,0 \times 10^{-6}$ /s, y más preferiblemente con una k_d que varía entre $9,37 \times 10^{-4}$ /s y $1,0 \times 10^{-5}$ /s, después pueden caracterizarse y verificarse las mutaciones de la CDR mediante secuenciación.

Después de cribar una genoteca de expresión del scFv recombinante, se seleccionan los clones con las características deseadas para su conversión. Las moléculas de ácidos nucleicos que codifican para el anticuerpo seleccionado pueden recuperarse del envase de expresión (por ejemplo, del vector de expresión de levadura) y subclonarse en otros vectores de expresión mediante técnicas estándar de ADN recombinante. Si se desea, el ácido nucleico puede manipularse adicionalmente para crear otras formas de anticuerpo de la invención (por ejemplo, unirse a un ácido nucleico que codifica para dominios de inmunoglobulina adicionales, tales como regiones constantes adicionales). Para expresar un anticuerpo humano recombinante aislado mediante el cribado de una genoteca de combinación, se clona el ADN que codifica para el anticuerpo en un vector de expresión recombinante y se introduce en una célula hospedadora de mamífero, según se describe con más detalle adicionalmente en la Sección IV anterior.

VI. Inmunoensayos diagnósticos *in vitro*

En otro aspecto, la presente invención se refiere a inmunoensayos diagnósticos *in vitro* que pueden usarse para el análisis cualitativo y/o cuantitativo de al menos un agente inmunosupresor (a saber, un analito) en una muestra de prueba. Los inmunoensayos diagnósticos de la presente invención pueden realizarse usando cualquier formato conocido en la técnica, tal como, pero no se limitan a, un formato de inhibición competitiva (incluyendo ensayos de inhibición competitiva tanto directos como inversos) o un formato de polarización fluorescente.

En los inmunoensayos diagnósticos *in vitro* para la detección cualitativa de al menos un agente inmunosupresor en una muestra de prueba, se pone en contacto al menos un anticuerpo que se une a al menos un epítipo de al menos un agente inmunosupresor, con al menos una muestra de prueba sospechosa de contener, o que se sabe que contiene, al menos un agente inmunosupresor, para formar un complejo inmunitario anticuerpo-agente inmunosupresor. Los anticuerpos descritos en la Sección II de este documento pueden usarse en dichos inmunoensayos para formar dichos complejos inmunitarios de anticuerpo-agente inmunosupresor en al menos una muestra de prueba. Estos complejos inmunitarios pueden detectarse después usando técnicas rutinarias conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el anticuerpo de la presente invención puede ser marcado con un marcador detectable para detectar la presencia del complejo anticuerpo-agente inmunosupresor. Alternativamente, puede marcarse al menos un agente inmunosupresor en la muestra de prueba con un marcador detectable y detectarse los complejos anticuerpo-agente inmunosupresor resultantes usando técnicas rutinarias conocidas por los

expertos en la técnica. Los marcadores detectables y su unión a los anticuerpos se analizan con más detalle a continuación.

Los inventores han descubierto que puede realizarse un inmunoensayo diagnóstico *in vitro* usando los anticuerpos de la presente invención. Más específicamente, los anticuerpos de la presente invención pueden usarse en dicho inmunoensayo. Preferiblemente, el anticuerpo de la presente invención, como una inmunoglobulina, se une específicamente a al menos un epítipo de al menos un agente inmunosupresor con (a) una K_D menor de $1,9 \times 10^{-11}$ M, preferiblemente una K_D entre $1,89 \times 10^{-11}$ M y $1,0 \times 10^{-13}$ M y muy preferiblemente, una K_D entre $1,89 \times 10^{-11}$ M y $1,0 \times 10^{-12}$ M cuando dicho anticuerpo no ha sido expuesto a, incubado con, o está en presencia de, al menos un diluyente de selección; o (b) una K_D menor de $1,52 \times 10^{-10}$ M, preferiblemente una K_D entre $1,51 \times 10^{-10}$ M y $1,0 \times 10^{-11}$ M, y, muy preferiblemente, una K_D entre $1,51 \times 10^{-10}$ M y $1,0 \times 10^{-11}$ M con un cuando dicho anticuerpo ha sido expuesto a, incubado con, o está en presencia de, al menos un diluyente de selección (el anticuerpo puede ser expuesto a, o incubado con, al menos un diluyente de selección tanto antes de como durante el inmunoensayo, el tiempo de exposición o de incubación no es crítico). Como un scFv, el anticuerpo de la presente invención se une específicamente a al menos un epítipo en al menos un agente inmunosupresor con (a) una k_d de menos de $1,3 \times 10^{-4}$ /s, preferiblemente con una k_d que varía entre $1,29 \times 10^{-4}$ /s y $1,0 \times 10^{-6}$ /s, y más preferiblemente, con una k_d que varía entre $1,29 \times 10^{-4}$ /s y $1,0 \times 10^{-5}$ /s cuando dicho anticuerpo no ha sido expuesto a, incubado con, o está en presencia de, al menos un diluyente de selección; o (b) una k_d de menos de $9,38 \times 10^{-4}$ /s, preferiblemente con una k_d que varía entre $9,37 \times 10^{-4}$ /s y $1,0 \times 10^{-6}$ /s, y más preferiblemente con una k_d que varía entre $9,37 \times 10^{-4}$ /s y $1,0 \times 10^{-5}$ /s cuando dicho anticuerpo ha sido expuesto a, incubado con, o está en presencia de, al menos un diluyente de selección (el anticuerpo puede ser expuesto a, o incubado con, al menos un diluyente de selección tanto antes de como durante el inmunoensayo, el tiempo de exposición o de incubación no es crítico).

En una forma de realización preferida, se usa una alícuota de un antígeno marcado de al menos un agente inmunosupresor de una concentración conocida para competir con al menos un agente inmunosupresor en una muestra de prueba por la unión a un anticuerpo (tal como un anticuerpo de la presente invención) en un formato de ensayo competitivo directo. Los antígenos de los agentes inmunosupresores y los procedimientos para marcar dichos antígenos son bien conocidos en la técnica y están disponibles en el mercado. El agente inmunosupresor o el antígeno de dicho agente inmunosupresor puede ser marcado con cualquier marcador detectable conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, pero no limitante, el marcador detectable puede ser un marcador radioactivo, tal como, ^3H , ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C , ^{32}P , ^{33}P , un marcador enzimático, tal como peroxidasa de rábano picante, peroxidasa alcalina, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, etc., un marcador quimioluminiscente tal como ésteres de acridinio, luminal, isoluminol, tioésteres, sulfonamidas, ésteres de fenantridinio, etc. Un marcador fluorescente, tal como fluoresceína (5-fluoresceína, 6-carboxifluoresceína, 3'6-carboxifluoresceína, 5(6)-carboxifluoresceína, 6-hexaclorofluoresceína, 6-tetraclorofluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, etc.), rodamina, ficobiliproteínas, R-ficoeritrina, puntos cuánticos (seleniuro de cadmio protegido con sulfuro de cinc), un marcador termométrico o un marcador de inmunorreacción en cadena de la polimerasa. Una introducción a los marcadores, los procedimientos de marcaje y la detección de los marcadores se encuentra en Polak y Van Noorden, *Introduction to Immunocytochemistry*, 2ª ed., Springer Verlag, N. Y. (1997) y en Haugland, *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals* (1996), que es una combinación de manual y catálogo publicado por Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregón. Por ejemplo, según se describe en los Ejemplos de este documento, en dichos formatos competitivos también puede usarse un antígeno de tacrolimus biotinilado o de acridinio-tacrolimus.

En un ensayo de competición directa, un anticuerpo inmovilizado (tal como un anticuerpo de la presente invención) puede ponerse en contacto secuencialmente o simultáneamente con la muestra de prueba y un agente inmunosupresor marcado o un antígeno de un agente inmunosupresor. El agente inmunosupresor o el antígeno de dicho agente inmunosupresor puede marcarse con cualquier marcador detectable conocido por los expertos en la técnica. En este ensayo, el anticuerpo de la presente invención puede inmovilizarse sobre un soporte sólido. Además, si fuera necesario, el soporte sólido puede estar derivatizado para permitir la reactividad con varios grupos funcionales del anticuerpo. Dicha derivatización requiere el uso de ciertos agentes de acoplamiento tales como, pero no limitados a, anhídrido maleico, N-hidroxisuccinimida y 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida. Alternativamente, el anticuerpo de la presente invención puede acoplarse a un anticuerpo, tal como un anticuerpo antiespecie, que ha sido inmovilizado sobre un soporte sólido, tal como una micropartícula (véase el Ejemplo 9).

El agente inmunosupresor marcado o el antígeno de dicho agente inmunosupresor, la muestra de prueba y el anticuerpo se incuban con objeto de permitir la formación de un complejo anticuerpo (o anticuerpo múltiple)-agente inmunosupresor. La incubación puede realizarse a un pH de desde aproximadamente 4,5 hasta aproximadamente 10,0, a una temperatura de desde aproximadamente 2°C hasta aproximadamente 45°C, y durante un periodo desde al menos aproximadamente un (1) minuto hasta aproximadamente dieciocho (18) horas, preferiblemente de aproximadamente 1 - 24 minutos, muy preferiblemente de aproximadamente 4 - 18 minutos. Entonces se generan dos especies diferentes de complejos de anticuerpo-agente inmunosupresor. Específicamente, uno de los complejos de anticuerpo-agente inmunosupresor generado contiene un marcador detectable, mientras que el otro complejo de anticuerpo-agente inmunosupresor no contiene un marcador detectable. El complejo de anticuerpo-agente inmunosupresor puede ser, aunque no tiene por qué, separado del resto de la muestra de prueba antes de la cuantificación del marcador detectable. Independientemente de si se separa el complejo anticuerpo-agente inmunosupresor del resto de la muestra de prueba, después se cuantifica la cantidad de marcador detectable en el

complejo de anticuerpo-agente inmunosupresor. Por ejemplo, si se usa un marcador enzimático, el complejo marcador se hace reaccionar con un sustrato para el marcaje que proporciona una reacción cuantificable, tal como la aparición de color. Si el marcador es un marcador radiactivo, el marcador se cuantifica usando un contador de centelleo. Si el marcador es un marcador fluorescente, el marcador se cuantifica estimulando el marcador con una luz de un color (que se conoce como la "longitud de onda de excitación") y detectando otro color (que se conoce como la "longitud de onda de emisión ") que es emitida por el marcador en respuesta a la estimulación. Si el marcador es un marcador quimioluminiscente, el marcador se cuantifica detectando la luz emitida ya sea visualmente o mediante el uso de luminómetros, una película de rayos X, una película fotográfica alta velocidad, una cámara CCD, etc. La concentración de al menos un agente inmunosupresor en la muestra de prueba puede determinarse entonces mediante la comparación de la cantidad del marcador detectable en el complejo anticuerpo-agente inmunosupresor en una curva estándar. La curva estándar puede generarse usando diluciones sucesivas de al menos un agente inmunosupresor de concentración conocida, mediante espectroscopía de masas, gravimétricamente y mediante otras técnicas conocidas en la técnica.

El complejo anticuerpo-agente inmunosupresor puede separarse de la muestra de prueba uniendo el anticuerpo sobre un soporte sólido, tal como los soportes sólidos, y eliminando después el resto de la muestra de prueba en contacto con el soporte sólido. Por ejemplo, si el al menos primer anticuerpo se une sobre un soporte sólido, tal como un pocillo o una microesfera, la separación puede realizarse mediante la eliminación del fluido (de la muestra de prueba) del contacto con el soporte sólido.

En un ensayo de competición inversa, un agente inmunosupresor inmovilizado o un antígeno de dicho agente inmunosupresor puede ponerse en contacto secuencialmente o simultáneamente con una muestra de prueba y al menos un anticuerpo marcado. Un ejemplo de un anticuerpo que se une específicamente a al menos un epítipo de al menos un agente inmunosupresor es el anticuerpo producido por la línea celular CHO 1-60-4 6 AM2 CHO 2-577 o por la línea celular CHO 1-60-46 AM2 CHO 1-1157. El anticuerpo puede ser marcado con cualquier marcador detectable conocido por los expertos en la técnica. El marcador detectable puede unirse a los anticuerpos bien directamente o bien a través de un agente de acoplamiento. Un ejemplo de un agente de acoplamiento que puede usarse es EDAC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida, clorhidrato), que está disponible en el mercado, de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO. Otros agentes de acoplamiento que pueden usarse son conocidos en la técnica. Los procedimientos para unir un marcador detectable a un anticuerpo son conocidos en la técnica. Adicionalmente, pueden adquirirse o sintetizarse muchos marcadores detectables que ya contienen grupos terminales que facilitan el acoplamiento del marcador detectable al anticuerpo, tales como, N 10-(3-sulfopropil)-N-(3-carboxipropil)-acridinio-9-carboxamida, también conocido como Éster de CPSP-Acridinio, o N10-(3-sulfopropil)-N-(3-sulfopropil)-acridinio-9-carboxamida, también conocido como Éster de SPSP-Acridinio.

El agente inmunosupresor o un antígeno de dicho agente inmunosupresor puede unirse sobre un soporte sólido, tal como los soportes los sólidos analizados anteriormente en relación con el formato competitivo directo.

El agente inmunosupresor inmovilizado o el antígeno de dicho agente inmunosupresor, la muestra de prueba y al menos un anticuerpo marcado, se incuban en unas condiciones similares a las descritas anteriormente en relación con el formato de ensayo en sándwich. Entonces se generan dos especies diferentes de complejos de agente inmunosupresor-anticuerpo. Específicamente, uno de los complejos de agente inmunosupresor-anticuerpo generado es inmovilizado y contiene un marcador detectable, mientras que el otro complejo de agente inmunosupresor-anticuerpo no está inmovilizado y contiene un marcador detectable. El complejo de agente inmunosupresor-anticuerpo no inmovilizado y el resto de la muestra de prueba se retiran de la presencia del complejo de agente inmunosupresor-anticuerpo inmovilizado mediante técnicas conocidas en la técnica, tales como un lavado. Una vez que se retira el complejo de agente inmunosupresor-anticuerpo no inmovilizado, entonces se cuantifica la cantidad de marcador detectable en el complejo de agente inmunosupresor-anticuerpo. Entonces puede determinarse la concentración de al menos un agente inmunosupresor en la muestra de prueba mediante la comparación de la cantidad del marcador detectable en el complejo de agente inmunosupresor-anticuerpo en una curva estándar. La curva estándar puede generarse usando diluciones sucesivas de al menos un agente inmunosupresor de concentración conocida, mediante espectroscopía de masas, gravimétricamente y mediante otras técnicas conocidas en la técnica.

En un ensayo de polarización fluorescente, en una forma de realización, se pone en contacto en primer lugar un anticuerpo o un fragmento funcionalmente activo del mismo con una muestra de prueba sin marcar sospechosa de contener al menos un agente inmunosupresor, para formar un complejo de agente inmunosupresor-anticuerpo sin marcar. Entonces el complejo de agente inmunosupresor-anticuerpo se pone en contacto con un agente inmunosupresor o un antígeno de dicho agente inmunosupresor marcado fluorescentemente. El complejo de agente inmunosupresor-anticuerpo sin marcar se pone en contacto entonces con un agente inmunosupresor o un antígeno de dicho agente inmunosupresor marcado fluorescentemente. El agente inmunosupresor o el antígeno de dicho agente inmunosupresor marcado compite con cualquier al menos un agente inmunosupresor sin marcar de la muestra de prueba por la unión al anticuerpo o a un fragmento funcionalmente activo del mismo. Se determina la cantidad de complejo de agente inmunosupresor-anticuerpo marcado formada y la cantidad de agente inmunosupresor en la muestra de prueba mediante el uso de una curva estándar.

Preferiblemente, el anticuerpo usado en un ensayo de polarización fluorescente se une específicamente a al menos un epítipo de un agente inmunosupresor. Un ejemplo de un anticuerpo que se une específicamente a al menos un epítipo de al menos un agente inmunosupresor es el anticuerpo producido por la línea celular CHO 1-60-46 AM2 CHO 2-577 o por la línea celular CHO 1-60-46 AM2 CHO 1-1157.

El anticuerpo, el agente inmunosupresor marcado o el antígeno marcado de dicho agente inmunosupresor, y la muestra de prueba, y al menos un anticuerpo marcado, se incuban en unas condiciones similares a las descritas anteriormente en relación con el formato de ensayo competitivo directo.

Alternativamente, en otra forma de realización, se ponen en contacto simultáneamente un anticuerpo o un fragmento funcionalmente activo del mismo con un agente inmunosupresor o un antígeno de un agente inmunosupresor marcado fluorescentemente, y una muestra de prueba sin marcar sospechosa de contener al menos un agente inmunosupresor en la misma para formar ambos complejos de agente inmunosupresor-anticuerpo marcado y agente inmunosupresor-anticuerpo sin marcar. Se determina la cantidad de complejo de agente inmunosupresor-anticuerpo marcado formado y se determina la cantidad de agente inmunosupresor la muestra de prueba mediante el uso de una curva estándar. El anticuerpo usado en este inmunoensayo se une específicamente a al menos un epítipo de al menos un agente inmunosupresor. Un ejemplo de un anticuerpo que se une específicamente a al menos un epítipo de al menos un agente inmunosupresor es el anticuerpo producido por la línea celular CHO 1-60-46 AM2 CHO 2-577 o por la línea celular CHO 1-60-46 AM2 CHO 1-1157.

Alternativamente, en otra forma de realización más, se pone en primer lugar en contacto un anticuerpo (tal como un anticuerpo de la presente invención, tal como un anticuerpo producido por la línea celular CHO 1-60-46 AM2 CHO 2-577 o por la línea celular CHO 1-60-46 AM2 CHO 1-1157) o un fragmento funcionalmente activo del mismo, con un agente inmunosupresor o un antígeno de dicho agente inmunosupresor marcado fluorescentemente para formar un complejo de agente inmunosupresor-anticuerpo marcador. Entonces se pone en contacto el complejo de agente inmunosupresor-anticuerpo con una muestra de prueba sin marcar sospechosa de contener un agente inmunosupresor o un antígeno de un agente inmunosupresor. Cualquier al menos un agente inmunosupresor sin marcar de la muestra de prueba compite con el agente inmunosupresor o con un antígeno de un agente inmunosupresor marcado por la unión al anticuerpo o a un fragmento funcionalmente activo del mismo. Se determina la cantidad de complejo de agente inmunosupresor-anticuerpo marcado formado, la cantidad de agente inmunosupresor en la muestra de prueba se determina mediante el uso de una curva estándar. El anticuerpo usado en este inmunoensayo se une específicamente a al menos un epítipo de al menos un agente inmunosupresor. Un ejemplo de un anticuerpo que se une específicamente a al menos un epítipo de al menos un agente inmunosupresor es el anticuerpo producido por la línea celular CHO 1-60-46 AM2 CHO 2-577 o por la línea celular CHO 1-60-46 AM2 CHO 1-1157.

VII. Procedimientos para seleccionar anticuerpos y compañeros de unión específicos (no incluidos en la presente invención)

La presente invención también proporciona procedimientos para seleccionar un anticuerpo o un compañero de unión específico. El anticuerpo seleccionado o el compañero de unión específico seleccionado conforme a los procedimientos descritos en este documento puede usarse en un inmunoensayo diagnóstico para detectar un analito en una muestra de prueba, cuantificar la cantidad de analito en una muestra de prueba o detectar un analito en una muestra de prueba y cuantificar la cantidad de analito en una muestra de prueba.

En un aspecto, la presente invención se refiere a procedimientos para seleccionar un anticuerpo (tal como un anticuerpo de afinidad madurado). El procedimiento implica poner en contacto al menos un anticuerpo con una muestra en presencia de al menos un diluyente de selección. Alternativamente, el procedimiento implica en primer lugar incubar el al menos un anticuerpo con al menos un diluyente de selección y poner en contacto después el al menos un anticuerpo con la muestra. El orden con que el al menos un anticuerpo, la muestra y al menos un diluyente de selección, o en el caso de una incubación previa, el al menos un anticuerpo y al menos un diluyente de selección, seguido de al menos un anticuerpo de la muestra, se ponen en contacto, no es crítico y puede realizarse secuencialmente o simultáneamente. Adicionalmente, la cantidad de anticuerpo, de muestra o de ambos, usada en el procedimiento no es crítica. Opcionalmente, antes de exponer la muestra a al menos un diluyente de selección, puede añadirse al menos un diluyente fisiológico a la muestra de prueba (la cantidad de diluyente fisiológico que se va a añadir a una muestra de prueba puede ser determinada fácilmente por los expertos en la técnica) con objeto de aproximar, imitar o simular las condiciones fisiológicas *in vivo* del sujeto a partir del cual deriva la muestra (en otras palabras, para hacer que la muestra de prueba sea más "de tipo fisiológico"). Si dicha muestra se expone a al menos un diluyente fisiológico, una vez que el al menos un diluyente de selección se añade a la muestra de prueba, o una vez que la muestra de prueba es expuesta a al menos un diluyente de selección, se espera que el al menos un diluyente de selección cambie las condiciones de la muestra de prueba y la haga "no fisiológica". Por ejemplo, si se añade al menos un diluyente fisiológico a una muestra de prueba, la adición de al menos un diluyente de selección a la muestra de prueba puede aumentar o disminuir el pH de la muestra de prueba, aumentar la cantidad de sal de sodio o de potasio en la muestra de prueba, aumentar la cantidad de disolvente en la muestra de prueba, etc.

La muestra usada en el procedimiento es la fuente de un analito que contiene al menos un epítipo de interés. La

muestra puede ser una muestra de prueba de un sujeto o puede no derivar de un sujeto, pero aún así comprende el analito que contiene el al menos un epítipo de interés. La muestra puede comprender, pero no se limita a, anticuerpos, antígenos, haptenos, hormonas, fármacos, enzimas, receptores, proteínas, péptidos, polipéptidos, oligonucleótidos o polinucleótidos de interés. Por ejemplo, la muestra puede ser un agente inmunosupresor, tal como tacrolimus o ciclosporina (a saber, el propio fármaco). Alternativamente, la muestra puede ser una muestra de sangre completa obtenida a partir de un sujeto que contiene tacrolimus o ciclosporina. Alternativamente, la muestra puede contener una proteína marcada con avidina.

El al menos un anticuerpo seleccionado para el ensayo en el procedimiento descrito en este documento es conocido por el experto en la técnica porque se une a al menos un epítipo de interés (a saber, el al menos un anticuerpo es conocido por ser un compañero de unión específico para el analito (antígeno) que contiene el epítipo de interés). Preferiblemente, el anticuerpo y el antígeno forman parte de un par de unión específico. Por ejemplo, la muestra puede ser tacrolimus (a saber, el propio fármaco). El anticuerpo puede ser un anticuerpo producido a partir de una línea celular de hibridoma 1-60-46, una línea celular CHO 1-60-46 AM2 CHO 2-577 o una línea celular CHO 1-60-46 AM2 CHO 1-1157 según se describe en este documento, que se une al tacrolimus. Se prefiere, aunque no es necesario, que antes de realizar el procedimiento descrito en este documento, se determinen la constante de disociación en equilibrio (K_D), la constante de velocidad de disociación (k_d), la constante de velocidad de asociación (k_a) o la actividad funcional del al menos un anticuerpo que se ensaya en el procedimiento, en presencia y en ausencia del diluyente de selección, para que sirva como medición de la línea de base.

Preferiblemente, el diluyente de selección seleccionado para su uso en el procedimiento descrito en este documento (a) es conocido por el experto en la técnica por incrementar la K_D (y por lo tanto disminuir la k_a y/o aumentar la k_d) de al menos un anticuerpo que se va a ensayar en el procedimiento o que dicha persona experta cree probable que aumente la K_D del al menos un anticuerpo que se va a ensayar en el procedimiento; (b) el experto en la técnica sabe que disminuye la actividad funcional del al menos un anticuerpo que se va a ensayar en el procedimiento o dicha persona experta cree probable que disminuye la actividad funcional del al menos un anticuerpo que se va a ensayar en el procedimiento, si dicho al menos un anticuerpo tuviera que ser incubado o usado con, o en presencia de, dicho diluyente de selección (tal como, pero no se limita a, ser usado antes de o durante un inmunoensayo diagnóstico); o (c) cualquier combinación de (a) - (b).

Se usan tampones de extracción de ensayo que contienen uno o más disolventes orgánicos, tal como una combinación de metanol al 90% y etilenglicol al 10% (y opcionalmente, sulfato de cinc 100 mM), para extraer el tacrolimus a partir de una muestra de prueba de sangre completa obtenida de un sujeto que recibe este agente inmunosupresor como parte del tratamiento del sujeto. Los inventores de la presente invención descubrieron que estos tampones de extracción de ensayo que se emplean en los ensayos inmunodiagnósticos alteran la K_D , la actividad funcional, o tanto la K_D como la actividad funcional, de uno o más anticuerpos usados en dicho inmunoensayo. Por lo tanto, se prefiere que, en el procedimiento descrito en este documento, el diluyente de selección se use para aproximar, simular o imitar las condiciones de reacción de un inmunoensayo diagnóstico. Mediante el uso del diluyente de selección para aproximar, simular o imitar las condiciones de reacción de un inmunoensayo diagnóstico, el procedimiento de la presente invención permite que el experto en la técnica seleccione un anticuerpo que mostrará una mayor afinidad o actividad funcional en un inmunoensayo diagnóstico que los anticuerpos que no son seleccionados conforme a este procedimiento.

Con objeto de facilitar el procedimiento puede expresarse todo o sólo una porción del al menos un anticuerpo usado en el procedimiento usando las técnicas descritas en las Secciones IV y V de este documento (tal como bioexpresión) de una forma tal que se acople el fenotipo de dicho anticuerpo con el genotipo de dicho anticuerpo. Preferiblemente, esto permite que el gen de dicho anticuerpo que muestra un rasgo de interés (por ejemplo, una velocidad de disociación disminuida en presencia de un disolvente orgánico) que se va a aislar tras la aplicación de una presión selectiva, a saber, la incubación con un diluyente de selección, dé como resultado unas condiciones no fisiológicas o que contienen un competidor de unión. Adicionalmente, pueden construirse genotecas recombinantes que introducen varios cambios en la secuencia génica del anticuerpo de partida usando procedimientos conocidos por los expertos en la técnica y que también se describen en las Secciones IV y V de este documento. La muestra usada en el procedimiento puede ser inmovilizada sobre un soporte sólido, tal como, pero no se limita a, un polímero absorbente presente en una placa de un inmunoensayo enzimático ("EIA") u otras matrices tales como, pero no se limitan a, Sepharose o vidrio; puede expresarse (tal como en su forma natural o recombinante) sobre la superficie celular de una línea celular natural o recombinante mediante procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Alternativamente, la muestra puede no estar inmovilizada sino simplemente presente en disolución. Adicionalmente, el al menos un anticuerpo, la muestra, o ambos, pueden estar marcados con un marcador detectable usando las técnicas descritas en la Sección VI.

El al menos un anticuerpo, la muestra y al menos un diluyente de selección, o el al menos un anticuerpo de la muestra (si el anticuerpo se ha incubado previamente con el al menos un diluyente de selección) se dejan incubar con objeto de permitir la formación de los complejos de anticuerpo (o anticuerpo múltiple)-analito y analito-anticuerpo. La incubación puede realizarse a un pH de desde aproximadamente 4,5 hasta aproximadamente 10,0, a una temperatura de desde aproximadamente 2°C hasta aproximadamente 45°C, y durante un periodo de desde al menos aproximadamente un (1) minuto hasta aproximadamente cuarenta y ocho (48) horas.

Después de la incubación, aquellos anticuerpos que muestran las mejoras fenotípicas para el rasgo deseado se enriquecen selectivamente tras la eliminación de los anticuerpos no deseados. Los anticuerpos no deseados pueden eliminarse mediante un lavado en virtud de su incapacidad para unirse a la muestra inmovilizada con el mismo grado que los anticuerpos que tienen las propiedades fenotípicas mejoradas. Alternativamente, los anticuerpos que muestran las mejoras fenotípicas para el rasgo deseado pueden enriquecerse con respecto a los anticuerpos no deseados usando un sistema indicador según se describe en Sección VI para identificar los anticuerpos deseados y permitir la subsiguiente separación de los anticuerpos no deseados. Una forma de realización preferida, pero no limitante, usa la clasificación de células activadas por fluorescencia ("FACS"), junto con una muestra marcada fluorescentemente, para identificar y aislar selectivamente los anticuerpos con las mejoras fenotípicas deseadas. La muestra sin marcar también puede usarse para identificar y aislar los anticuerpos con las mejoras fenotípicas deseadas junto con una FACS si hay disponible en la muestra un segundo reactivo marcado fluorescentemente capaz de unirse a un epítipo no solapante de la muestra. Típicamente, se amplifican los clones enriquecidos con el rasgo fenotípico mejorado y el proceso de selección se repite para un enriquecimiento y refinamiento adicional.

Después de múltiples rondas de selección como se ha descrito anteriormente, puede determinarse la K_D , la k_d , la k_a o la actividad funcional del al menos un anticuerpo o combinaciones de los mismos usando técnicas rutinarias conocidas en la técnica. Por ejemplo, la K_D , la k_d o la k_a pueden determinarse usando los ensayos KinExA® o Biacore®. Los procedimientos para la determinación de la actividad funcional de un anticuerpo también son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, los ensayos KinExA® y Biacore®, radioinmunoensayos ("RIAs"), inmunoensayos enzimáticos ("EIAs"), inmunoensayos quimioluminiscentes ("CIAs"), espectroscopia de correlación por fluorescencia ("FCS"), clasificación de células activadas por fluorescencia ("FACS") o inmunoensayo de polarización por fluorescencia ("FPIA"). El anticuerpo que muestra la mejor K_D , k_d o k_a o actividad funcional en presencia del diluyente de selección cuando se compara con otros anticuerpos ensayados (y opcionalmente, con la medición de la línea de base) se considerará un anticuerpo mejorado (por ejemplo, un anticuerpo de afinidad madurado) y se seleccionará para un desarrollo adicional, tal como para su uso en un inmunoensayo diagnóstico.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a procedimientos para seleccionar un compañero de unión específico para detectar un analito en una muestra de prueba. El procedimiento implica poner en contacto un compañero de unión específico con una muestra en presencia de al menos un diluyente de selección. El orden en el que el compañero de unión específico, la muestra y al menos un diluyente de selección entran en contacto no es crítico y puede realizarse secuencialmente o simultáneamente. Adicionalmente, la cantidad de compañero de unión específico o de muestra usados en el procedimiento, no es crítica.

La muestra usada en el procedimiento es la fuente de un analito que contiene al menos un epítipo de interés. La muestra puede ser una muestra de prueba procedente de un sujeto o puede no derivar de un sujeto, pero no obstante comprende el analito que contiene el al menos un epítipo de interés. La muestra puede comprender, pero no se limita a, anticuerpos, antígenos, haptenos, hormonas, fármacos, enzimas, receptores, proteínas, péptidos, polipéptidos, oligonucleótidos o polinucleótidos de interés. Por ejemplo, la muestra puede ser un agente inmunosupresor, tal como tacrolimus o ciclosporina (a saber, el propio fármaco). Alternativamente, la muestra puede ser una muestra de sangre completa obtenida de un sujeto que contiene tacrolimus o ciclosporina.

El al menos un compañero de unión específico seleccionado para el ensayo del procedimiento descrito en este documento es conocido por el experto en la técnica porque se une a al menos un epítipo de interés contenido en el analito de la muestra de prueba. Por ejemplo, la muestra puede ser tacrolimus o ciclosporina (a saber, el propio fármaco). El compañero de unión específico puede ser las proteínas presentes en una muestra de prueba (tal como suero), tales como, pero no se limitan a, ciclofilina o proteína de unión a FK ("FKBP"). Se prefiere, aunque no es necesario, que antes de realizar el procedimiento descrito en este documento, se determinen la constante de disociación en equilibrio (K_D), la constante de velocidad de disociación (k_d), la constante de velocidad de asociación (k_a) o la actividad funcional del al menos un compañero de unión específico a ensayar en el procedimiento, en presencia y en ausencia del diluyente de selección, para que sirva como medición de la línea de base.

Preferiblemente, el diluyente de selección seleccionado para su uso en el procedimiento descrito en este documento (a) es conocido por el experto en la técnica por incrementar la K_D (y por lo tanto disminuir la k_a y/o aumentar la k_d) de al menos un anticuerpo que se va a ensayar en el procedimiento o que dicha persona experta cree probable que aumente la K_D del al menos un anticuerpo que se va a ensayar en el procedimiento; (b) el experto en la técnica sabe que disminuye la actividad funcional del al menos un anticuerpo que se va a ensayar en el procedimiento o dicha persona experta cree probable que disminuya la actividad funcional del al menos un anticuerpo que se va a ensayar en el procedimiento, si dicho al menos un anticuerpo tuviera que ser incubado o usado con, o en presencia de, dicho diluyente de selección (tal como, pero no se limita a, ser usado antes de o durante un inmunoensayo diagnóstico); o (c) cualquier combinación de (a) - (b).

Según se describió previamente en este documento, se usan tampones de extracción de ensayo que contienen uno o más disolventes orgánicos, tal como una combinación de metanol al 90% y etilenglicol al 10% (y opcionalmente, sulfato de cinc 100 mM), para extraer el tacrolimus a partir de una muestra de prueba de sangre completa obtenida de un sujeto que recibe este agente inmunosupresor como parte del tratamiento del sujeto. Por lo tanto, se prefiere

que, en el procedimiento descrito en este documento, el diluyente de selección se use para aproximar, simular o imitar las condiciones de reacción de un inmunoensayo diagnóstico. Mediante el uso del diluyente de selección para aproximar, simular o imitar las condiciones de reacción de un inmunoensayo diagnóstico, el procedimiento de la presente invención permite que el experto en la técnica seleccione un compañero de unión específico mejorado que puede evaluarse adicionalmente para su uso en un inmunoensayo diagnóstico.

Con objeto de facilitar el procedimiento puede expresarse todo o sólo una porción del al menos un compañero de unión específico usado en el procedimiento usando las técnicas descritas en las Secciones IV y V de este documento de una forma tal que se acople el fenotipo de dicho anticuerpo con el genotipo de dicho anticuerpo. Preferiblemente, esto permite que el gen de dicho anticuerpo que muestra un rasgo de interés (por ejemplo, una velocidad de disociación disminuida en presencia de un disolvente orgánico) que se va aislar tras la aplicación de una presión selectiva, a saber, la incubación con un diluyente de selección, dé como resultado unas condiciones no fisiológicas o que contienen un competidor de unión. Adicionalmente, pueden construirse genotecas recombinantes que introducen varios cambios en la secuencia génica del compañero de unión específico de partida usando procedimientos conocidos por los expertos en la técnica y que también se describen en las Secciones IV y V de este documento. La muestra usada en el procedimiento puede ser inmovilizada sobre un soporte sólido, tal como, pero no limitado a, un polímero absorbente presente en una placa de un inmunoensayo enzimático ("EIA") u otras matrices tales como, pero no se limitan a, Sepharose o vidrio; puede expresarse (tal como en su forma natural o recombinante) sobre la superficie celular de una línea celular natural o recombinante mediante procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Alternativamente, la muestra puede no estar inmovilizada sino simplemente presente en disolución. Adicionalmente, el al menos un compañero de unión específico, la muestra, o ambos, pueden estar marcados con un marcador detectable usando las técnicas descritas en la Sección VI.

El compañero de unión específico, la muestra y al menos un diluyente de selección se dejan incubar con objeto de permitir la formación de complejos de compañero de unión específico (o múltiples compañeros de unión específicos)-analito. La incubación puede realizarse a un pH de desde aproximadamente 4,5 hasta aproximadamente 10,0, a una temperatura de desde aproximadamente 2°C hasta aproximadamente 45°C, y durante un periodo de desde al menos aproximadamente un (1) minuto hasta aproximadamente cuarenta y ocho (48) horas.

Después de de la incubación, aquellos compañeros de unión específicos que muestran las mejoras fenotípicas para el rasgo deseado se enriquecen selectivamente tras la eliminación de los compañeros de unión específicos no deseados. Los compañeros de unión específicos no deseados pueden eliminarse mediante un lavado en virtud de su incapacidad para unirse a la muestra inmovilizada con el mismo grado que los compañeros de unión específicos que tienen las propiedades fenotípicas mejoradas. Alternativamente, los compañeros de unión específicos que muestran las mejoras fenotípicas para el rasgo deseado pueden enriquecerse con respecto a los compañeros de unión específicos no deseados usando un sistema indicador según se describe en Sección VI para identificar los compañeros de unión específicos deseados y permitir la subsiguiente separación de los compañeros de unión específicos no deseados. Una forma de realización preferida, pero no limitante, usa la clasificación de células activadas por fluorescencia ("FACS"), junto con una muestra marcada fluorescentemente, para identificar y aislar selectivamente los compañeros de unión específicos con las mejoras fenotípicas deseadas. La muestra sin marcar también puede usarse para identificar y aislar los compañeros de unión específicos con las mejoras fenotípicas deseadas junto con una FACS si hay disponible en la muestra un segundo reactivo segundo reactivo marcado fluorescentemente capaz de unirse a un epítipo no solapante de la muestra. Típicamente, se amplifican los clones enriquecidos con el rasgo fenotípico mejorado y el proceso de selección se repite para un enriquecimiento y refinamiento adicional.

Después de múltiples rondas de selección como se ha descrito anteriormente, puede determinarse la K_D , la k_d , la k_a o la actividad funcional de los compañeros de unión específicos que han formado los complejos de compañero de unión específico-analito usando técnicas rutinarias conocidas en la técnica. Por ejemplo, la K_D , la k_d o la k_a pueden determinarse usando los ensayos KinExA® o Biacore®. Los procedimientos para la determinación de la actividad funcional de un compañero de unión específico también son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, los ensayos KinExA® y Biacore®, radioinmunoensayos, inmunoensayos enzimáticos, inmunoensayos quimioluminiscentes, espectroscopia de correlación por fluorescencia, clasificación de células activadas por fluorescencia o inmunoensayo de polarización por fluorescencia. El compañero de unión específico que muestra la mejor K_D , k_d o k_a o actividad funcional en la unión al analito cuando se compara con los otros compañeros de unión específicos ensayados se considerará mejorado y permitirá seleccionar un compañero de unión específico para su desarrollo adicional, tal como para su uso en un inmunoensayo diagnóstico.

Ahora, a modo de ejemplo, y no limitante, se proporcionarán algunos ejemplos de la presente invención.

Ejemplo 1

Identificación de genes de inmunoglobulinas

Se aisló el ARN de células de hibridoma 1-60-46 anti-tacrolimus usando los kits disponibles comercialmente. El ARNm de 1-60-46 se utilizó en una reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa usando un kit de

un conjunto de cebadores de Ig de ratón adquirido en Novagen (Novagen (que es una filial de Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), N° de catálogo 69831-3) con los cebadores específicos para los genes de inmunoglobulina contenidos en el kit. Los productos resultantes de la PCR se secuenciaron y se identificaron los genes de las cadenas variable pesada y variable ligera de la inmunoglobulina (véanse las Figuras 2, 6, y 7A - 7B y las SEC ID N°: 1 - 14, 43 y 45).

Ejemplo 2

Conversión del mAb 1-60-46 de tacrolimus en un fragmento de anticuerpo de cadena individual (scFv)

Se usó un sistema de expresión de levadura para expresar las proteínas no mutadas (de tipo natural ("wt")) anti-tacrolimus (descritas más adelante en este documento) y una genoteca de proteínas anti-tacrolimus en la superficie de la levadura como una fusión con la proteína de apareamiento de levadura, AGA2 (véase Boder y Wittrup, Nature Biotechnology, 15: 553 - 557 (junio de 1997)). Se usó una extensión de solapamiento individual mediante PCR ("SOE") para combinar los genes de la variable pesada ("VH") y de la variable ligera ("VL") a través de un conector flexible con la secuencia GPAKELTPLKEAKVS (SEC ID N°: 36) para crear el constructo scFv 1-60-46 de la WT (véase la Figura 1). El gen 1-60-46 de la VH (SEC ID N°: 43) se amplificó usando los cebadores Tacro scFv VH directo - (GCGGCCCCAGCCGGCCATGGCCGAGGT-GGAATTGGTGGAGTCTGGG (SEC ID N°: 47)) y Tacro scFv VL inverso (CGCCTCCTTCAGGGGCGTCAACTC-CTTGGCGGGACCTGCAGAGACAGTGA CCAGAGTCCC (SEC ID N°: 48)). El gen 1-60-46 de la VL (SEC ID N°: 45) se amplificó usando los cebadores Tacro scFv VL directo - (AAGGAGTTGACGCCCTGAAGGAGGCGAAGGTCTCTGAT-GTTTGTATGAC CCAAACCTCCA (SEC ID N°: 49)) y Tacro scFv VL inverso - (AGACTCGAGGGCGGCCGCCGTT-TCAGCTCCAGCTTGGTCCC (SEC ID N°: 50)). El ADN del scFv 1-60-46 se clonó subsiguientemente en el vector de expresión de levadura pYD1 (Invitrogen, Carlsbad, California) usando técnicas estándar de biología molecular. Este vector incluye un promotor inducible por galactosa, una etiqueta de epítipo V5 C-terminal y marcadores de triptófano y ampicilina para la selección de EBY100 y *E. coli*, respectivamente. El vector del scFv_pYD 1-60-46 de la WT de tacrolimus se transformó en DH5α de *E. coli* y se verificó la secuencia.

El vector del scFv_pYD de la WT 1-60-46 de tacrolimus se transformó en la cepa deficiente en triptófano de *S. cerevisiae* EBY100 usando el método de Gietz y Schiestl (véase Schiestl y Gietz, Current Genetics, 16 (5 - 6): 339 - 46 (diciembre de 1989)). Las diluciones de la reacción de transformación se colocaron en placas sobre placas selectivas de glucosa (carentes de triptófano) (2% de glucosa (0,67% de base nitrogenada de levadura, 0,105% de medio complementario de Hollenberg ("HSM") - trp (triptófano) - ura (uracilo), 1,8% de agar bacteriano, 18,2% de sorbitol, 0,86% de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1,02% de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) y se incubaron a 30°C durante 48 - 72 horas. El medio selectivo de glucosa fue inoculado en las colonias individuales y se hicieron crecer con agitación a 30°C durante 16 - 20 horas. La expresión proteica se indujo en las colonias mediante la transferencia de 0,5 DO₆₀₀ de células/ml (1×10^7 ("le7cells") / 0,5 DO / ml) al medio selectivo de galactosa. Las colonias se agitaron a 20°C durante 16 - 24 horas y después se analizaron mediante citometría de flujo para comprobar la unión al antígeno de tacrolimus con un grupo de biotina unido en la posición 32 de la molécula (denominado "bt-tacro") (Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois) y anticuerpo monoclonal anti-V5 (Invitrogen, Carlsbad, California). Para los ensayos de citometría de flujo se incubaron las células de levadura que expresaban el scFv 1-60-46 con bt-tacro y anticuerpo monoclonal anti-V5 seguido de estreptavidina:fitcoeritrina (SA:PE, BD Pharmingen) e inmunoglobulina-Alexa de cabra anti-ratón Fluora 488 (GAM: 488, Molecular Probes (que es una filial de Invitrogen, Carlsbad, California)). Los diagramas bivariados de los datos de la citometría de flujo, según se muestra en la Figura 1C, ilustran la expresión completa de superficie del scFv 1-60-46 (anti-V5) y la unión (SA:PE) del scFv 1-60-46 al bt-tacro.

Ejemplo 3

Análisis de la velocidad de disociación para el scFv 1-60-46 en levadura

Se midieron las velocidades de disociación del scFv 1-60-46 y las variantes 1-60-46 en levadura mediante un 0,05 de DO de levadura saturante (1×10^6 células) con bt-tacro 100 nM (exceso molar de 10 veces) y anticuerpo anti-V5 (2,5 µg/ml) durante 30 - 60 minutos a temperatura ambiente. Las secciones se realizaron en: (a) un diluyente fisiológico (formado por disolución salina tamponada con fosfato ("PBS"), pH 7,4 y un 1% de albúmina sérica bovina ("BSA"); y (b) un diluyente de selección (formado por PBS, BSA y metanol al 10%). Después las células se lavaron dos veces y se incubaron a temperatura ambiente con un exceso molar de 100 veces de tacrolimus sin marcar (Astellas Pharma, Inc., Tokio, Japón) en un diluyente apropiado (el diluyente fisiológico o el diluyente de selección descrito anteriormente). Se extrajeron muestras individuales en diversos puntos temporales y se analizaron mediante citometría de flujo para determinar la cantidad de bt-tacro unido remanente después de la adición de los reactivos de tinción secundarios, SA:PE (dilución de 1:200) y GAM: 488 (dilución de 1:100). La Figura 1D muestra los datos de la velocidad de disociación representados como una intensidad de fluorescencia media ("MFI") frente al tiempo (segundos) (véase la Figura 1D). Se usó una ecuación de disminución de primer orden ($y = m1 * \exp(-m2 * m0) + m3$) para ajustar los datos. Se determinó que la disociación para el scFv 1-60-46 de la WT era de 1×10^{-4} (6.2×10^{-5}) /s sin metanol al 10% y 9×10^{-4} (6.2×10^{-4}) /s con metanol al 10%. La semivida del scFv 1-60-46 ($t_{1/2} = \ln(2)/k_{off}$) era de 115 min en ausencia de metanol al 10% y 13 minutos en presencia de metanol al 10%.

Ejemplo 4 (Comparativo)**Generación de genotecas mutagénicas de la CDR 1-60-46**

Las 6 CDRs del anticuerpo anti-tacrolimus 1-60-46 (véanse las Figuras 3, 4, 6, y 7A - 7B y las SEC ID N°: 2, 4, 6, 9, 11 y 13) se sometieron a una mutagénesis. Se generaron genotecas individuales formadas por 8.000 miembros, en las que 3 posiciones sucesivas de aminoácidos de las CDR se mutan aleatoriamente (véanse las Figuras 3 y 4). Debe apreciarse que la designación específica de las regiones CDR dentro de una región variable de una cadena pesada y ligera en particular pueden variar dependiendo de la convención o del sistema de numeración usado para identificar dichas regiones (por ejemplo, Chotia, Kabat, programa informático de modelado Oxford Molecular's AbM, IMGT V-quest, todos los cuales son conocidos por los expertos habituales en la técnica). Dichas designaciones, sin embargo, no son críticas. Se prepararon vectores linealizados pYD1 carentes de las regiones específicas de cada CDR mediante PCR y el "gap" fue sustituido por un oligonucleótido monocatenario degenerado que codifica para todas las 19 posibles sustituciones de aminoácidos dentro de la ventana mutagénica de 3 aminoácidos en la CDR en cuestión, usando el sistema de recombinación homóloga inherente en levadura usando el protocolo de transformación de genotecas de Gietz (véase Schiestl y Gietz, Current Genetics, 16 (5 - 6): 339 - 46 (diciembre de 1989)). Las células de levadura transformadas se recuperaron selectivamente usando un marcador de triptófano auxótrofo presente en los vectores reconstituidos. Se generó un total de 50 genotecas y están representadas esquemáticamente en las Figuras 3 y 4.

Ejemplo 5 (Comparativo)**Selección de genotecas mutagénicas de la 1-60-46**

Se usó una estrategia de clasificación de la velocidad de disociación para identificar las variantes de 1-60-46 en las 50 genotecas mutagénicas con unas características de unión mejoradas en un diluyente de selección (formado por PBS, BSA al 1% y metanol al 10%). Las genotecas individuales dentro de cada región CDR se agruparon antes de la selección (por ejemplo, se combinaron las genotecas 1 - 8 de H1 para generar una genoteca maestra de H1); sin embargo, cada genoteca maestra de CDR se mantuvo aislada del resto durante el proceso de selección. Las genotecas mutagénicas de 1-60-46 se saturaron en primer lugar con bt-tacro en el diluyente de selección a temperatura ambiente durante 20 minutos y se enfriaron en hielo durante 10 minutos. Las células se lavaron y después se incubaron a temperatura ambiente con un exceso molar de 100 veces durante 65 - 72 minutos ($5 \times t_{1/2}$ de scFv de la WT) en el diluyente de selección con objeto de seleccionar las variantes con una unión mejorada con respecto al scFv 1-60-46 de la wt parental. Después de la incubación de disociación, las células se enfriaron de nuevo, se lavaron y se marcaron. La cantidad de antígeno bt-tacro remanente en cada célula individual se detecta usando SA:PE (dilución de 1:200). La unión al antígeno se normalizó con respecto a la cantidad de expresión de scFv en cada célula individual usando mAb anti-V5 (2 µg/ml) y GaM-488 (dilución de 1:100). Se prepararon muestras de control para establecer la compensación de fluorescencia y monitorizar la unión no específica. Las muestras que se incubaron en un diluyente fisiológico (formado por PBS, pH 7,4 y BSA al 1%) también se prepararon para su comparación. Las poblaciones de variantes con las propiedades de unión deseadas se enriquecieron selectivamente usando una clasificación celular activada por fluorescencia ("FACS") en un clasificador celular FACSria (Becton Dickinson, San José, CA).

Se realizaron tres rondas de selección en cada muestra de genoteca con una genoteca representativa se muestran en la Figura 5. Cada ronda de selección consistió en clasificar selectivamente el 0,1% - 1% de las células con un mayor grado de fluorescencia en el canal de SA:PE (unión del antígeno) representado frente a la señal de expresión del scFv. Las células seleccionadas se recogieron y se volvieron a hacer crecer en un medio que contenía dextrosa (resultado de la ronda de selección), que inhibe la expresión del promotor de galactosa, evitando así la expresión del scFv, a 30°C durante 2 - 3 días. Se extraería una alícuota de cada genoteca de cada resultado de la ronda para su conservación. Entonces el resultado fue inducido para la expresión del scFv con un medio que contenía galactosa a 20°C durante 12 - 24 h y se repitió el proceso de selección. Las genotecas que contenían las mutaciones que disminuían la velocidad de disociación en el diluyente de selección se hicieron progresivamente más brillantes a lo largo de cada ronda selección (H2, L1 y L3), mientras que las genotecas que carecían de los cambios beneficiosos no lo hicieron, y no fueron analizadas adicionalmente. Se colocó en placas en medio selectivo una alícuota de células después de la tercera ronda de clasificación para obtener los clones individuales para un análisis adicional.

Ejemplo 6 (Comparativo)**Análisis de las variantes seleccionadas de 1-60-46**

Se usó una PCR para amplificar la región del scFv de varios clones individuales de cada genoteca maestra de CDR (H2, L1 y L3) que mostraba las mejoras en la unión al bt-tacro en un diluyente de selección (formado por PBS, BSA al 1% y metanol al 10%) a partir de la selección anterior. Los genes del scFv se amplificaron y se secuenciaron usando cebadores específicos del vector (pYD41 directo -TAGCATGACTGGTGGACAGC (SEC ID N°: 37) y pYD41 inverso - CGTAGAATCGAGACCGAG (SEC ID N°: 38)) para identificar las sustituciones de aminoácidos. Las

Figuras 6 y 7 destacan los resultados de la secuenciación para cada clon único obtenido.

Cada clon único fue inducido para la expresión del scFv y se evaluaron las propiedades de unión del mutante seleccionado de scFv usando una citometría de flujo. Se determinó la velocidad de disociación (k_{off}) de cada mutante según se esquematizó anteriormente tanto en presencia como en ausencia de metanol al 10% durante la reacción (véase la Figura 8). Todos los clones mutantes tenían unas mejoras de entre 2 y 8 veces en la k_{off} con respecto al scFv 1-60-46 de la WT en ambas condiciones de reacción, teniendo el mejor clon (L3-1A) una velocidad de disociación de $1,2 \times 10^{-4}$ /s en metanol al 10%.

Aquellos clones que tenían la mayor mejora en la velocidad de disociación de cada genoteca maestra de CDR fueron caracterizados adicionalmente. Se determinaron las constantes de disociación en equilibrio (K_D) para el antígeno bt-tacro tanto en (a) un diluyente fisiológico (formado por PBS, pH 7,4 y BSA al 1%); como en (b) un diluyente de selección (formado por PBS, BSA al 1% y metanol al 10%). Los clones de levadura inducidos para la expresión del scFv se mezclaron con varias concentraciones de bt-tacro (intervalo de concentración de antígeno) y se dejaron alcanzar el equilibrio (4 - 18 h) en el diluyente apropiado. Las reacciones se inactivaron en hielo, se lavaron y se marcaron para una medición por citometría de flujo según se describió previamente (véase, por ejemplo, Hawley y Hawley, eds., *Methods in Molecular Biology: Flow Cytometry Protocols*, 2ª ed., Humana Press, Totowa, NJ, páginas 311 - 332 (2004)). La intensidad de fluorescencia media de unión del anticuerpo al antígeno normalizada se representó frente a la concentración de antígeno, y se usó un ajuste no lineal de mínimos cuadrados ($y = m_1 + m_2 * m_0 / (m_3 + m_0)$) para determinar la K_D . Los mutantes contenían unas mejoras de entre 2 y 8 veces con respecto al scFv 1-60-46 de la WT, teniendo el clon de mayor afinidad (H2-1A) una $K_D = 1,3 \times 10^{-10}$ M en metanol al 10%.

Ejemplo 7 (Comparativo)

Generación y análisis de clones mutantes de combinación de 1-60-46 de tacrolimus

Se usaron los clones con la mayor mejora en la velocidad de disociación de cada genoteca maestra de CDR para construir genes de scFv que contienen diferentes pares de las mutaciones individuales. Esta metodología permitió determinar si las propiedades de unión mejoraban adicionalmente tras combinar las mutaciones individuales. Los clones de combinación que contenían varias mutaciones en las regiones de CDR H2 (H2-1A, H2-1B, H2-3B), L1 (L1-1B, L1-4A) y L3 (L3-A, L3-1A, L3-2A, L3-1B, L3-2B) se construyeron mediante una amplificación por PCR y se combinaron usando técnicas rutinarias conocidas por los expertos en la técnica. Se verificó la secuencia de los clones mutantes de combinación, y se transformaron en levaduras según se describió anteriormente para su caracterización adicional. Cada clon mutante de combinación se indujo para la expresión del scFv (según se describió previamente en este documento) y se evaluaron las propiedades de unión usando una citometría de flujo.

Se determinó la velocidad de disociación de cada clon con un diluyente de selección (formado por PBS, 1 BSA al 1% y metanol al 10%). Adicionalmente, también se analizaron varios clones en un diluyente fisiológico (formado por PBS, pH 7,4 y BSA al 1%) (véanse las Figuras 8 y 9). Muchos de los clones mutantes de combinación de 1-60-46 de tacrolimus mostraron unas mejoras mayores de 10 veces en la k_{off} , teniendo el mejor clon (H2-1A / L3-1A) una velocidad de disociación de $5,5 \times 10^{-5}$ /s en metanol al 10%, una mejora sustancial con respecto cualquiera de las mutaciones originales de 1-60-46 de tacrolimus, en general, y del clon 1-60-46 de la WT, en particular. También se determinaron las constantes de disociación en equilibrio para el antígeno bt-tacro en el diluyente de selección, según se describió previamente. La mayoría de los pares de mutaciones de combinación mostraron unas afinidades mejoradas con respecto tanto a las mutaciones originales de 1-60-46 de tacrolimus como al clon 1-60-46 de la WT (véanse las Figuras 8 y 9). El clon H2-1A / L1-1B / L3-A tenía una K_D de $3,8 \times 10^{-11}$ M.

Ejemplo 8 (Comparativo)

Clonación y expresión de anticuerpos derivados de expresión en levaduras

Se convirtieron clones seleccionados de scFv mutante de 1-60-46 de tacrolimus (véase la Figura 10) en anticuerpos Ig2a/k murinos (IgG) mediante una amplificación por PCR de los dominios variables, seguido de la ligación de estos dominios a una región constante intacta de IgG2a o a una región κ presente en el vector pBOS (Mizushima y Nagata, *Nucleic Acids Research*, 18: 5322, (1990)). Los genes de la VH mutante 1-60-46 seleccionados se amplificaron mediante PCR usando Tacro VH IgG2a directo - (TTCTTGTCGCGATTTTAAAAG-GTGTCCAGTGCGAGGTGGAATTGGTGGAGT CT (SEC ID N°: 51)) y Tacro VH IgG2a inverso - (TGTTT-TAGCGCTTGCGAGACAGTGACCAGAGT (SEC ID N°: 52)). Los genes de la VL mutante 1-60-46 se amplificaron mediante PCR usando Tacro VL mCk directo - (CCCGGCTCGCGATGCGATGTTTTGATGACCCAACT (SEC ID N°: 53)) y Tacro VL Ck inverso - (AGCATCAGCGCTCGCCCGTTTCAGCTCCAGCTT (SEC ID N°: 54)). Se transfectaron de forma transitoria plásmidos pBOS que codifican para las regiones pesada y ligera en células HEK-293 o COS, y los sobrenadantes resultantes de los cultivos celulares se purificaron en una columna de proteína A Sepharose. La IgG AM1 de 1-60-46 de tacrolimus contiene las mutaciones H2-1A, L1-1B y L3-2B. La IgG 1-60-46 de la AM2 de tacrolimus contiene las mutaciones H2-1A, L1-1B y L3-A. La IgG AM3 de 1-60-46 de tacrolimus contiene las mutaciones H2-1A y L3-2B. La IgG AM4 de 1-60-46 de tacrolimus contiene las mutaciones H2-1A, L1-1B y L3-1A. La

IgG AM5 de 1-60-46 de tacrolimus contiene las mutaciones H2-1B, L1-1B y L3-1B. La IgG purificada se dializó en disolución salina tamponada con fosfato ("PBS") y se cuantificó midiendo la absorbancia a 280 nm. Entonces los anticuerpos purificados fueron evaluados mediante un ensayo de rendimiento y unas mediciones de afinidad.

5 Ejemplo 9 (Comparativo)

Inmunoensayo de evaluación de la IgG mutante 1-60-46 de tacrolimus

Los anticuerpos de afinidad madurados anti-tacrolimus (AM1, AM2, AM3) se inmovilizaron individualmente en micropartículas paramagnéticas recubiertas con IgG anti-ratón de cabra ("GAM"). Para preparar estas partículas se acopló covalentemente la GAM a las partículas, y después las partículas se combinaron con una disolución tamponante y estabilizante que contiene un anticuerpo anti-tacrolimus. La GAM y el anti-tacrolimus formarán un complejo estable sobre la superficie de la micropartícula. Estas micropartículas paramagnéticas de anti-tacrolimus-GAM se ensayaron en un ensayo automatizado de tacrolimus usando un formato competitivo con el instrumento ARCHITECT® (Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois).

En el ensayo, el instrumento mezcla la muestra de prueba que contiene el tampón de extracción de ensayo (a saber, metanol al 90%, etilenglicol al 10% y sulfato de cinc 100 mM) con las micropartículas y el agente trazador. La molécula trazadora contiene tacrolimus unido covalentemente a acridinio a través de un conector en la posición 32 (Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois). El trazador y el tacrolimus de la muestra compiten por el número limitado de sitios de unión anti-tacrolimus en las micropartículas. Después de un periodo de incubación, las micropartículas son atraídas por un imán, y después se lavan para eliminar el material no unido. Entonces el instrumento añade disoluciones desencadenantes para iniciar la quimioluminiscencia en la porción de acridinio del trazador unido. La quimioluminiscencia se mide con un fotómetro; la cantidad de señal quimioluminiscente es inversamente proporcional a la cantidad de tacrolimus en la muestra.

La capacidad del ensayo para detectar bajas concentraciones de tacrolimus está directamente relacionada con la capacidad del tacrolimus para desplazar el trazador del anticuerpo anti-tacrolimus, que a su vez, está directamente relacionada con la afinidad del anticuerpo por el fármaco. Los resultados de la Figura 10 demuestran que, con el anticuerpo natural, una muestra con una concentración de tacrolimus de 3 ng/ml era capaz de desplazar aproximadamente el 40% del trazador. Para los tres anticuerpos de afinidad madurados (AM 1-3), los mismos 3 ng/ml de la muestra de tacrolimus produjeron un desplazamiento del 78 - 80%. Este mayor desplazamiento permitirá la detección de menores concentraciones de tacrolimus usando el anticuerpo recombinante.

35 Ejemplo 10

Determinación de la afinidad de los anticuerpos de IgG mutante 1-60-46 de tacrolimus

Se determinaron las constantes de disociación en equilibrio para las dos IgG 1-60-46 de la AM2 y IgG mAb 1-60-46 de la WT producidas a partir de la línea celular de hibridoma murino 1-60-46 usando un ensayo de exclusión cinético (KinExA®), disponible en Sapidyn Instruments (Boise, Idaho) (véase Darling y Brault, ASSAY y Drug Development Technologies, 2 (6): 647 - 657 (2004)). Se incubó una cantidad constante de anticuerpo IgG (AM2 o WT) con varias concentraciones (desde 10^{-8} M hasta 10^{-13} M) del fármaco tacrolimus (disponible comercialmente en Astellas Pharma, Inc., Tokio, Japón) y se dejaron alcanzar el equilibrio (entre 2 horas y 14 horas) antes de tomar las muestras. La cantidad de sitios de unión libres se determinó mediante la inyección de la mezcla de reacción de anticuerpo:tacrolimus sobre bt-tacro inmovilizado en una fase sólida. El anticuerpo de IgG de tacrolimus unido al bt-tacro inmovilizado sobre la fase sólida se detectó subsiguientemente mediante la inyección de conjugados de un anticuerpo policlonal anti-ratón de cabra (GAM) en un pigmento fluorescente Cy5 (GAM-Cy5). El grado de unión de GAM-Cy5 era proporcional a la cantidad de IgG de tacrolimus unida al bt-tacro inmovilizado, y se detectó después de la excitación con la longitud de onda apropiada. Se determinó la K_D mediante el análisis de la cantidad de sitios de unión libres frente a la cantidad de antígeno presente en la muestra de reacción usando el programa informático proporcionado por el fabricante (Sapidyn Instruments; Boise, Idaho). Los experimentos se realizaron en (a) un diluyente fisiológico (formado por PBS, pH 7,4 y BSA al 1%); y (b) un diluyente de selección (formado por PBS, BSA al 1% y metanol al 10%) y los resultados se resumen a continuación en la Tabla B. La K_D de la IgG 1-60-46 de la AM2 en el diluyente fisiológico era de $1,2 \times 10^{-12}$ M, que es una mejora de 16 veces con respecto al valor de la IgG 1-60-46 de la WT de $1,9 \times 10^{-11}$ M. La K_D de la IgG 1-60-46 de la AM2 en el diluyente de selección era de $1,3 \times 10^{-11}$ M que es una mejora de 12 veces con respecto al valor de la IgG 1-60-46 de la WT de $1,5 \times 10^{-10}$ M.

Tabla B

	KD (sin metanol)	Nº de veces de mejora	KD (metanol al 10%)	Nº de veces de mejora
IgG 1-60-46 de la WT	$1,9 \times 10^{-11}$ M	1 x	$1,52 \times 10^{-10}$ M	1 x
IgG 1-60-46 de la AM2	$1,2 \times 10^{-12}$ M	16 x	$1,3 \times 10^{-11}$ M	12 x

Ejemplo 11**Desarrollo de la línea celular de mamífero estable de IgG 1-60-46 de AM2 de tacrolimus**

Se transfectaron células de ovario de hámster chino con un plásmido que contenía las secuencias génicas de la cadena pesada de la IgG 1-60-46 de la AM2 de tacrolimus ("HC") (véase la Figura 11 (SEC ID N°: 39)) y de la cadena ligera de la IgG ("LC") (Figura 12 (SEC ID N°: 41)) usando técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Las líneas celulares estables se identificaron tras la restauración de la función de reductasa de dihidrofolato en un medio carente de ciertos nutrientes (véase Urlaub y col., Cell, 33: 405 - 412 (1983)). Se depositó una línea celular de ovario de hámster chino denominada CHO 2-577 1-60-46 de AM2 de tacrolimus en la American Type Culture Collection ("A.T.C.C") (Manassas, VA) según el Tratado de Budapest el 15 de marzo de 2006 y se le asignó el número de acceso de la A.T.C.C PTA-7436. Se depositó una línea celular de ovario de hámster chino denominada CHO 1-1157 1-60-46 de AM2 de tacrolimus en la A.T.C.C (Manassas, VA) según el Tratado de Budapest el 27 de marzo de 2006 y se le asignó el número de acceso de la A.T.C.C. PTA-7446.

Ejemplo 12 (Comparativo)**Identificación de los genes de la inmunoglobulina 29-56-14 de hibridoma anti-ciclosporina ("CsA") y conversión en un fragmento de anticuerpo de cadena individual (scFv)**

La Figura 16 muestra la estructura de la CsA y de un metabolito de la CsA, que se denomina en este documento "AM1 o M17". La CsA y sus metabolitos se describen con detalle en Kahan y col., "Consensus Document: Hawk's Cay Meeting on Therapeutic Drug Monitoring of Ciclosporine," Clin. Chem., 36/8: 1510 - 1516 (1990).

Los genes de la inmunoglobulina para la CsA se identificaron y se convirtieron en scFv usando los procedimientos descritos en los Ejemplos 1 y 2. Se aisló el ARN mensajero a partir de células de hibridoma de ratón 29-56-14 anti-CSA (Novartis, Basel, Suiza) usando los kits disponibles comercialmente. El ARNm del hibridoma 29-56-14 se utilizó en una reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa usando un kit de un conjunto de Ig de ratón adquirido en Novagen (Novagen (que es una filial de Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), N° de catálogo 69831-3) con los cebadores específicos para el gen de la inmunoglobulina contenidos en el kit. Los productos resultantes de la PCR se secuenciaron y se identificaron los genes de la cadena variable pesada y variable ligera de la inmunoglobulina (véanse las Figuras 13A y 13B).

Se usó un sistema de expresión de levadura para expresar las proteínas de la cadena variable ligera y pesada no mutada (natural ("WT")) y mutada anti-ciclosporina como una fusión de la proteína de apareamiento de levadura, AGA2 (véase la Figura 1B y Boder y Wittrup, Nature Biotechnology, 15: 553 - 557 (junio de 1997)). Se usó una PCR de extensión del solapamiento individual ("SOE") para combinar los genes de la variable pesada ("VH") y de la variable ligera ("VL") a través de un conector flexible con la secuencia GPAKELTPLKEAKVS (SEC ID N°: 36) para crear el constructo de scFv 29-56-14 de la WT de ciclosporina.

Se amplificó el gen de la VH 29-56-14 (Figura 13A, SEC ID N°: 55) mediante el uso de los siguientes cebadores: CsA scFv VH directo - **GGCCCAGCCGGCCATGGCCGAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGG** (SEC ID N°: 59) CsA scFv VH 40 inverso - **CTTCGCCTCCTTCAGGGGCGTCAACTCCTTGCGGGACCTGAGGAGAC GGTGACT-GAGGTTC** (SEC ID N°: 60)

Se amplificó el gen de la VL 29-56-14 (Figura 13B, SEC ID N°: 57) mediante el uso de los cebadores: CsA scFv VL 40 directo - **CAAGGAGTTGACGCCCTGAAGGAGGCGAAGGTCTCTGACATTGTACT GACCCAATCTCC** (SEC ID N°: 61) CsA scFv VL inverso - **TCTAGACTCGAGGGCGGCCCGCCGTTTGATTTCCAGGTTGGTGC** (SEC ID N°: 62).

El ADN del scFv 29-56-14 se clonó subsiguientemente en el vector de expresión de levadura pYD1 (Invitrogen, Carlsbad, California) usando técnicas estándar de biología molecular. Este vector incluye un promotor inducible por galactosa, una etiqueta de epítipo V5 C-terminal y marcadores de triptófano y ampicilina para la selección de EBY100 y *E. coli*, respectivamente. El vector del scFv_pYD 29-56-14 de la WT de ciclosporina se transformó en DH5α de *E. coli* y se verificó la secuencia.

El vector del scFv_pYD 29-56-14 de la WT de ciclosporina se transformó en la cepa deficiente en triptófano de *S. cerevisiae* EBY100 usando el método de Gietz y Schiestl (véase Schiestl y Gietz, Current Genetics, 16 (5 - 6): 339 - 46 (diciembre de 1989)). Las diluciones de la reacción de transformación se colocaron en placas sobre placas selectivas de glucosa (carentes de triptófano) (2% de glucosa (0,67% de base nitrogenada de levadura, 0,105% de medio complementario de Hollenberg ("HSM")-trp (triptófano)-ura (uracilo), 1,8% de agar bacteriano, 18,2% de sorbitol, 0,86% de NaH₂PO₄ · H₂O, 1,02% de Na₂HPO₄ · 7 H₂O)) y se incubaron a 30°C durante 48 - 72 horas. El medio selectivo de glucosa fue inoculado en las colonias individuales y se hicieron crecer con agitación a 30°C durante 16 - 20 horas. La expresión proteica se indujo en las colonias mediante la transferencia de 0,5 DO₆₀₀ de células/ml (1 x 10⁷ ("le7cells") / 0,5 DO / ml) al medio selectivo de galactosa. Las colonias se agitaron a 20°C durante

16 - 24 horas y después se analizaron mediante citometría de flujo para comprobar la unión al antígeno de ciclosporina con un grupo de biotina unido en la posición 1 del undecapéptido cíclico (denominado "bt-CsA") y anti-V5. Para los ensayos de citometría de flujo se incubaron las células de levadura que expresaban el scFv 29-56-14 con bt-CsA y anticuerpo anti-V5 seguido de estreptavidina: ficoeritrina (SA:PE, BD Pharmingen) inmunoglobulina-Alexa de cabra anti-ratón Fluora 488 (GAM: 488, Molecular Probes (que es una filial de Invitrogen, Carlsbad, California)). Se obtuvieron los diagramas bivariados de los datos de la citometría de flujo, similares a los mostrados en la Figura 1 C para ilustrar la expresión completa de superficie del scFv 29-56-14 (anti-V5) y la unión (SA:PE) del scFv 29-56-14 a la bt-CsA.

Ejemplo 13 (Comparativo):

Medición de la afinidad por la CsA del scFv 29-56-14 expresado en células de levadura

Se determinó la constante de disociación en equilibrio (K_D) para el antígeno bt-CsA en un diluyente fisiológico (formado por PBS, pH 7,4 y BSA al 1%). Los clones de levaduras inducidos para la expresión del scFv se mezclaron con varias concentraciones de bt-CsA y se dejaron alcanzar el equilibrio (4 - 18 h) en (a) un diluyente fisiológico (formado por PBS, pH 7,4 y BSA al 1%); y (b) un diluyente de selección (formado por PBS, BSA al 1% y metanol al 10%), se enfriaron en hielo, se lavaron y se marcaron para una medición por citometría de flujo. La intensidad de fluorescencia media de unión del anticuerpo al antígeno normalizada se representó frente a la concentración de antígeno y se usó un ajuste no lineal de mínimos cuadrados ($y = m_1 + m_2 * m_0 / (m_3 + m_0)$) para determinar la K_D . La K_D del scFv 29-56-14 de la CsA de la WT era de $5,6 \times 10^{-10}$ M en el diluyente fisiológico y de $2,0 \times 10^{-9}$ M en el diluyente de selección. El valor de la K_D para la bt-CsA se usó para cribar genotecas mutagénicas para comprobar la presencia de un exceso de competidor.

Ejemplo 14 (Comparativo)

Generación de genotecas mutagénicas de CDR 29-56-14

Las 6 CDRs del anticuerpo anti-ciclosporina 29-56-14 se sometieron a una mutagénesis usando el procedimiento descrito previamente en el Ejemplo 4. Las genotecas individuales formadas por 8.000 miembros, en las que 3 posiciones sucesivas de aminoácidos de las CDR se mutan aleatoriamente. Se prepararon vectores linealizados pYD1 carentes de las regiones específicas de cada CDR mediante PCR y el "gap" fue sustituido por un oligonucleótido monocatenario degenerado, que codifica para todas las 19 posibles sustituciones de aminoácidos dentro de la ventana mutagénica de 3 aminoácidos de la CDR en cuestión, usando el sistema de recombinación homóloga inherente en levadura usando el protocolo de transformación de genotecas de Gietz (Schiestl y Gietz, Current Genetics, 16 (5 - 6): 339 - 46 (diciembre de 1989)). Las células de levadura transformadas se recuperaron selectivamente usando un marcador de triptófano auxótrofo presente en los vectores reconstituídos. Se generó un total de 53 genotecas mutagénicas de CDR y las genotecas mutagénicas individuales de CDR se combinaron para generar 8 genotecas de CDR agrupadas. Las genotecas individuales dentro de cada región CDR se agruparon antes de la selección (por ejemplo, las genotecas 1 - 8 de H1 se combinaron para generar una genoteca maestra de H1); sin embargo, cada genoteca maestra de CDR se mantuvo aislada del resto durante el proceso de selección.

Ejemplo 15 (Comparativo)

Selección de genotecas mutagénicas de 29-56-14 en presencia de un competidor M17

Se usó una estrategia de selección competitiva que usa una clasificación por citometría de flujo para identificar las variantes de 29-56-14 en los 8 grupos de genotecas mutagénicas de CDR con unas características de unión mejoradas para bt-CsA en presencia de un exceso molar de 20 - 100 veces de metabolito de CsA (M17). Para la ronda inicial de cribado de la genoteca, se incubaron las genotecas mutagénicas de 29-56-14 durante una noche con bt-CsA 1 nM + M17 20 nM en un diluyente de selección (formado por PBS, BSA al 1% y metanol al 10%) a temperatura ambiente. Las células se lavaron y se detectó la cantidad remanente de antígeno bt-CsA en cada célula individual usando SA:PE (dilución de 1:200). La unión al antígeno se normalizó con respecto a la cantidad de expresión de scFv en cada célula individual usando mAb anti-V5 (2 µg/ml) y GaM-488 (dilución de 1:200). Se prepararon muestras de control para establecer la compensación de fluorescencia y monitorizar la unión no específica. Las poblaciones de variantes con una unión a bt-CsA mejorada se enriquecieron selectivamente usando una clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) en un clasificador celular FACSria (Becton Dickinson, San Jose, CA).

Se realizaron cuatro rondas de selección en cada grupo de genotecas, consistiendo cada ronda de selección en clasificar selectivamente el 0,1% - 0,5% de las células con un mayor grado de fluorescencia en el canal de SA:PE (unión del antígeno) frente a la señal de expresión del scFv. Las células seleccionadas se recogieron y se volvieron a hacer crecer en un medio que contenía dextrosa (resultado de la ronda de selección), que inhibe la expresión del promotor de galactosa, evitando así la expresión del scFv, a 30°C durante 2 - 3 días. Se extraería una alícuota de cada genoteca de cada resultado de la ronda para su conservación. Entonces el resultado fue inducido para la expresión del scFv con un medio que contenía galactosa a 20°C durante 12 - 24 h y se repitió el proceso de

selección con 100 nM (un exceso molar de 100 veces) de metabolito competidor M17. Las genotecas que contenían las mutaciones que aumentaban la unión del bt-CsA en presencia de competidor M17 se hicieron progresivamente más brillantes a lo largo de cada ronda selección. Se colocó en placas en medio selectivo una alícuota de células después de la cuarta ronda de clasificación para obtener los clones individuales para un análisis adicional.

Ejemplo 16 (Comparativo)

Análisis de la secuencia de las variantes seleccionadas 29-56-14 con una reactividad cruzada reducida con el metabolito M17

Se usó una PCR para amplificar la región del scFv de varios clones individuales de cada genoteca maestra de CDR (H1, H2, H3-1, H3-2, L1-1, L1-2, L2, y L3) que mostraba las mejoras en la unión a la bt-CsA en presencia de un exceso de metabolito M17 a partir de la selección descrita en el Ejemplo 15. Los genes del scFv se amplificaron y se secuenciaron usando cebadores específicos del vector (pYD41 directo - TAGCATGACTGGTGGACAGC (SEC ID N°: 37) y pYD41 inverso - CGTAGAATC-GAGACCGAG (SEC ID N°: 38)) para identificar las sustituciones de aminoácidos en las CDR.

Ejemplo 17 (Comparativo)

Generación y análisis de clones mutantes de combinación 29-56-14 de ciclosporina

Se usaron las secuencias mutantes de CDR que se identificaron después de cuatro rondas de selección por citometría de flujo a partir de cada genoteca maestra de CDR para construir genes de scFv que contenían diferentes pares de mutaciones individuales. Los clones de combinación que contenían varias mutaciones en las regiones de CDR H1, H2, H3, L2, y L3 fueron construidos mediante una amplificación por PCR y combinados mediante el uso de técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Se verificó la secuencia de los clones mutantes de combinación, y fueron transformados en levaduras según se describió anteriormente para una selección adicional mediante citometría de flujo en presencia del competidor M17 100 nM (un exceso molar 100 de veces), según se describió previamente en el Ejemplo 15. Sólo se requirió una ronda de clasificación competitiva para enriquecer los clones mutantes de combinación con una especificidad mejorada por la bt-CsA en presencia del metabolito M17.

Los genes del scFv se amplificaron y se secuenciaron usando cebadores específicos del vector (pYD41 directo TAGCATGACT-GGTGGACAGC (SEC ID N°: 37) y pYD41 inverso - CGTAGAATCGAGACCGAG (SEC ID N°: 38)) para identificar las múltiples sustituciones de aminoácidos de CDR. El análisis de la secuencia identificó una población que consiste sólo en cuatro combinaciones que codifican para las mutaciones en las CDRs H2, H3, L2, y L3 (véase la Figura 14). Se seleccionó el clon mutante de combinación R2-9 como el mejor clon basándose en datos de la CI50. Los clones de combinación de la WT y mutantes se incubaron durante una noche con bt-CsA 0,5 nM en presencia de unas concentraciones de competidor M17 que varían entre 0 y 5 μ M. Los datos de la CI50 para el clon R2-9 ensayado en (a) un diluyente fisiológico (formado PBS, pH 7,4 y BSA al 1%); y (b) un diluyente de selección (formado por PBS, BSA al 1% y metanol al 10%) se muestran en la Figura 15. Las mutaciones codificadas en el clon R2-9 aumentaron la CI50 para el metabolito M17 en 30 ~ 100 veces en comparación con el CsA 29-56-14 de la WT.

Ejemplo 18 (Comparativo)

Selección de genotecas mutagénicas de 29-56-14 en presencia de los competidores M17 y M1

Este ejemplo describe un procedimiento de cribado usando una expresión de levadura para seleccionar las mutaciones en la CDR (región determinante de complementariedad) codificadas por los anticuerpos anti-ciclosporina que mejoran la selección por el fármaco parental ciclosporina y reducen la especificidad por los metabolitos principales (una reactividad cruzada disminuida).

El hibridoma de ratón anti-ciclosporina 29-56-14 fue el sistema de modelo a partir del cual se expresó un constructo de cadena individual (scFv) formado por las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina, en la superficie de células de levadura. Se cribaron genotecas de levadura de scFv que codifican para mutaciones en múltiples sitios de unión al antígeno utilizando una metodología de cribado de CDR mediante citometría de flujo para comprobar la unión mejorada a la CsA biotinilada en presencia de un exceso molar de 5 ~ 200 veces de los metabolitos AM1 (M17) y AM9 (M1) juntos, como competidores de unión. Se aislaron distintos clones de levadura que codifican para mutaciones en varias CDRs de las cadenas pesada y ligera y mostraron un aumento de 1.000 veces en la Ki (constante de inhibición) para AM 1 (M17) y mayor de 5 veces en la Ki para AM9 (M1) en comparación con el control de levadura de tipo natural de CsA. Se observó un mínimo cambio en la afinidad por la CsA para los mutantes que mostraban una disminución en la unión a AM1 (M17) y AM9 (M1). Estos resultados confirman que la metodología de cribado empleada en este Ejemplo y en los precedentes establece un procedimiento mediante el cual puede desarrollarse a un anticuerpo con una especificidad mejorada por un agente inmunosupresor y una reactividad cruzada más favorable (menor unión) a los metabolitos, y utilizarse finalmente en inmunoensayos diagnósticos.

En cada caso, en este documento, cualquiera de los términos "que comprende", " que consiste esencialmente en" y

"que consiste en" puede ser intercambiados entre sí.

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> Abbott Laboratories Siegel, Robert Tyner, Joan Nakagawa; Terry
 <120> Anticuerpos de unión inmunosupresores
 <130> 8166.WO.01
 10 <160> 62
 <170> PatentIn versión 3.2
 15 <210> 1
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Murino
 20 <400> 1
 Glu Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 20 25
 25 <210> 2
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Murino
 <400> 2
 30 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met Ser
 1 5 10
 35 <210> 3
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Murino
 <400> 3
 40 Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val Ala Thr
 1 5 10 15
 45 <210> 4
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Murino
 <400> 4
 Thr Ile Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Phe
 1 5 10
 50 <210> 5
 <211> 39
 <212> PRT

ES 2 428 068 T3

<213> Murino

<400> 5

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

Lys Asn Thr Leu Ser Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Ala Asp Thr
20 25 30

Ala Met Tyr Tyr Cys Ser Arg
35

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> Murino

<400> 6

Gln Thr Asp Gly Tyr Ser Trp Phe Pro Tyr
1 5 10

<210> 7

<211> 11

<212> PRT

<213> Murino

<400> 7

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

<210> 8

<211> 23

<212> PRT

<213> Murino

<400> 8

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys
20

<210> 9

<211> 16

<212> PRT

<213> Murino

<400> 9

Lys Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Thr Gly Asn Thr Phe Leu Glu
1 5 10 15

<210> 10

<211> 15
 <212> PRT
 <213> Murino
 5 <400> 10
 Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15
 <210> 11
 10 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Murino
 <400> 11
 15 Lys Ile Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5
 <210> 12
 <211> 32
 20 <212> PRT
 <213> Murino
 <400> 12
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15
 Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ser Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30
 25 <210> 13
 <211> 9
 <212> PRT
 30 <213> Murino
 <400> 13
 Phe Gln Gly Ser His Val Pro Leu Thr
 1 5
 35 <210> 14
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Murino
 40 <400> 14
 Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala
 1 5 10
 45 <210> 15
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Murino
 50 <400> 15

Thr Ile Ser Ser Gly Gly Thr Trp Thr Phe
1 5 10

5 <210> 16
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Murino

 <400> 16

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

	<210> 17
	<211> 10
15	<212> PRT
	<213> Murino
	<400> 17

Thr Ile Ser Ser Gly Gly Lys Trp Val Phe
1 5 10

20	<210> 18
	<211> 10
	<212> PRT
	<213> Murino
25	<400> 18

Thr Ile Ser Ser Gly Gly Glu Trp Thr Phe
1 5 10

30	<210> 19
	<211> 16
	<212> PRT
	<213> Murino
35	<400> 19

Lys Ser Ser Gln Gly Ile Val His Ser Thr Gly Asn Thr Phe Leu Glu
1 5 10 15

40	<210> 20
	<211> 16
	<212> PRT
	<213> Murino
	<400> 20

Lys Ser Ser Ala Gly Ile Val His Ser Thr Gly Asn Thr Phe Leu Glu
1 5 10 15

50	<210>	21
	<211>	16
	<212>	PRT
	<213>	Murino
	<400>	21

Lys Ser Ser Gly Gly Leu Val His Ser Thr Gly Asn Thr Phe Leu Glu
1 5 10 15

5 <210> 22
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Murino

10 <400> 22

Lys Ser Ser Gln Gly Leu Val His Ser Thr Gly Asn Thr Phe Leu Glu
1 5 10 15

15 <210> 23
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Murino

<400> 23

20 Phe Gln Gly Ser His Ala Pro Leu Thr
1 5

25

<210>	24
<211>	9
<212>	PRT
<213>	Murino

<400> 24

Phe Gln Gly Ser Arg Ala Pro Leu Thr
1 5

<210> 25
<211> 9
<212> PRT
<213> Murino

<400> 25

Phe Gln Gly Ser His Asp Pro Leu Thr
1 5

40 <210> 26
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Murino

45 <400> 26

Phe Gln Gly Ser His Cys Pro Leu Thr
1 5

50 <210> 27
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Murino

<400> 27

Phe Gln Gly Ser His Ser Pro Leu Thr
1 5

5
<210> 28
<211> 9
<212> PRT
<213> Murino

10
<400> 28

Phe Gln Gly Gly Arg Cys Pro Leu Thr
1 5

15
<210> 29
<211> 9
<212> PRT
<213> Murino

20
<400> 29

Phe Gln Gly Gly Val Cys Pro Leu Thr
1 5

25
<210> 30
<211> 9
<212> PRT
<213> Murino

<400> 30

Phe Gln Gly Ser Thr Cys Pro Leu Thr
1 5

30
<210> 31
<211> 9
<212> PRT
<213> Murino

<400> 31

Phe Gln Gly Ser Lys Cys Pro Leu Thr
1 5

40
<210> 32
<211> 9
<212> PRT
<213> Murino

45
<400> 32

Phe Gln Gly Ser Ser Ser Pro Leu Thr
1 5

50
<210> 33
<211> 10
<212> PRT
<213> Murino

5 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa= Thr, Ala, Lys o Glu

10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa= Tyr o Trp

15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa= Thr o Val
 <400> 33

20 **Thr Ile Ser Ser Gly Gly Xaa Xaa Xaa Phe**
1 5 10

25 <210> 34
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Murino

30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4).. (4)
 <223> Xaa= Qln, Ala o Gly

35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa= Gln, Ala o Gly

40 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5).. (5)
 <223> Xaa= Ser o Gly

45 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa= Ile o Leu
 <400> 34

50 **Lys Ser Ser Xaa Xaa Xaa Val His Ser Thr Gly Asn Thr Phe Leu Glu**
1 5 10 15

55 <210> 35
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Murino

60 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa = Ser o Gly
 <220>

<221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa = His, Arg, Val, Thr, Lys o Ser

5

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa = Val, Ala, Asp, Cys o Ser

10

<400> 35

Phe Gln Gly Xaa Xaa Xaa Pro Leu Thr
 1 5

<210> 36
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Desconocido

20

<400> 36

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

25

<210> 37
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> Desconocido

<400> 37
 tagcatgact ggtggacagc 20

35

<210> 38
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> Desconocido

<400> 38
 cgtagaatcg agaccgag 18

45

<210> 39
 <211> 1350
 <212> ADN
 <213> Murino

50

<400> 39

gaggtggaat tgggtggagtc tgggggagac ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc	60
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agttatggca tgtcttgggt tcgccagacg	120
ccagacaaga ggctggagtg ggtcgcaacc attagtagtg gtgggtgcctg gacgttctat	180
ccagacagtg tgaaggggcg cttcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtcc	240
ctgcaaatga gcagtctgaa gtctgcagac acagccatgt attactgttc aagacagacc	300
gatggttact cctggtttcc ttattggggc caagggactc tggtcactgt ctctgcaagc	360
gctaaaacaa cagccccatc ggtctatcca ctggccccctg tgtgtggaga tacaactggc	420
tcctcggtga ctctaggatg cctgggtcaag ggttatttcc ctgagccagt gaccttgacc	480
tggaaactctg gatccctgtc cagtgggtgtg cacaccttcc cagctgtcct gcagtctgac	540
ctctacaccc tcagcagctc agtgactgta acctcgagca cctggcccag ccagtccatc	600
acctgcaatg tggcccaccc ggcaagcagc accaaggtgg acaagaaaat tgagcccaga	660
gggcccacaa tcaagccctg tcctccatgc aaatgcccag cacctaacct cttgggtgga	720
ccatccgtct tcattcttccc tccaaagatc aaggatgtac tcatgatctc cctgagcccc	780
atagtcacat gtgtggtggt ggatgtgagc gaggatgacc cagatgtcca gatcagctgg	840
tttgtgaaca acgtggaagt acacacagct cagacacaaa cccatagaga ggattacaac	900
agtactctcc ggggtggtcag tgccctcccc atccagcacc aggactggat gagtggcaag	960
gagttcaaat gcaagggtcaa caacaaagac ctcccagcgc ccatcgagag aaccatctca	1020
aaacccaaag ggtcagtaag agtccacag gtatatgtct tgcctccacc agaagaagag	1080
atgactaaga aacagggtcac tctgacctgc atgggtcacag acttcatgcc tgaagacatt	1140
tacgtggagt ggaccaacaa cgggaaaaca gagctaaact acaagaacac tgaaccagtc	1200
ctggactctg atggttctta cttcatgtac agcaagctga gagtggaaaa gaagaactgg	1260
gtggaaagaa atagctactc ctgttcagtgtgtccacgagg gtctgcacaa tcaccacacg	1320
actaagagct tctcccgac tccgggtaaa	1350

<210> 40
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> Murino

<400> 40

ES 2 428 068 T3

Glu Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ala Trp Thr Phe Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ser Arg Gln Thr Asp Gly Tyr Ser Trp Phe Pro Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

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

Tyr Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr
 130 135 140

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

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

Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser
 180 185 190

Ser Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala
 195 200 205

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

Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile
 245 250 255

Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp
 260 265 270

Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His
 275 280 285

Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg
 290 295 300

Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys
 305 310 315 320

Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

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

Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu
355 360 365

Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp
370 375 380

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

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

Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His
420 425 430

Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 41
<211> 663
<212> ADN
<213> Murino

<400> 41

gatgttttga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60

atctcttgca aatctagtca ggggttggtc catagtactg gaaacacctt tttagaatgg 120

tttttgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaaatttc caaccgattt 180

tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240

agcagagtgg agtctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaagggtc acatgctccg 300

ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaacggg cgagcgctga tgctgcacca 360

actgtatcca tcttcccacc atccagtggag cagttaacat ctggaggtgc ctcatgctg 420

tgcttcttga acaacttcta ccccaaagac atcaatgtca agtgggaagat tgatggcagt 480

gaacgacaaa atggcgctcct gaacagttgg actgatcagg acagcaaaga cagcacctac 540
 agcatgagca gcaccctcac gttgaccaag gacgagtatg aacgacataa cagctatacc 600
 tgtgaggcca ctcacaagac atcaacttca cccattgtca agagcttcaa caggaatgag 660
 tgt 663

<210> 42
 <211> 221
 <212> PRT
 <213> Murino
 <400> 42

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

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

Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser
195 200 205

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

<210> 43
<211> 357
<212> ADN
<213> Murino

<400> 43

gaggtggaat tgggtggagtc tggggggagac ttagtgaagc ctggaggggc cctgaaactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agttatggca tgtcttgggt tcgccagacg 120
ccagacaaga ggctggagtg ggtcgcaacc attagtagtg gtggtactta caccttctat 180
ccagacagtg tgaaggggagc cttcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtcc 240
ctgcaaatga gcagtctgaa gtctgcagac acagccatgt attactgttc aagacagacc 300
gatgggttact cctgggtttcc ttattggggc caagggactc tggtcactgt ctctgca 357

<210> 44
<211> 119
<212> PRT
<213> Murino

<400> 44

Glu Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Phe Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ser Arg Gln Thr Asp Gly Tyr Ser Trp Phe Pro Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 45
<211> 342
<212> ADN
<213> Murino

<400> 45

gatgttttga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60
atctcttgca aatctagtca gagcattgta catagtactg gaaacacctt tttagaatgg 120
tttttgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaaatttc caaccgattt 180
tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240
agcagagtgg agtctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaagggtc acatgttccg 300
ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaacggg cg 342

<210> 46
<211> 114
<212> PRT
<213> Murino

400> 46

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20 25 30

Thr Gly Asn Thr Phe Leu Glu Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ser Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105 110

Arg Ala

5 <210> 47
<211> 45
<212> ADN
<213> Murino

10 <400> 47
gcggcccagc cgcccatggc cgaggtggaa ttggtggagt ctggg 45

15 <210> 48
<211> 42
<212> ADN
<213> Murino

20 <400> 48
agactcgagg gcggccgccc gtttcagctc cagctgggtc cc 42

25 <210> 49
<211> 60
<212> ADN
<213> Murino

30 <400> 49
aaggagttga cggccctgaa ggaggcgaag gtctctgatg tttgatgac ccaaactcca 60

35 <210> 50
<211> 60
<212> ADN
<213> Murino

40 <400> 50
cgcctccttc aggggctgca actccttggc gggacctgca gagacagtga ccagagtccc 60

45 <210> 51
<211> 53
<212> ADN
<213> Murino

50 <400> 51
ttctgtcgc gattttaaaa ggtgtccagt gcgaggtgga attggtggag tct 53

55 <210> 52
<211> 33
<212> ADN
<213> Murino

<400> 52
tgttttagcg cttgcagaga cagtaccag agt 33

<210> 53
<211> 36
<212> ADN
<213> Murino

<400> 53
cccggtcgc gatgcgatgt ttgatgacc caaact 36

<210> 54
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Murino
 5
 <400> 54
 agcatcagcg ctcgcccgtt tcagctccag ctt 33
 10
 <210> 55
 <211> 369
 <212> ADN
 <213> Murino
 15
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(369)
 20
 <400> 55
 gag gtc cag ctg caa cag tct gga cct gac ctg gtg aag cct gga gct 48
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Asp Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 tca atg aag att tcc tgc aag gct tct ggt tac tca ttc act agc tac 96
 Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 acc ctg aac tgg gtg agg cag agc cct gga aag aac ctt gag tgg att 144
 Thr Leu Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 gga ctt att tat cct tac aat ggt ggt act aat tac aac cag aaa ttc 192
 Gly Leu Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 aac gac aag gcc aca ttt act gtg gac aag tca tcc agc aca gcc tac 240
 Asn Asp Lys Ala Thr Phe Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 atg gag ctc ctc agt ctg acg tct gag gac tct gca gtc tat tac tgt 288
 Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 gca agg gtt ggt tac tac gga act act cct tac tat gct atg gac tac 336
 Ala Arg Val Gly Tyr Tyr Gly Thr Thr Pro Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
 100 105 110
 tgg ggt caa gga acc tca gtc acc gtc tcc tca 369
 Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 25
 <210> 56
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Murino
 <400> 56

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

<210> 57
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Murino

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(339)

<400> 57

```

gac att gta ctg acc caa tct cca gct tct ttg gct gtg tct cta ggg      48
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1           5           10           15

cag agg gcc acc atc tcc tgc aga gcc agc aaa agt gtt gat tat tat      96
Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Asp Tyr Tyr
           20           25           30

ggc att agt ttt atg aac tgg ttc caa cag aaa cca gga cag cca ccc      144
Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
           35           40           45

aaa ctc ctc atc tat gct gca tcc agc caa gga tcc ggg gtc cct gcc      192
Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Gln Gly Ser Gly Val Pro Ala
           50           55           60

agg ttt agt gcc agt ggg tct ggg aca gac ttc agc ctc agc atc cat      240
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Ser Ile His
65           70           75           80

cct atg gag gag gat gat act gca atg tat ttc tgt cag cac agt aag      288
Pro Met Glu Glu Asp Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys Gln His Ser Lys
           85           90           95

gag gtt ccg tgg acg ttc ggt gga gcc acc aac ctg gaa atc aaa cgg      336
Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys Arg
           100           105           110

gcg
Ala      339

```

<210> 58
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Murino
 <400> 58

```

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Asp Tyr Tyr
           20           25           30

Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
           35           40           45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Gln Gly Ser Gly Val Pro Ala
           50           55           60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Ser Ile His
65           70           75           80

```

ES 2 428 068 T3

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

Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

Ala

5 <210> 59
<211> 42
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Organismo desconocido

15 <400> 59
ggcccagccg gccatggccg aggtccagct gcaacagtct gg 42

20 <210> 60
<211> 63
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Organismo desconocido

30 <400> 60

35 cttcgcctcc ttcaggggagc tcaactcctt ggcgggacct gaggagacgg tgactgaggt 60
tcc 63

40 <210> 61
<211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Organismo desconocido

50 <400> 61
caaggagtgt acgcccctga aggaggcgaa ggtctctgac attgtactga cccaatctcc 60

55 <210> 62
<211> 44
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Secuencia desconocida

65 <400> 62
tctagactcg agggcgcccg cccgtttgat ttccaggttg gtgc 44

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado que se une específicamente al agente inmunosupresor tacrolimus, donde dicho anticuerpo tiene un dominio pesado variable y un dominio ligero variable, comprendiendo el dominio pesado variable una región determinante de complementariedad ("CDR") 1 de cadena pesada, una CDR 2 de cadena pesada y una CDR 3 de cadena pesada, comprendiendo el dominio ligero variable una CDR 1 de cadena ligera, una CDR 2 de cadena ligera y una CDR 3 de cadena ligera, donde
 - (a) la CDR 1 de la cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos de: Gly - Phe - Thr - Phe - Ser - Ser - Tyr - Gly - Met - Ser (SEC ID N°: 2);
 - (b) la CDR 2 de la cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos con una fórmula de:

Thr - Ile - Ser - Ser - Gly - Gly - Xaa₁ - Xaa₂ - Xaa₃ - Phe (SEC ID N°: 33) donde Xaa₁ se elige de entre el grupo que consiste en treonina (Thr), alanina (Ala), lisina (Lys) y ácido glutámico (Glu); donde Xaa₂ se elige de entre el grupo que consiste en tirosina (Tyr) y triptófano (Trp); y

donde Xaa₃ se elige de entre el grupo que consiste en treonina (Thr) y valina (Val);

 - (c) la CDR 3 de la cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos de: Gln - Thr - Asp - Gly - Tyr - Ser - Trp - Phe - Pro - Tyr (SEC ID N°: 6);
 - (d) la CDR 1 de la cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos con una fórmula de:

Lys - Ser - Ser - Xaa₄ - Xaa₅ - Xaa₆ - Val - His - Ser - Thr - Gly - Asn - Thr - Phe - Leu - Glu (SEC ID N°: 34) donde Xaa₄ se elige de entre el grupo que consiste en: glutamina (Gln), alanina (Ala) y glicina (Gly); donde Xaa₅ se elige de entre el grupo que consiste en: serina (Ser) y glicina (Gly); y donde Xaa₆ se elige de entre el grupo que consiste en: isoleucina (Ile) y leucina (Leu);

 - (e) la CDR 2 de la cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos con una fórmula de:

Lys - Ile - Ser - Asn - Arg - Phe - Ser (SEC ID N°: 11); y

 - (f) la CDR 3 de la cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos con una fórmula de:

Phe - Gln - Gly - Xaa₇ - Xaa₈ - Xaa₉ - Pro - Leu - Thr (SEC ID N°: 35), donde Xaa₇ se elige de entre el grupo que consiste en: Serina (Ser) y Glicina (Gly); donde Xaa₈ se elige de entre el grupo que consiste en: histidina (His), arginina (Arg), valina (Val), treonina (Thr), lisina (Lys) y serina (Ser); y donde Xaa₉ se elige de entre el grupo que consiste en: valina (Val), alanina (Ala), ácido aspártico (Asp), cisteína (Cys) y Serina (Ser); con la condición de que si la CDR 2 de la cadena pesada Xaa₁ es Thr, Xaa₂ es Tyr y Xaa₃ es Thr y en la CDR 1 de la cadena ligera Xaa₄ es Gln, Xaa₅ es Ser y Xaa₆ es Ile, entonces en la CDR 3 de la cadena ligera Xaa₉ es distinto a Val si Xaa₇ es Ser y Xaa₈ es His, o Xaa₈ es distinto a His si Xaa₇ es Ser y Xaa₉ es Val o Xaa₇ es distinto a Ser si Xaa₈ es His y Xaa₉ es Val;

donde el anticuerpo tiene una K_D de entre 1,89 x 10⁻¹¹ M y 1,0 x 10⁻¹³ M cuando el anticuerpo no ha sido expuesto a, ni incubado con, al menos un diluyente de selección, y una K_D de entre 1,51 x 10⁻¹⁰ M y 1,0 x 10⁻¹² M cuando el anticuerpo se expone a, se incuba con, o está en presencia de, al menos un diluyente de selección.
2. Una línea celular de ovario de hámster chino elegida de entre el grupo que consiste en tacrolimus 1-60-46 AM2 CHO 2-577 con el número de acceso de la A.T.C.C. PTA-7436 y tacrolimus 1-60-46 AM2 CHO 1-1157 con el número de acceso de la A.T.C.C. PTA-7446.
3. Un anticuerpo elaborado partir del ADN extraído de una línea celular de ovario de hámster chino elegida de entre el grupo que consiste en tacrolimus 1-60-46 AM2 CHO 2-577 con el número de acceso de la A.T.C.C. PTA-7436 y tacrolimus 1-60-46 AM2 CHO 1-1157 con el número de acceso de la A.T.C.C. PTA-7446.
4. Un anticuerpo o un fragmento de unión a tacrolimus del mismo producido mediante una línea celular de ovario de hámster chino elegida de entre el grupo que consiste en tacrolimus 1-60-46 AM2 CHO 2-577 con el número de acceso de la A.T.C.C. PTA-7436 y tacrolimus 1-60-46 AM2 CHO 1-1157 con el número de acceso de la A.T.C.C. PTA-7446.
5. Un inmunoensayo diagnóstico *in vitro* para tacrolimus, donde dicho inmunoensayo comprende un anticuerpo de la reivindicación 1, 3 ó 4.
6. El inmunoensayo de la reivindicación 5, donde dicho inmunoensayo comprende un anticuerpo individual que se une específicamente al tacrolimus.
7. El inmunoensayo de la reivindicación 5, donde dicho inmunoensayo comprende adicionalmente un compañero de unión específico para el tacrolimus.

Fig. 1A

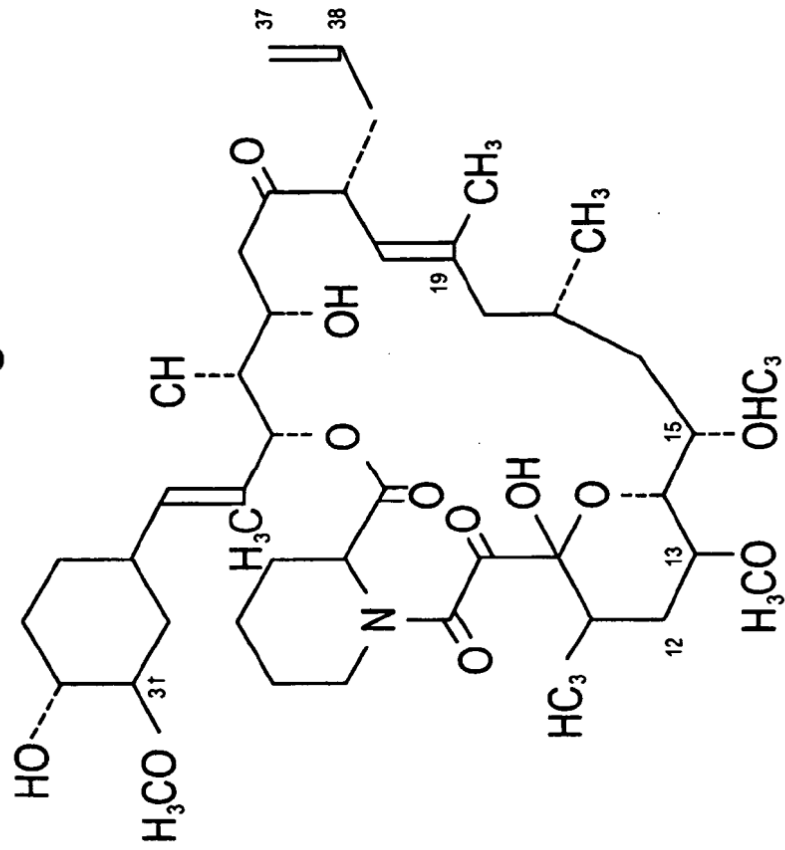


Fig. 1B

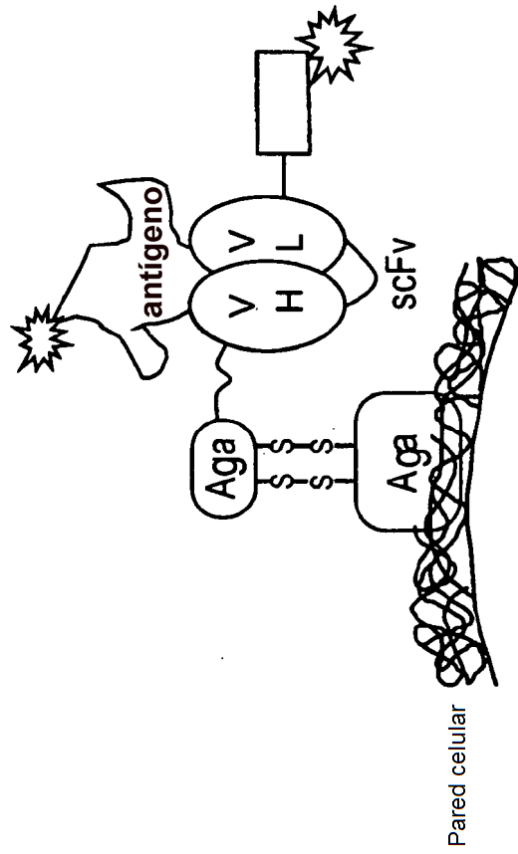


Fig. 1C

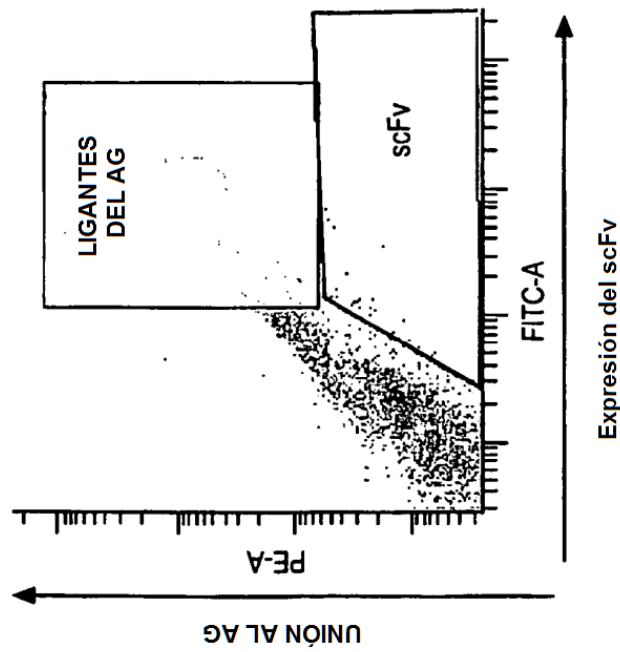


Fig. 1D

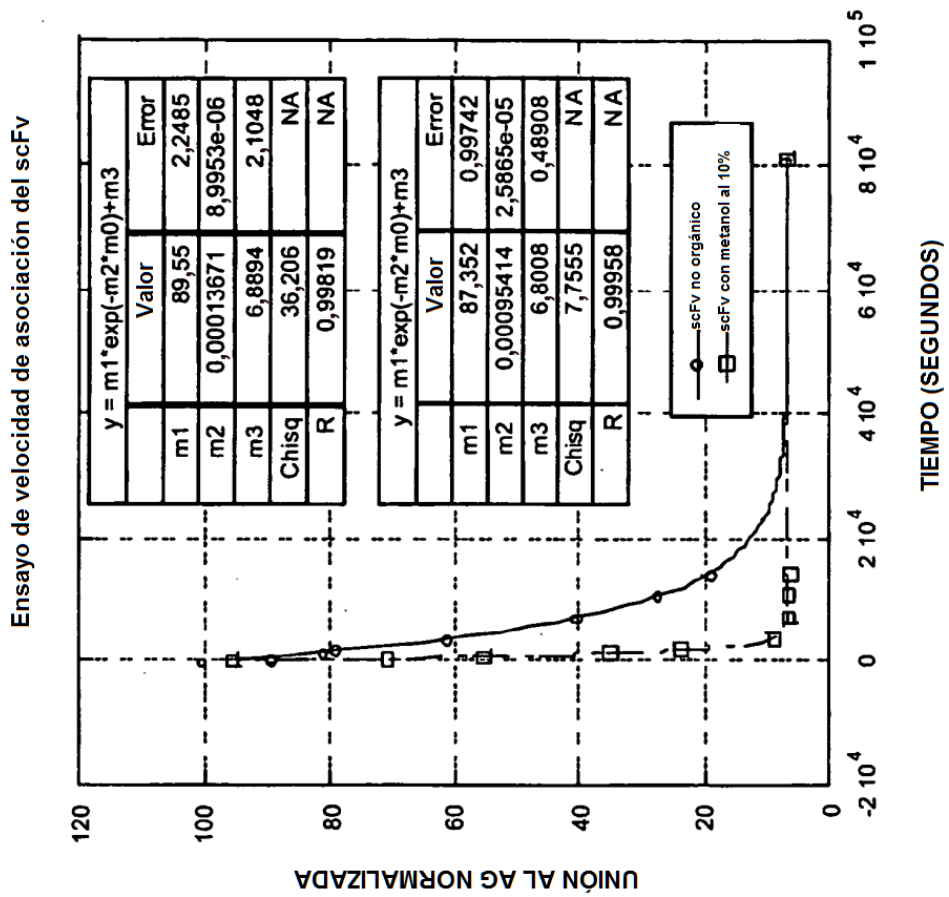


Fig. 2

2A.

GluValGlu LeuValGlu SerGlyGly AspLeuVal LysProGly GlySerLeu LysLeuSer CysAlaAla SerGlyPhe ThrPheSer
 GAGGTGGAA TTGGTGGAG TCTGGGGG GACTTAGTG AAGCCTGGA GGGTCCCTG AAACCTCTCC TGTGCAGCC TCTGGATTG ACTTTCAGT
 CTCCACCTT AACCACTC AGACCCCTT CTGAATCAC TTCGGACCT CCCAGGGAC TTTGAGAGG ACACGTCCG AGACCTAAG TGAAGTCA
 SerTyrGly MetSerTrp ValArgGln ThrProAsp LysArgLeu GluTrpVal AlaThrile SerSerGly GlyThrTyr ThrPheTyr
 AGTTATGGC ATGTCTTGG GTTCGCCAG AAGCCAGAC AAGAGGTG GAGTGGGT GCAACCATT AGTAGTGT GGTACTTAC ACCTTCTAT
 TCAATACCG TACAGAACC CAAGCGGTC TGCGGTCTG TTCTCCGAC CTCACCCAG CGTTGGTAA CCATCACC CCATGAATG TGAAGATA
 ProAspSer VallysGly ArgPheThr IleSerArg AspAsnAla LysAsnThr LysSerLeu GlnMetSer SerLeuLys SerAlaAsp
 CCAGACAGT GTGAAGGG CGCTTCACC ATCTCCAGA GACAATGCC TGTCCCTG CTGTCCTG CAAATGAGC AGTCTGAAG TCTGCAGAC
 GGTCTGTCA CACTTCCC GCGAAGTGG TAGAGGTCT CTGTACCG TTCTTGTG GACAGGGAC GTTTACTCG TCAGACTTC AGACGTCTG
 ThrAlaMet TyrTyrCys SerArgGln ThrAspGly TyrSerTrp PheProTyr TrpGlyGln GlyThrLeu ValThrVal SerAla
 ACAGCCATG TATTACTGT TCAAGACAG ACCGATGGT TACTCCTGG TTTCCTTAT TGGGGCCAA GGGACTCTG GTCACTGTC TCTGCA
 TGTCGGGTAC ATAATGACA AGTTCTGTC TGGCTACCA ATGAGGACC AAAGGAATA ACCCCGGTT CCCTGAGAC CAGTGACAG AGACGT

2B.

AspValLeu MetThrGln ThrProLeu SerLeuPro ValSerLeu GlyAspGln AlaSerile SerCysLys SerSerGln SerileVal
 GATGTTTTG ATGACCCAA ACTCCACTC TCCCTGCCT GTCAGTCTT GGAGATCAA GCCTCCATC TCTTGCAA TCTAGTCAG AGCATTGTA
 CTACAAAAC TACTGGGT TGAGGTGAG AGGGACGGA CAGTCAGAA CCTCTAGT CGGAGGTAG AGAACGTTT AGATCAGTC TCGTAACAT
 HisSerThr GlyAsnThr PheLeuGlu TrpPheLeu GlnLysPro GlyGlnSer ProLysLeu LeuileTyr LysileSer AsnArgPhe
 CATAGTACT GGAACACC TTTTATGAA TGGTTTTTG CAGAGCCA GGCCAGTCT CCAAAGCTC CTGATCTAC AAAATTTC AACCGATT
 GTATCATGA CCTTGTGG AAAATCTT ACCAAAAC GTCTCGGT CCGGTGAGA GGTTCGAG GACTAGATG TTTTAAAGG TTGGCTAAA
 SerGlyVal ProAspArg PheSerGly SerGlySer GlyThrAsp PheThrLeu LysileSer ArgValGlu SerGluAsp LeuGlyVal
 TCTGGGGTC CCAGACAGG TTCAGTGGC AGTGGATCA GGGACAGAT TTCACACTC AAGATCAGC AGAGTGGAG TCTGAGGAT CTGGGAGTT
 AGACCCCCAG GGTCTGTCC AAGTCACCG CCCTGTCTA AAGTGTGAG TTCTAGTCG TCTCACCTC AGACTCCTA GACCCCTCAA
 TyrTyrCys PheGlnGly SerHisVal ProLeuThr PheGlyAla GlyThrLys LeuGluLeu LysArgAla
 TATTACTGC TTTCAAGGT TCACATGTT CCGCTCACG TTCGGTCTT GGGACCAAG CTGAGCTG AAACGGGCG
 ATAATGACG AAAGTTCCA AGTGATCAA GCGGAGTGC AAGCCACGA CCCTGGTTC GACCTCGAC TTTCGCCCG

Fig. 3 (Comparativa)

H1	H2	H3
GFTFSSYGMS H1-1 GFT H1-2 FTF H1-3 TFS H1-4 FSS H1-5 SSY H1-6 SYG H1-7 YGM H1-8 GMS	TISSGGTYTF H2-1 TIS H2-2 ISS H2-3 SSG H2-4 SGG H2-5 GGT H2-6 GTY H2-7 TYT H2-8 YTF	QTDGYSWFPY H3-1 QTD H3-2 TDG H3-3 DGY H3-4 GYS H3-5 YSW H3-6 SWF H3-7 WFP H3-8 FPY

Fig. 4 (Comparativa)

L1	L2	L3
KISSQSIHVHSTGNTFLE	KISNRFS	FQGS HVPLT
L1-1 KIS	L2-1 KIS	L3-1 FQG
L1-2 ISS	L2-2 ISN	L3-2 QGS
L1-2 SSQ	L2-3 SNR	L3-3 GSH
L1-3 SQS	L2-4 NRF	L3-4 SHV
L1-4 QSI	L2-5 RFS	L3-5 HVP
L1-5 SIV		L3-6 VPL
L1-6 IVH		L3-7 PLT
L1-7 VHS		
L1-8 HST		
L1-9 STG		
L1-10 TGN		
L1-11 GNT		
L1-12 NTF		
L1-13 TFL		
L1-14 FLE		

(Comparativa)

Fig. 5A

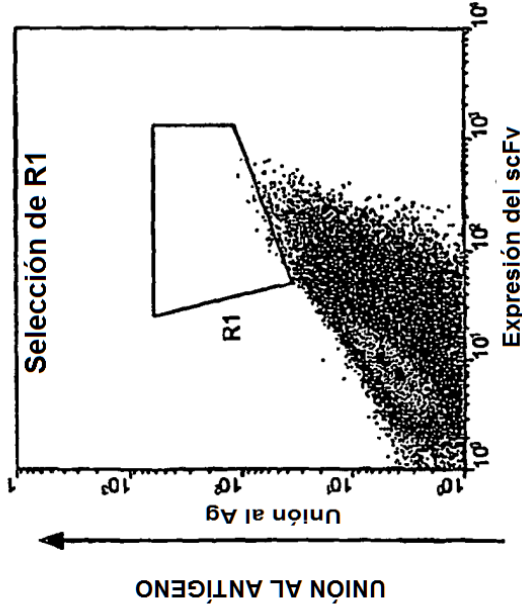


Fig. 5B

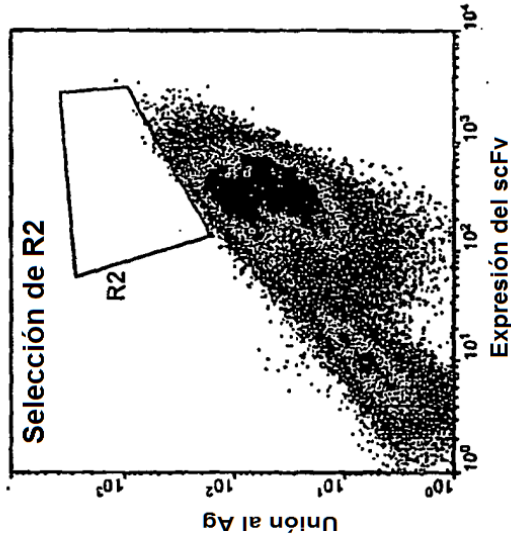
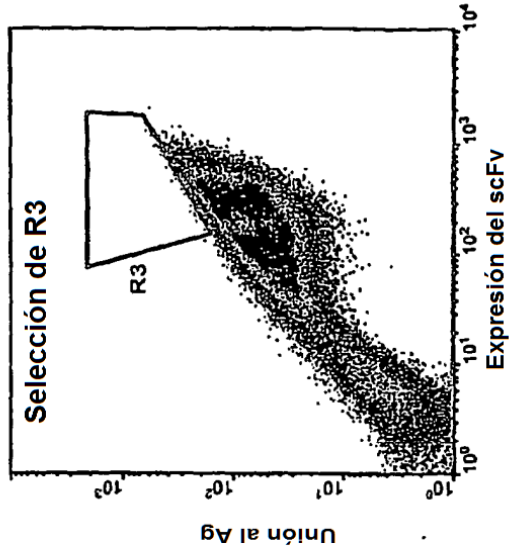


Fig. 5C



EXPRESIÓN DEL ANTICUERPO

Fig. 6 (Comparativa)

Clon	FR1	CDR-H1	FR2	CDR-H2
I-60-46 WT	EVELVESGGDLVKPGGSLKLSAAS (SEC ID N°:1)	GTFSSYGMS (SEC ID N°:2)	WVRQTPDKRLEWVAT (SEC ID N°:3)	TISSGGTYTF (SEC ID N°:4)
H2-1	EVELVESGGDLVKPGGSLKLSAAS (SEC ID N°:1)	GTFSSYGMS (SEC ID N°:2)	WVRQTPDKRLEWVAT (SEC ID N°:3)	TISSGGTWTF (SEC ID N°:15)
H2-1A	EVELVESGGDLVKPGGSLKLSAAS (SEC ID N°:1)	GTFSSYGMS (SEC ID N°:2)	WVRQTPDKRLEWVAT (SEC ID N°:3)	TISSGGAWTF (SEC ID N°:16)
H2-1B	EVELVESGGDLVKPGGSLKLSAAS (SEC ID N°:1)	GTFSSYGMS (SEC ID N°:2)	WVRQTPDKRLEWVAT (SEC ID N°:3)	TISSGGKWTF (SEC ID N°:17)
H2-3B	EVELVESGGDLVKPGGSLKLSAAS (SEC ID N°:1)	GTFSSYGMS (SEC ID N°:2)	WVRQTPDKRLEWVAT (SEC ID N°:3)	TISSGGEWTF (SEC ID N°:18)

Clon	FR3	CDR-H3	FR4
I-60-46 WT	YPDSVKGRFTISRDNNAKNTLSLQMSSLKSADTAMYICSR (SEC ID N°:5)	QTDGYSWFPPY (SEC ID N°:6)	WGQGLVTVSA (SEC ID N°:7)
H2-1	YPDSVKGRFTISRDNNAKNTLSLQMSSLKSADTAMYICSR (SEC ID N°:5)	QTDGYSWFPPY (SEC ID N°:6)	WGQGLVTVSA (SEC ID N°:7)
H2-1A	YPDSVKGRFTISRDNNAKNTLSLQMSSLKSADTAMYICSR (SEC ID N°:5)	QTDGYSWFPPY (SEC ID N°:6)	WGQGLVTVSA (SEC ID N°:7)
H2-1B	YPDSVKGRFTISRDNNAKNTLSLQMSSLKSADTAMYICSR (SEC ID N°:5)	QTDGYSWFPPY (SEC ID N°:6)	WGQGLVTVSA (SEC ID N°:7)
H2-3B	YPDSVKGRFTISRDNNAKNTLSLQMSSLKSADTAMYICSR (SEC ID N°:5)	QTDGYSWFPPY (SEC ID N°:6)	WGQGLVTVSA (SEC ID N°:7)
H2-1	YPDSVKGRFTISRDNNAKNTLSLQMSSLKSADTAMYICSR (SEC ID N°:5)	QTDGYSWFPPY (SEC ID N°:6)	WGQGLVTVSA (SEC ID N°:7)

Fig. 7A (Comparativa)

Clon	FR1	CDR-L1	FR2	CDR-L2
1-60-46 WT	DVLMTQTPLSLPVSLSLGDQASISC (SEC ID N°:8)	KSSQSIIVHSTGNTFLE (SEC ID N°:9)	WFLQKPGQSPKLLIY (SEC ID N°:10)	KISNRF (SEC ID N°:11)
L1-1	DVLMTQTPLSLPVSLSLGDQASISC (SEC ID N°:8)	KSSQGIIVHSTGNTFLE (SEC ID N°:19)	WFLQKPGQSPKLLIY (SEC ID N°:10)	KISNRF (SEC ID N°:11)
L1-2A	DVLMTQTPLSLPVSLSLGDQASISC (SEC ID N°:8)	KSSAGIIVHSTGNTFLE (SEC ID N°:20)	WFLQKPGQSPKLLIY (SEC ID N°:10)	KISNRF (SEC ID N°:11)
L1-4B	DVLMTQTPLSLPVSLSLGDQASISC (SEC ID N°:8)	KSSGGLIVHSTGNTFLE (SEC ID N°:21)	WFLQKPGQSPKLLIY (SEC ID N°:10)	KISNRF (SEC ID N°:11)
L1-1B	DVLMTQTPLSLPVSLSLGDQASISC (SEC ID N°:8)	KSSQGLIVHSTGNTFLE (SEC ID N°:22)	WFLQKPGQSPKLLIY (SEC ID N°:10)	KISNRF (SEC ID N°:11)
L3-A	DVLMTQTPLSLPVSLSLGDQASISC (SEC ID N°:8)	KSSQSIIVHSTGNTFLE (SEC ID N°:9)	WFLQKPGQSPKLLIY (SEC ID N°:10)	KISNRF (SEC ID N°:11)
L3-B	DVLMTQTPLSLPVSLSLGDQASISC (SEC ID N°:8)	KSSQSIIVHSTGNTFLE (SEC ID N°:9)	WFLQKPGQSPKLLIY (SEC ID N°:10)	KISNRF (SEC ID N°:11)
L3-C	DVLMTQTPLSLPVSLSLGDQASISC (SEC ID N°:8)	KSSQSIIVHSTGNTFLE (SEC ID N°:9)	WFLQKPGQSPKLLIY (SEC ID N°:10)	KISNRF (SEC ID N°:11)
L3-D	DVLMTQTPLSLPVSLSLGDQASISC (SEC ID N°:8)	KSSQSIIVHSTGNTFLE (SEC ID N°:9)	WFLQKPGQSPKLLIY (SEC ID N°:10)	KISNRF (SEC ID N°:11)
L3-1B	DVLMTQTPLSLPVSLSLGDQASISC (SEC ID N°:8)	KSSQSIIVHSTGNTFLE (SEC ID N°:9)	WFLQKPGQSPKLLIY (SEC ID N°:10)	KISNRF (SEC ID N°:11)
L3-1A	DVLMTQTPLSLPVSLSLGDQASISC (SEC ID N°:8)	KSSQSIIVHSTGNTFLE (SEC ID N°:9)	WFLQKPGQSPKLLIY (SEC ID N°:10)	KISNRF (SEC ID N°:11)
L3-2A	DVLMTQTPLSLPVSLSLGDQASISC (SEC ID N°:8)	KSSQSIIVHSTGNTFLE (SEC ID N°:9)	WFLQKPGQSPKLLIY (SEC ID N°:10)	KISNRF (SEC ID N°:11)
L3-3A	DVLMTQTPLSLPVSLSLGDQASISC (SEC ID N°:8)	KSSQSIIVHSTGNTFLE (SEC ID N°:9)	WFLQKPGQSPKLLIY (SEC ID N°:10)	KISNRF (SEC ID N°:11)
L3-4A	DVLMTQTPLSLPVSLSLGDQASISC (SEC ID N°:8)	KSSQSIIVHSTGNTFLE (SEC ID N°:9)	WFLQKPGQSPKLLIY (SEC ID N°:10)	KISNRF (SEC ID N°:11)
L3-2B	DVLMTQTPLSLPVSLSLGDQASISC (SEC ID N°:8)	KSSQSIIVHSTGNTFLE (SEC ID N°:9)	WFLQKPGQSPKLLIY (SEC ID N°:10)	KISNRF (SEC ID N°:11)

Fig. 7B (Comparativa)

Clon	FR3	CDR-L3	FR4
I-60-46 WT	GVPDRFSGSGGTDFTLKISRVESEDLGVYIC (SEC ID N° :12)	FQGSHPVLT (SEC ID N° :13)	FGAGTKLELKRA (SEC ID N° :14)
L1-1	GVPDRFSGSGGTDFTLKISRVESEDLGVYIC (SEC ID N° :12)	FQGSHPVLT (SEC ID N° :13)	FGAGTKLELKRA (SEC ID N° :14)
L1-2A	GVPDRFSGSGGTDFTLKISRVESEDLGVYIC (SEC ID N° :12)	FQGSHPVLT (SEC ID N° :13)	FGAGTKLELKRA (SEC ID N° :14)
L1-4B	GVPDRFSGSGGTDFTLKISRVESEDLGVYIC (SEC ID N° :12)	FQGSHPVLT (SEC ID N° :13)	FGAGTKLELKRA (SEC ID N° :14)
L1-1B	GVPDRFSGSGGTDFTLKISRVESEDLGVYIC (SEC ID N° :12)	FQGSHPVLT (SEC ID N° :13)	FGAGTKLELKRA (SEC ID N° :14)
L3-A	GVPDRFSGSGGTDFTLKISRVESEDLGVYIC (SEC ID N° :12)	FQGSHPVLT (SEC ID N° :23)	FGAGTKLELKRA (SEC ID N° :14)
L3-B	GVPDRFSGSGGTDFTLKISRVESEDLGVYIC (SEC ID N° :12)	FQGSHPVLT (SEC ID N° :24)	FGAGTKLELKRA (SEC ID N° :14)
L3-C	GVPDRFSGSGGTDFTLKISRVESEDLGVYIC (SEC ID N° :12)	FQGSHPVLT (SEC ID N° :25)	FGAGTKLELKRA (SEC ID N° :14)
L3-D	GVPDRFSGSGGTDFTLKISRVESEDLGVYIC (SEC ID N° :12)	FQGSHPVLT (SEC ID N° :26)	FGAGTKLELKRA (SEC ID N° :14)
L3-1B	GVPDRFSGSGGTDFTLKISRVESEDLGVYIC (SEC ID N° :12)	FQGSHPVLT (SEC ID N° :27)	FGAGTKLELKRA (SEC ID N° :14)
L3-1A	GVPDRFSGSGGTDFTLKISRVESEDLGVYIC (SEC ID N° :12)	FQGSHPVLT (SEC ID N° :28)	FGAGTKLELKRA (SEC ID N° :14)
L3-2A	GVPDRFSGSGGTDFTLKISRVESEDLGVYIC (SEC ID N° :12)	FQGSHPVLT (SEC ID N° :29)	FGAGTKLELKRA (SEC ID N° :14)
L3-3A	GVPDRFSGSGGTDFTLKISRVESEDLGVYIC (SEC ID N° :12)	FQGSHPVLT (SEC ID N° :30)	FGAGTKLELKRA (SEC ID N° :14)
L3-4A	GVPDRFSGSGGTDFTLKISRVESEDLGVYIC (SEC ID N° :12)	FQGSHPVLT (SEC ID N° :31)	FGAGTKLELKRA (SEC ID N° :14)
L3-2B	GVPDRFSGSGGTDFTLKISRVESEDLGVYIC (SEC ID N° :12)	FQGSHPVLT (SEC ID N° :32)	FGAGTKLELKRA (SEC ID N° :14)

Fig. 8 (Comparativa)

clon	Koff (1/s)			Mejora en la koff			KD(M)			Mejora en la KD		
	no orgánico	MeOH al 10%	no orgánico	no orgánico	MeOH al 10%	no orgánico	no orgánico	MeOH al 10%	no orgánico	no orgánico	MeOH al 10%	MeOH al 10%
WT	1,30 E-04	9,38 E-04	1,0	1,0	1,0	4,18 E-10	4,18 E-10	5,80 E-10	1,0	1,0	1,0	1,0
H2-1	5,2 E-05	4,7 E-04	2,5	2,5	2,0							
H2-1A	2,9 E-05	1,6 E-04	4,5	4,5	5,9							4,5
H2-1B	3,4 E-05	2,5 E-04	3,8	3,8	3,8			1,3 E-10	7,9			
H2-3B	3,7 E-05	1,9 E-04	3,5	3,5	4,9							
L1-2A	2,6 E-05	2,2 E-04	5,0	5,0	4,3							
L1-4A	3,3 E-05	2,3 E-04	3,9	3,9	4,1							
L1-1B	2,8 E-05	1,9 E-04	4,6	4,6	4,9		1,4 E-10	2,7 E-10	3,0		2,1	
L3-A	6,0 E-05	4,7 E-04	2,2	2,2	2,0		2,6 E-10	4,0 E-10	1,6		1,5	
L3-1A	3,5 E-05	1,2 E-04	3,7	3,7	7,8							
L3-2A	4,3 E-05	1,5 E-04	3,0	3,0	6,3							
L3-3A	5,0 E-05	1,7 E-04	2,6	2,6	5,5							
L3-A	5,0 E-05	1,9 E-04	2,6	2,6	4,9							
L3-1B	4,7 E-05	3,5 E-04	2,8	2,8	2,7							
L3-2B	4,2 E-05	3,0 E-04	3,1	3,1	3,2		2,2 E-10	3,6 E-10	1,9		1,6	
H2-1A / L1-1B / L3-1A	4,4 E-05	1,3 E-04	3,0	3,0	7,2			4,1 E-10			1,4	
H2-1A / L1-1B / L3-2B	3,9 E-05	8,5 E-05	3,3	3,3	11,1			6,1 E-11			9,5	
H2-1A / L1-1B / L3-A	2,40 E-05	7,50 E-05	5,4	5,4	12,5			3,80 E-11			15,3	
H2-1B / L1-1B / L3-1B		5,90 E-05			15,9			5,30 E-11			10,9	
H2-3B / L1-1B / L3-1B		1,00 E-04			9,4							
H2-3B / L1-4A / L3-1B		1,50 E-04			6,3							
H2-1A / L1-1B / L3-1B		6,60 E-05			14,2							
H2-1A / L3-1A	4,6 E-05	5,5 E-05	2,8	2,8	17,1			4,90 E-11			11,8	
H2-1A / L3-2B	3,90 E-05	1,20 E-04	3,3	3,3	7,8			7,4 E-11			7,8	
L1-1B / L3-1A	4,40 E-05	2,50 E-04	3,0	3,0	3,8			6,30 E-11			9,2	
L1-1B / L3-2B	4,50 E-05	2,30 E-04	2,9	2,9	4,1			1,00 E-09			0,6	
H2-3B / L3-2A		6,90 E-05			13,6			1,60 E-10			3,6	

Fig. 9A

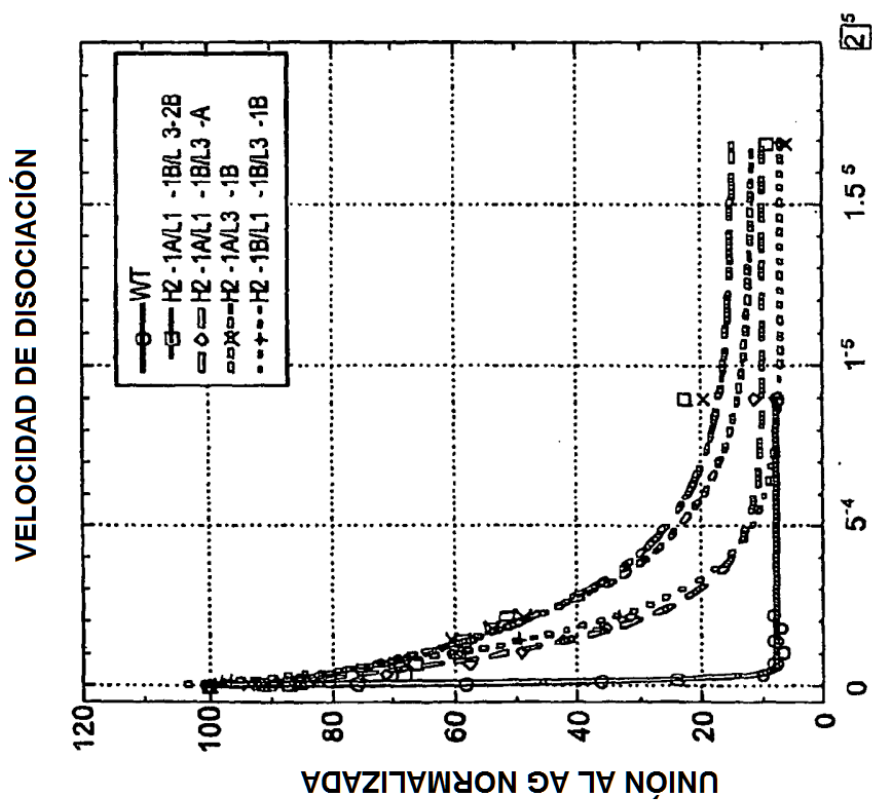


Fig. 9B

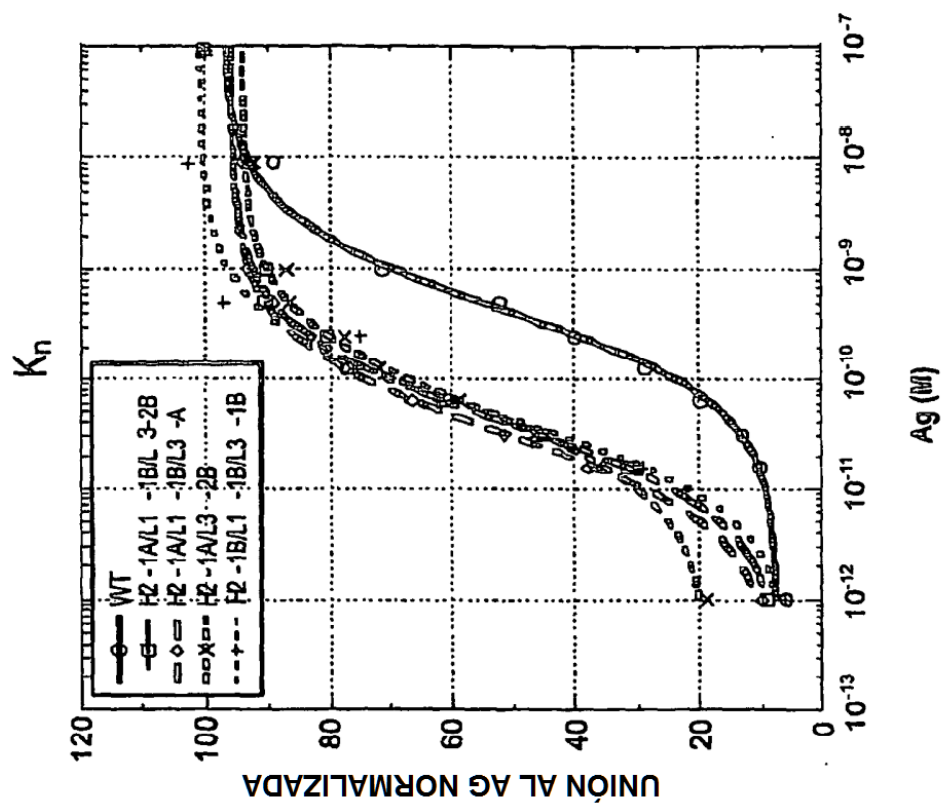


Fig. 10A

MUTACIONES	CDR-H1	CDR-H2	CDR-H3	CDR-L1	CDR-L2	CDR-L3	IGG	NOMENCLATURA
1-60-46 WT	GFTFSSYGMS	TISSGGTYTF	QTDGYSWFPY	KSSQSI VL HSSTGNTFLE	KISNRFS	FQGSHPVPLT		WT
H2-1A/L1-1B/L3-2B	GFTFSSYGMS	TISSGG AW TF	QTDGYSWFPY	KSSQGL VL HSSTGNTFLE	KISNRFS	FQGS SS SPLT		AM1
H2-1A/L1-1B/L3-A	GFTFSSYGMS	TISSGG AW TF	QTDGYSWFPY	KSSQGL VL HSSTGNTFLE	KISNRFS	FQGS HA SPLT		AM2
H2-1A/L1-1B/L3-2B	GFTFSSYGMS	TISSGG AW TF	QTDGYSWFPY	KSSQSI VL HSSTGNTFLE	KISNRFS	FQGS SS SPLT		AM3
H2-1A/L1-1B/L3-1A	GFTFSSYGMS	TISSGG AW TF	QTDGYSWFPY	KSSQGL VL HSSTGNTFLE	KISNRFS	FQGS RC SPLT		AM4
H2-1B/L1-1B/L3-1B	GFTFSSYGMS	TISSGG KW TF	QTDGYSWFPY	KSSQGL VL HSSTGNTFLE	KISNRFS	FQGS HS SPLT		AM5

Fig. 10B

INMUNOENSAYO CON TACROLIMUS CON METANOL COMO DILUYENTE

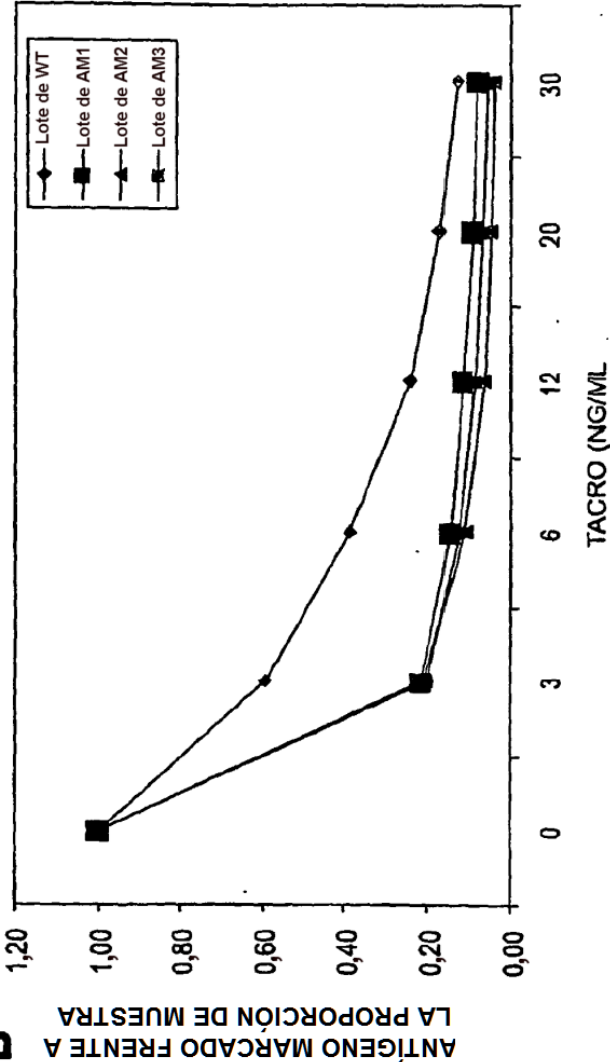


Fig. 11

GluValGlu LeuValGlu SerGlyGly AspLeuVal LysProGly GlySerLeu LysLeuSer CysAlaAla SerGlyPhe ThrPheSer
 GAGGTGGA TTGGTGGAG TCTGGGGA GACTTAGTG AAGCTGGA AAATCTCC TGTGCAGC TGTGATTG ACTTTTCTAGT
 CTCACCTT AACCACTC AGACCCCT CTGAATCAC TTCGACCT CCACGGAC TTGAGAGG ACAGCTCG AGACCTAAG TGAAGTCA
 SerTyrGly MetSerTrp ValArgGln ThrProAsp LysArgLeu GluTrpVal AlaThrLe SerSerGly GlyAlaTrp ThrPheTyr
 AGTTATGC ATGTCTGG GTTCGCCAG ACGCCAGG AAGAGCTG GACTGGTG GCAACCAT AGTAGTGT GGTGCTGG ACGTTCTAT
 TCAATACG TACAGAAC CAACGGTC TCGGCTCTG TTCTCCGAC CTCACCCAG CGTTGGTAA TCATACCA CCACGGAC TGAAGATA
 ProAspSer ValLysGly ArgPheThr IleSerArg AspAsnAla LysAsnThr LeuSerLeu GlnMetSer SerLeuLys SerAlaAsp
 CCAGACAGT GTGAAGGG CGCTTACC ATCTCCAGA GACAATGCC AAGACACG CTGTCCCTG CAATGAGC AGTCTGAAG TCTGCAGAC
 GGTCTGTCA CACTTCCC GCGAAGTG TAGAGTCT CTGTTACGG GTTCTTGG GACAGGAC GTTACTCG TCAGACTTC AGACGTCTG
 ThrAlaMet TyrTyrCys SerArgGln ThrAspGly TyrSerTrp PheProTyr TrpGlyGln GlyThrLeu ValThrVal SerAlaSer
 ACAGCCATG TATTACTGT TCAAGACAG ACCGATGGT TACTCTGG TTTCCTTAT TGGGCCAA GGACTCTG GTCAGTGT TCTGCAAGC
 TGTGGTAC ATAATGACA AGTTCTGTC TGGCTACCA ATGAGACC AAGGAATA ACCCGGTT CCCTGAGC CAGTGACAG AGAGTTCTG
 AlaLysThr ThrAlaPro SerValTyr ProLeuAla ProValCys GlyAspThr ThrGlySer SerValThr LeuGlyCys LeuValLys
 GCTAAACA ACAGCCCA TCGTCTAT CCACCTGCC CCGTGTGT GAGATACA ACTGGCTC TCGGTGACT CTAGGATG CTGGTCAAG
 CGATTTGT TGTGGGGT AGCCAGATA GGTGACCG GGACACACA CCTCTATGT TGACCGAG AGCCACTGA GATCCTACG GACCAGTTC
 GlyTyrPhe ProGluPro ValThrLeu ThrTrpAsn SerGlySer LeuSerSer GlyValHis ThrPhePro AlaValLeu GlnSerAsp
 GGTATTTC CTGAGCCA GTGACCTTG ACCTGGAAC TCTGGATC CTTGCTCAGT GGTGTGCAC ACCTCCCA GCTGTCTG CAGTCTGAC
 CCAATAAG GGACTCGT CACTGGAAC TGGACCTG AGACCTAG GACAGTCA CCACACGTG TGAAGGGT CGACAGGAC GTCAGACTG
 LeuTyrThr LeuSerSer SerValThr ValThrSer SerThrTrp ProSerGln SerIleThr CysAsnVal AlaHisPro AlaSerSer
 CTCTACAC CTCAGCAGC TCAGTGACT GTAACCTCG AGCACTCG CCAGCCAG TCCATCAC TGCATGTC GCGGCTGG GCAAGCAGC
 GAGATGGG GAGTCTCG AGTCACTGA CATGGAGC TCGTGGAC GGTGCTGTC AGGTAGTG ACCTTACAC CGGTGGGCG GTTCTGTCG
 ThrLysVal AspLysLys IleGluPro ArgGlyPro ThrLysLys ProCysPro ProCysLys CysProAla ProAsnLeu LeuGlyGly
 ACCAAGTG GACAAGAA ATTGAGCC AGAGGCCC ACAATCAAG CCTGTCTT CGCCGAAA TGGCCAGA CTTAACCTT TGGGTGGA
 TGGTTCCAC GTGTTCTT TAATCGGG TCTCCCGG GTTATGTT CGGCACAGA GGTACGTT ACCTGCTG GATTTGGAG AACCCACT
 ProSerVal PheIlePhe ProProLys IleLysAsp ValLeuMet IleSerLeu SerProIle ValThrCys ValValVal AspValSer
 CCATCCGT TCTATCTT CCTCCAAAG ATCAAGGAT GTACTCATG ATCTCCCTG AGCCCATATA GTCACTGT GTGGTGGT GATGTGAGC
 GGTAGGCAG AGTAGAAG GGAGGTTT TAGTTCTTA CATGAGTAC TAGAGGAC TCGGGGTAT CAGTGATA CACCACCAC GTACTGCG
 GluAspAsp ProAspVal GlnIleSer TrpPheVal AsnAsnVal GluValHis ThrAlaGln ThrGlnThr HisArgGlu AspTyrAsn
 GAGGATGAC CCAGATGTC CAGATCAGC TGGTTGTG AACACCGT GAAGTACAC ACAGCTCAG ACACAAAC CATAGAGG GATTACAAC
 CTCTACTG GGTCTACAG GTCTAGTCG ACCAAACAC TTGTTCAC CTTTCATGT TGTCCAGTC TGTCCAGT GTATCTCT CTAATGTTG
 SerThrLeu ArgValVal SerAlaLeu ProIleGln HisGlnAsp TrpMetSer GlyLysGlu PheLysCys LysValAsn AsnLysAsp
 AGTACTTC CGGTGGTC AGTCCCTC CCCATCCAG CACCAGGAC TGGATGAGT GGCAAGGAG TTCAATGC AAGTCAAC AACAAAGAC
 TCAAGAGG GCCCACCG TCACGGGAG GGTAGGTC ACCTACTCA CCGTTCCCT AGTTTACG TTCAGTTG TTGTTTCTG
 LeuProAla ProIleGlu ArgThrIle SerLysPro LysGlySer ValArgAla ProGlnVal TyrValLeu ProProPro GluGluGlu
 CTCCAGG CCCATCGAG AGAACATC TCANAAACC AAAGGTCA GTAAGACT CCACAGTA TAGTCTTG CTCCACCA GAAGAAGAG
 GAGGTCGC GGTAGCTC TCITGGTAG AGTTTGGG TTTCACCT CATCTCGA GGTGTCCAT ATACAGAC GGAGTGGT CTCTTCTC
 MetThrLys LysGlnVal ThrLeuThr CysMetVal ThrAspPhe MetProGlu AspIleTyr ValGluTrp ThrAsnAsn GlyLysThr
 ATGACTAAG AACAGGTC ACTTGACC TGCATGGC ACAGACTTC ATGCCTGA TCGGACTT CTGTAATC CACTTACC TGGTTGTTG CCGTTTGT
 TACTGATC TTGTCCAG TGACATGG ACGTACCAG TGCTGAAG TGCTGAGT TGTAAATG CACTTACC TGGTTGTTG CCGTTTGT
 GluLeuAsn TyrLysAsn ThrGluPro ValLeuAsp SerAspGly SerTyrPhe MetTyrSer LysLeuArg ValGluLys LysAsnTrp
 GAGCTAAC TACAGAAC ACTGAACA GTCTGGAC TCTTACTT TCTTACTT ATGTACAG ATGTACAG GTGAAAG AAGAACTGG
 CTGATTG ATGTTCTG TGACTGCT CAGGACCTG AGATACCA AAGTAAG TACATGTC TTGACTCT CACTTTTC TTCTTGACC
 ValGluArg AsnSerTyr SerCysSer ValValHis GluGlyLeu HisAsnHis HisThrThr LysSerPhe SerArgThr ProGlyLys
 GTGAAAGA AATAGTAC TCTGTTCA GTGGTCCAC GAGGTCTG CACAATCAC CACAGACT AGAGCTTC CCGGCTAA CCGGCTAA
 CACTTTCT TTATCATG AGGACAACT CACCAGGT CTCCAGAC GTGTTAGT GTGTCTGA TTCTGAAG AGGCCTGA GGCCATTT

Fig. 12

AspValLeu MetThrGln ThrProLeu SerLeuPro ValSerLeu GlyAspGln AlaSerIle SerCysLys SerSerGln GlyLeuVal
 GATGTTTGG ATGACCCAA ACTCCACTC TCCTGCCTT GTCAGTCTT GGAGATCAA GCCTCCATC TCTTGCAAA TCTAGTCAG GGGTTGGTC
 CTACAAAAC TACTGGGTT TGAGGTGAG AGGACCGA CAGTCAGAA CCTCTAGTT CGGAGGTAG AGAACGTTT AGATCAGTC CCCAACCCAG
 HisSerThr GlyAsnThr PheLeuGlu TTTTGTAG TGGTTTGT CAGAAGCCA GCCAGTCT CCAAAGCTC CTGATCTAC AAAATTTC AACCGATT
 CATAGTACT GGAACACAC CCTTTGTGG AAAAATCTT ACCAAAAAC GTCTTCGGT CCGTCCAGA GGTTCGAG GACTAGATG TTTTAAAGG TTGGCTAAA
 GTATCATGA SerGlyVal ProAspArg PheSerGly SerGlySer GlyThrAsp PheThrLeu LysIleSer ArgValGlu SerGluAsp LeuGlyVal
 TCTGGGGTC CCAGACAGG TTCAGTGGC AGTGATCA GGGACAGAT TTCACACTC AAGATCAGC AGAGTGGAG TCTGAGGAT CTGGGAGTT
 AGACCCACG GGTCTGTCC AAGTCACCG TCACCTAGT CCCTGTCTA AAGTGTGAG TTCTAGTCG TCTCACCTC AGACTCCTA GACCCCTCAA
 TyrTyrCys PheGlnGly SerHisAla ProLeuThr PheGlyAla GlyThrLys LeuGluLeu LysArgAla SerAlaAsp AlaAlaPro
 TATTACTGC TTTCAGGT TCACATGCT CCGCTCAGG TTCGGTGT TCGAGCTG GACCTCGAC TTTGCCCGC TCGCGACTA CGACGTGGT
 ATAATGACG AAAGTTCCA AGGTACGA GCGAGTGC AAGCCACGA CCTGGTTC GACCTCGAC TTTGCCCGC TCGCGACTA CGACGTGGT
 ThrValSer IlePhePro ProSerSer GluGlnLeu ThrSerGly GlyAlaSer ValValCys PheLeuAsn AsnPheTyr ProLysAsp
 ACTGTATCC ATCTTCCCA CCATCCAGT GAGCAGTTA ACATCTGGA GGTGCCTCA GTCGTGTGC TTCTTGAAC AACTTCTAC CCCAAAGAC
 TGACATAGG TAGAAGGGT GGTAGGTCA CTCGTCAAT TGTAGACCT CCACGGAGT CAGCACACG AAGAACTTG TTGAAGATG GGGTTTCTG
 IleAsnVal LysTrpLys IleAspGly SerGluArg GlnAsnGly ValLeuAsn SerTrpThr SerTrpThr AspGlnAsp SerLysAsp SerThrTyr
 ATCAATGTC AAGTGAAG ATTGATGGC AGTGAACGA CAAAATGGC GTCCTGAAC AGTTGGACT GATCAGGAC AGCAAAGAC AGCACCTAC
 TAGTTACAG TTCACCTC TAACTACCG TCACCTGCT GTTTTACCG CAGGACTTG TCAACCTGA CTAGTCTG TCGTTTCTG TCGTGGATG
 SerMetSer SerThrLeu ThrLeuThr LysAspGlu TyrGluArg HisAsnSer TyrThrCys GluAlaThr HisLysThr SerThrSer
 AGCATGAGC AGCACCCTC ACGTTGACC AAGGACGAG TATGAACGA CATAACAGC TATACCTGT GAGGCCACT CACAAGACA TCAACTTCA
 TCGTACTCG TCGTGGGAG TGCAACTGG TTCTGTGCTC ATACTGCT ATATGGACA CTCCGGTGA GTGTTCTGT AGTTGAAGT
 ProIleVal LysSerPhe AsnArgAsn GluCys
 CCCATTGTC AAGAGCTC AACAGGAAT GAGTGT
 GGGTAACAG TTCTCGAAG TTGTCCTTA CTCACA

Fig. 13 (Comparativa)**13A.**

GluValGln LeuGlnGln SerGlyPro AspLeuVal LysProGly AlaSerMet LysIleSer CysLysAla SerGlyTyr SerPheThr
 GAGGTCAC CTGCAACAG TCTGGACCT TCTGGGTG AGCCCTGGA GCTTCAATG AAGATTTC TGCAGGCT TCTGGTTAC TCATTCACT
 CTCCAGGTC GACGTTGTC AGACTGGA CTGGACCAC TTCGGACCT TTCGGACCT TCTCAAGG TCTTAAAGG ACGTCCGA AGACCAATG AGTAAGTGA
 SerTyrThr LeuAsnTyr ValArgGln SerProGly LysAsnLeu GluTyrPhe GlyLeuIle TyrProTyr AsnGlyGly ThrAsnTyr
 AGCTACACC CTGAACCTGG GTGAGGCAG AGCCCTGGA AAGAACCCT TCTTGGAA CTCACCTAA CCTGAATAA ATAGGAATG TTACCACCA TGATTAAATG
 TCGATGTGG GACTTGACC CACTCCGTC TCGGACCT TCTTGGAA CTCACCTAA CACTGAATAA ATAGGAATG TTACCACCA TGATTAAATG
 AsnGlnLys PheAsnAsp LysAlaThr PheThrVal AspLysSer SerSerThr AlaTyrMet GluLeuLeu SerLeuThr SerGluAsp
 AACCAGAAA TTCAACGAC AAGGCCACA TTTACTGTG GACAAGTCA TCCAGCACA GCCTACATG GAGCTCCTC AGTCTGACG TCTGAGGAC
 TTGGTCTTT AAGTTGCTG TCCGGTGT AAATGACAC CTGTTCACT AGGTCGTGT CCGATGTATC TCGAGGAG TCGACTGC AGACTCCTG
 SerAlaVal TyrTyrCys AlaArgVal GlyThrTyr GlyThrThr ProTyrTyr AlaMetAsp TyrTrpGly GlnGlyThr SerValThr
 TCTGCAGTC TATTACTGT GCAGGGTT GGTACTAC GGAACACT CTTACTAT CTTACTAT GCTATGGG TACTGGGT CAAGGAACC TCAGTCACC
 AGACGTCAG ATAATGACA CGTTCCCAA CCAATGATG CCTTGATGA GGAATGATA CGATACCTG ATGACCCCA GTTCCTTGG AGTCAGTGG
 ValSerSer
 GTCTCCTCA
 CAGAGGAGT

13B.

AspIleVal LeuThrGln SerProAla SerLeuAla ValSerLeu GlyGlnArg AlaThrIle SerCysArg AlaSerLys SerValAsp
 GACATTGTA CTGACCCAA TCTCCAGCT TCTTGGCT GTGTCTCTA GGGCAGAG GCCACCATC TCCTGCAGA GCCAGCAA AGTGTGAT
 CTGTAACAT GACTGGGT AGAGTCGA AGAAACCGA CACAGAGAT CCCGTCTCC CGGTGGTAG AGGACGTCT CGGTCGTTT TCACACTA
 TyrTyrGly IleSerPhe MetAsnTyr PheGlnGln LysProGly LysProPro LysLeuLeu IleTyrAla AlaSerSer GlnGlySer
 TATTATGCG ATTAGTTT ATGAACCTGG TTCCACAG AACCCACG CAGCCACC AACTCCTC ATCTATGCT GCATCCAGC CAAGGATCC
 ATAATACCG TAATCAAAA TACTGACC AAGTTGTC TTTGGTCTT GTCGGTGGG TTTGAGGAG TAGATACGA CGTAGGTCG GTTCCTAGG
 GlyValPro AlaArgPhe SerGlySer GlySerPhe ThrAspPhe SerLeuSer IleHisPro MetGluGlu AspAspThr AlaMetTyr
 GGGTCCCT GCCAGGTT AGTGCAGT GGGTCTGG ACAGACTTC AGCCTCAGC ATCCATCCT ATGGAGGAG GATGATACG GCAATGTAT
 CCCCAGGGA CGGTCCAAA TCACCGTCA CCCAGACCC TGTCTGAAG TCGGAGTCG TAGGTAGGA TACCTCCTC CTTACTATGA CGTTACATA
 PheCysGln HisSerLys GluValPro TrpThrPhe GlyGlyGly ThrAsnLeu GluIleLys ArgAla
 TTCTGTCAG CACAGTAAG GAGGTTCCG TGGAGGTC GGTGGAGGC ACCAACCTG GAAATCAAA CGGGCG
 AAGACAGTC GTGTCATTC CTCCAAGGC ACCTGCAAG CCACCTCCG TGGTTGGAC CTTTAGTTT GCCCGC

Fig. 14 (Comparativa)

Clon	CDR-H1	CDR-H2	CDR-H3
29-56-14 WT	GYSFTSYTLN	IYPYNGGTN	VGYGTPPYAMDY
R2-9 Mutante	GYSFTSYTLN	IHLPNGGTN	VGYGSPSWYYAMDY

Clon	CDR-L1	CDR-L2	CDR-L3
29-56-14 WT	RASKSVDYYGISFMN	AASSQGS	QHSKEVPWT
R2-9 Mutante	RASKSVDYYGISFMN	AASKRAS	QHSMQVPWT

Fig. 15A

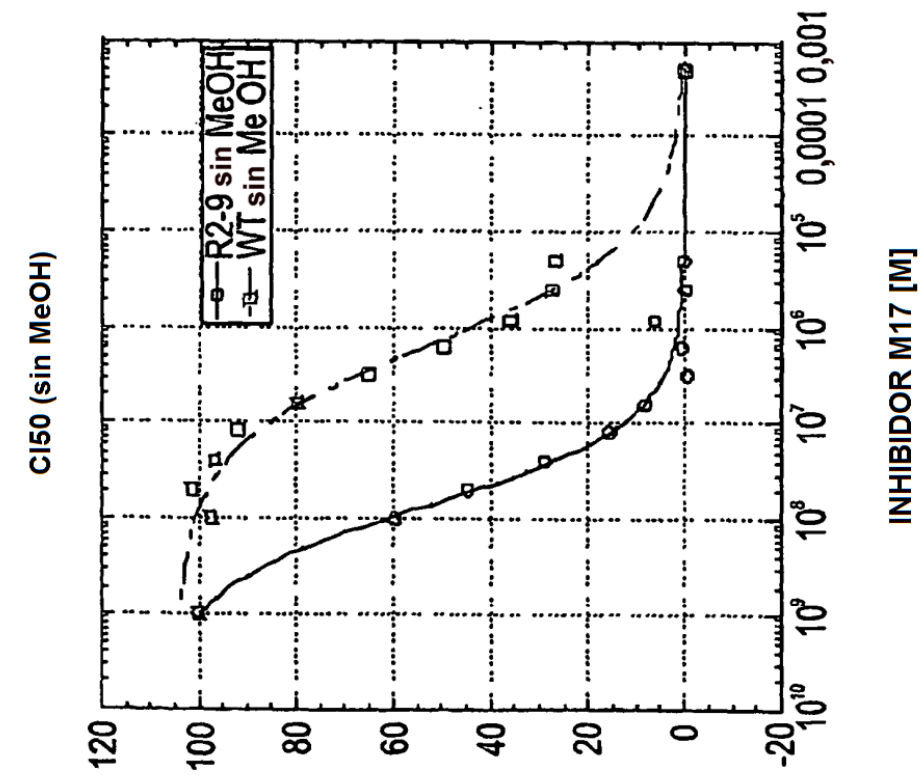


Fig. 15B

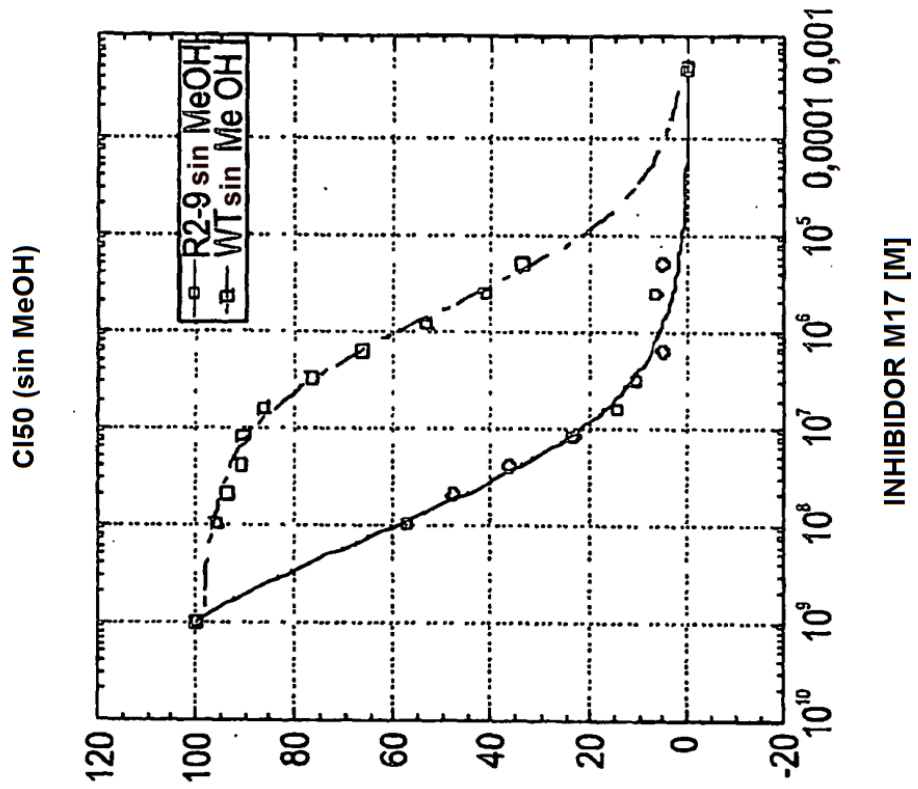


Fig. 16 (Comparativa)

