

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 525 799**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.02.2010** **E 10704731 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.10.2014** **EP 2401292**

54 Título: **Anticuerpos contra troponina I y métodos de uso de los mismos**

30 Prioridad:

24.02.2009 US 391937

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

30.12.2014

73 Titular/es:

ABBOTT LABORATORIES (100.0%)
100 Abbott Park Road
Abbott Park, IL 60064-3500 , US

72 Inventor/es:

BROPHY, SUSAN E.;
TU, BAILIN;
HUANG, DAGANG;
ZIEMANN, ROBERT N. y
TYNER, JOAN, D.

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 525 799 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 contra troponina I y métodos de uso de los mismos

5 **ANTECEDENTES DE LA PRESENTE INVENCION****Campo de la presente invención**

[0001] La presente invención se refiere a anticuerpos contra troponina I, así como métodos de uso de los mismos.

10

Información sobre antecedentes

15

[0002] La troponina I es una proteína muscular que puede utilizarse en la determinación de daño miocárdico posterior o durante, por ejemplo, un infarto de miocardio. En particular, la troponina I es una de las tres subunidades del complejo de troponina que se encuentra en el filamento delgado del aparato contráctil muscular. Este complejo tiene un papel principal en el control del proceso de la contracción muscular. Las otros dos subunidades (es decir, T y C) también se inmovilizan en los miofilamentos delgados con troponina I en tejido muscular cardíaco, así como en tejido muscular esquelético.

20

[0003] Se han descrito ensayos que miden la troponina I cardíaca en suero humano. Por ejemplo, se ha utilizado un radioensayo para este propósito (Cummins et al, Am Heart Journal 113: 1333-1344 (1987). Sin embargo, el ensayo utilizó anticuerpos policlonales que tienen una reactividad cruzada significativa con formas esqueléticas de troponina I. Además, se ha utilizado un ensayo de tipo sándwich que utiliza dos anticuerpos monoclonales diferentes (Bodar et al, Clinical Chemistry 38: 2203-2214. (1992); véase también la Patente de Estados Unidos. N° 7.285.418). Desafortunadamente, dichos ensayos tienen un grado muy alto de imprecisión. De este modo, existe ciertamente la necesidad de inmunoensayos que sean altamente específicos y sensibles a la troponina I. Estos inmunoensayos también deben utilizar anticuerpos que no posean reactividad cruzada con troponina I hallada en el tejido esquelético. En particular, se necesitan dichos inmunoensayos de manera que se pueda utilizar la terapia apropiada por el médico a cargo, proporcionando así al paciente afectado el mejor pronóstico posible.

30

[0004] En anticuerpo monoclonal 19C7 reconoce la troponina I cardíaca (Filatov V L et al., Biochemistry and Molecular Biology International 45: 1179-1187 (1998)). Se han desarrollado ensayos utilizando el anticuerpo TnI 19C7 para la detección de Troponina I (Peronnet et al., Clinica Chimica Acta 377: 243-247 (2006); solicitud de patente FR 2779526; y Katrukha et al., clinical Chemistry 44:12 (1998)).

35

DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA PRESENTE INVENCION

40

[0005] La presente descripción se refiere a proteínas de unión, particularmente anticuerpos, capaces de unirse a la troponina I cardíaca. En particular, estos anticuerpos se unen a uno o más epítopos de la troponina I. Además, la presente descripción también proporciona métodos para producir y usar estas proteínas de unión o partes de las mismas, por ejemplo, en ensayos de diagnóstico.

45

[0006] Adicionalmente, la presente descripción incluye una proteína de unión aislada que comprende un dominio de unión a antígeno que se une a la troponina I, comprendiendo dicho dominio de unión a antígeno al menos una región determinante de complementariedad (CDR) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: GYTFTDYNLH (SEQ ID NO: 52), YIYPYNGITGYNQKFKS (SEQ ID NO: 53), DAYDYDLTD (SEQ ID NO: 54), RTSKNVGTNIH (SEQ ID NO: 55), YASERLP (SEQ ID NO: 56) y QQSNNWPYT (SEQ ID NO: 57). La proteína de unión de la presente descripción puede incluir, por ejemplo, al menos 3 de estas CDRs. Además, esta proteína de unión puede comprender también un armazón o "scaffold" aceptor humano. Esta proteína de unión puede seleccionarse del grupo que consiste en, por ejemplo, una molécula de inmunoglobulina, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo injertado con CDR, un anticuerpo humanizado, un Fab, un Fab', un F(ab')₂, un Fv, un Fv unido a disulfuro, un scFv, un anticuerpo de dominio único, un diacuerpo, un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo de doble especificidad, un anticuerpo anti-idiotípico, un anticuerpo biespecífico, o un fragmento de unión al epítipo funcionalmente activo de cualquiera de estas entidades.

55

[0007] La presente descripción también abarca una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una proteína de unión, en la que la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada variable de la proteína de unión tiene al menos 70% de identidad con SEQ ID NO: 25 (véase la figura 12.). Esta molécula también puede comprender una cadena ligera variable que tiene una identidad de al menos el 70% con SEQ ID NO: 28 (ver la figura 12.).

60

[0008] Además, la presente descripción incluye una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una proteína de unión, en la que la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada variable de dicha proteína de unión es la SEQ ID NO: 25.

65

[0009] Adicionalmente, la presente descripción incluye una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una proteína de unión, en la que la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera variable de dicha proteína de unión es

la SEQ ID NO: 28. Esta molécula puede comprender además una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una cadena pesada variable, en la que la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada es la SEQ ID NO: 25.

[0010] La presente descripción también incluye un vector que comprende una o más de las moléculas de ácido nucleico descritas anteriormente, unido a un elemento regulador (por ejemplo, un promotor), así como una célula huésped que comprende este vector.

[0011] Además, la presente descripción incluye un método para producir cualquiera de las proteínas de unión descritas anteriormente, capaces de unirse a la troponina I, cuyo método comprende cultivar la célula huésped, descrita anteriormente, durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para producir la proteína de unión de interés. La descripción también incluye la proteína de unión producida mediante este método.

[0012] Además, la presente descripción abarca una composición farmacéutica que comprende uno cualquiera o más de las proteínas de unión descritas anteriormente y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

[0013] Además, la presente descripción incluye un método de detección de antígeno de troponina I en una muestra de ensayo. Este método comprende las etapas de: poner en contacto la muestra de ensayo con un anticuerpo que se une a la troponina I y comprende la SEQ ID NO: 25 durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para la formación de complejos anticuerpo/antígeno; y detectar la presencia de los complejos, la presencia de los complejos que indican la presencia de antígeno de troponina I en dicha muestra de ensayo. El anticuerpo puede comprender además la SEQ ID NO: 28. El anticuerpo se puede producir por una línea celular de ovario de hámster chino que tiene la designación del depósito ATCC PTA-9816.

[0014] La presente descripción también incluye un método de detección de antígeno de troponina I en una muestra de ensayo que comprende las etapas de: poner en contacto la muestra de ensayo con un primer anticuerpo que se une a la troponina I y comprende la SEQ ID NO: 25 durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para la formación de complejos de primer anticuerpo/antígeno; añadir un conjugado a los complejos de primer anticuerpo/antígeno, en el que dicho conjugado comprende un segundo anticuerpo unido a un compuesto generador de señales capaz de generar una señal detectable, durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para formar complejos de primer anticuerpo/antígeno/segundo anticuerpo; y detectar la presencia de una señal que se genera por el compuesto generador de señales, indicando la presencia de la señal la presencia de antígeno de troponina I en dicha muestra de ensayo. El primer anticuerpo puede comprender además la SEQ ID NO: 28 y se puede producir por una línea celular de ovario de hámster chino que tiene la designación del depósito ATCC PTA-9816.

[0015] Además, la presente descripción incluye un método de detección de antígeno de troponina I en una muestra de ensayo que comprende las etapas de: poner en contacto el antígeno de troponina I con un anticuerpo contra troponina I durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para formar complejos de antígeno de troponina I/anticuerpo, en los que el anticuerpo comprende la SEQ ID NO: 25 y está marcado con un compuesto generador de señales capaz de generar una señal detectable; añadir la muestra de ensayo a dichos complejos de antígeno de troponina I/anticuerpo durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para formar complejos antígeno de troponina I/anticuerpo/antígeno de la muestra de ensayo con troponina I; y detectar la presencia de una señal que se genera por el compuesto generador de señales, indicando la presencia de la señal la presencia de antígeno de troponina I en la muestra de ensayo. De nuevo, el anticuerpo puede comprender además la SEQ ID NO: 28 y se puede producir por una línea celular de ovario de hámster chino que tiene la designación del depósito ATCC PTA-9816.

[0016] La presente descripción también abarca otro método de detección de antígeno de troponina I en una muestra de ensayo. Este método comprende las etapas de: poner en contacto la muestra de ensayo con 1) un antígeno de referencia de troponina I, en el que el antígeno está unido a un compuesto generador de señales capaz de generar una señal detectable y 2) un anticuerpo contra el antígeno de troponina I en el que el anticuerpo comprende la SEQ ID NO: 25, durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para formar complejos de antígeno de referencia de troponina I/anticuerpo; y detectar una señal generada por el compuesto generador de señales, en el que la cantidad de antígeno de troponina I detectado en la muestra de ensayo es inversamente proporcional a la cantidad de antígeno de referencia de troponina I unido al anticuerpo. De nuevo, el anticuerpo puede comprender además la SEQ ID NO: 28 y se puede producir por una línea celular de ovario de hámster chino que tiene la designación del depósito ATCC PTA-9816.

[0017] Además, la presente descripción incluye una composición farmacéutica que comprende cualquiera uno cualquiera o más de las proteínas de unión descritas anteriormente y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

[0018] La presente descripción también abarca un método de diagnóstico del síndrome coronario agudo o infarto de miocardio en un paciente sospechoso de tener una de estas afecciones. Este método comprende las etapas de: aislar una muestra biológica del paciente; poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo que se une a la troponina I y comprende la SEQ ID NO: 25, durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para la formación de complejos de antígeno de troponina I/anticuerpo; detectar la presencia de los complejos de antígeno de troponina I/anticuerpo; disociar el antígeno de troponina I presente en los complejos del anticuerpo presente en dichos complejos; y medir la cantidad de antígeno de troponina I disociado, en el que una cantidad de antígeno de

troponina I mayor de aproximadamente 1-5 veces el valor de la Troponina I del 99º percentil de una población normal indica un diagnóstico de síndrome coronario agudo o infarto de miocardio en el paciente.

[0019] La presente descripción incluye un método de método adicional de diagnóstico del síndrome coronario agudo o infarto de miocardio en un paciente sospechoso de tener una de estas afecciones. Este método comprende las etapas de: aislar una muestra biológica del paciente; poner en contacto la muestra biológica con un primer anticuerpo que se une a la troponina I y comprende la SEQ ID NO: 25, durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para la formación de complejos antígeno de troponina I/anticuerpo; añadir un conjugado a los complejos de antígeno de troponina I/anticuerpo resultantes durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para permitir que el conjugado se una al antígeno de troponina I unido, en el que el conjugado comprende un segundo anticuerpo unido a un compuesto generador de señales capaz de generar una señal detectable; detectar la presencia de antígeno de troponina I que puede estar presente en dicha muestra biológica mediante la detección de una señal generada por dicho compuesto generador de señales; y medir la cantidad de antígeno de troponina I presente en la muestra de ensayo mediante la medición de la intensidad de la señal, indicando una cantidad de antígeno de troponina I mayor que aproximadamente 1-5 veces el valor del 99º percentil de una población normal un diagnóstico de síndrome coronario agudo o infarto de miocardio en el paciente.

[0020] La presente descripción también incluye un kit que comprende uno cualquiera o más de los anticuerpos monoclonales o proteínas de unión descritos anteriormente y, si es necesario, las instrucciones que describen la manera para utilizar este kit.

[0021] Adicionalmente, la presente descripción incluye una proteína de unión aislada que comprende un dominio de unión a antígeno, en el que el dominio de unión a antígeno comprende al menos una CDR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

CDR-VH1. X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀ (SEQ ID NO: 63), en la que:

X₁ es G;

X₂ es Y;

X₃ es T o S;

X₄ es F;

X₅ es T;

X₆ es D;

X₇ es Y;

X₈ es N;

X₉ es I o L; y

X₁₀ es H.

CDR-VH2. X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂-X₁₃-X₁₄-X₁₅-X₁₆-X₁₇ (SEQ ID NO: 64), en la que:

X₁ es Y;

X₂ es I;

X₃ es Y;

X₄ es P;

X₅ es Y;

X₆ es N;

X₇ es G;

X₈ es I;

X₉ es T;

X₁₀ es G;

X₁₁ es Y;

X₁₂ es N;

X₁₃ es Q;

X₁₄ es K;

X₁₅ es F;

X₁₆ es K; y

X₁₇ es S.

CDR-VH3. X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀ (SEQ ID NO: 65), en la que:

X₁ es D;

X₂ es A o F;

X₃ es Y;

X₄ es D;

X₅ es Y o S;

X₆ es D;

X₇ es W, Y o A;

X₈ es L;

X₉ es A o T; y

X₁₀ es Y o D.

CDR-VL1. X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀ (SEQ ID NO: 66), en la que:

X₁ es R;

X₂ es A o T;
X₃ es S;
X₄ es Q o K;
X₅ es S o N;
X₆ es I o V;
X₇ es G;
X₈ es T;
X₉ es N;
X₁₀ es I; y

X₁₁ es Y o H.
CDR-VL2. X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀ (SEQ ID NO: 67), en la que:

X₁ es Y;
X₂ es A o G;
X₃ es S o T;
X₄ es E;
X₅ es S o R;
X₆ es I, L o V; y
X₇ es S, P o F.

y
CDR-VL3. X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀ (SEQ ID NO: 68), en la que:

X₁ es Q;
X₂ es Q;
X₃ es S;
X₄ es N;
X₅ es N;
X₆ es W;
X₇ es P;
X₈ es Y; y
X₉ es T.

[0022] En base a la descripción contenida en el presente documento, la presente invención proporciona una línea celular de ovario de hámster chino (CHO), referida como TnI 19C7 AM1 hGI CHO 204, designada por el número de depósito de la American Type Culture Collection (ATCC) PTA-9816. En un aspecto relacionado, la presente invención proporciona un anticuerpo producido por dicha línea celular CHO.

[0023] En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a troponina I, que comprende una región VH y una región VL, en la que la región VH comprende:

CDR H1 que tiene la secuencia de aminoácidos GYTFTDYNLH SEQ ID NO: 52;
CDR H2 que tiene la secuencia de aminoácidos YIYPYNGITGYNQKFKS SEQ ID NO: 53; y
CDR H3 que tiene la secuencia de aminoácidos DAYDYDYLTD SEQ ID NO: 54; y en el que la región VL comprende:
CDR L1 que tiene la secuencia de aminoácidos RTSKNVGTNIH SEQ ID NO: 55;
CDR L2 que tiene la secuencia de aminoácidos YASERLP SEQ ID NO: 56; y
CDR L3 que tiene la secuencia de aminoácidos QQSNNWPYT SEQ ID NO: 57.

[0024] En un aspecto adicional, la presente invención proporciona el uso del anticuerpo o fragmento de la presente invención para detectar troponina I en una muestra biológica obtenida de un paciente.

[0025] En aún otro aspecto, la presente invención proporciona el anticuerpo o fragmento de la presente invención para usar en el diagnóstico del síndrome coronario agudo o infarto de miocardio en un paciente sospechoso de tener una de estas afecciones.

[0026] La presente invención y realizaciones de la misma se establecen en las reivindicaciones adjuntas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La figura 1 es un diagrama de flujo que muestra las etapas utilizadas para identificar y crear anticuerpos que tienen una afinidad mejorada para la troponina I.

La figura 2 es la descripción de nucleótidos (SEQ ID NO: 109 y SEQ ID NO: 110) del fragmento variable de cadena sencilla ("scFv") TnI 19C7 de tipo salvaje.

La figura 3 muestra que la levadura que expresa el fragmento variable de cadena sencilla (scFv) TnI 19C7 de longitud completa se une a troponina I de cadena sencilla (28-110 aa)-enlazador-troponina C conocido como scTnI-C-2 (Spectral Diagnostics, RP-3700). Más específicamente, esta figura muestra que la levadura que expresa TnI 19C7 scFv se incubaron con scTnI-C-2 o anti-V5, seguido de mAb anti-troponina y ficoeritrina de cabra anti-ratón

(GAM:PE) (figura 3B) o GAM:PE respectivamente (figura 3A). Los histogramas de citometría de flujo ilustran la expresión de longitud completa de TnI 19C7 scFv como se detecta por anti-V5 y la capacidad de TnI 19C7 scFv de unirse a scTnI-C-2. Unidades PE-A (eje de abscisas). 10^2 , 10^3 , 10^4 y 10^5 . Unidades de recuento (ordenadas): 10^2 , 10^3 , 10^4 y 10^5 .

La figura 4 muestra la medición off-rate (constante de disociación) de TnI 19C7 scFv. Más específicamente, la levadura que expresa TnI 19C7 scFv se incubó con una concentración saturante de scTnI-C-2. Las células se lavaron dos veces y en cada punto de tiempo, las células se transfirieron a hielo, se lavaron y se incubaron con mAb anti-TnI. Después de 30 minutos, las células se lavaron de nuevo y se incubaron con ficoeritrina de cabra anti-ratón. De nuevo, después de 30 minutos, las células se lavaron y se analizaron en el citómetro de flujo. Se utilizó una ecuación de descomposición de primer orden para ajustar los puntos de tiempo individuales donde m1 eran unidades de fluorescencia promedio máxima teórica ("MFU") en el momento 0, m2 era la off-rate ("koff"), m3 era MFU de base debido a autofluorescencia y M0, que es el tiempo x (siendo x el momento en que se está midiendo) en el que se toman las mediciones. La vida media ($t_{1/2}$) de TnI 19C7 scFv que se une a TnI-C-2 se calculó utilizando: $t_{1/2} = \ln 2/k_{off}$. Cinco veces la vida media fue el tiempo utilizado para clasificar las bibliotecas mutagénicas de CDR de TnI 19C7 scFv.

La figura 5 muestra la medición de la constante de disociación de equilibrio de TnI 19C7 scFv (KD). Más específicamente, la levadura que expresa TnI 19C7 scFv se incubó con concentraciones variables de scTnI-C-2. Las células se lavaron dos veces con PBS pH 6,8/BSA al 2%/Standapol ES-1 al 0,02% y se incubaron con mAb anti-TnI durante 30 min. Las células se lavaron de nuevo y se incubaron con ficoeritrina de cabra anti-ratón durante 30 min. Finalmente, las células se lavaron y se analizaron en el citómetro de flujo.

La figura 6 es una representación esquemática que muestra cómo se diseñaron oligonucleótidos degenerados, de manera que los cebadores se producen de tal manera que para cada residuo de nucleótido de CDR, el 70% sigue siendo el residuo de tipo salvaje y el 30% es una mezcla de los otros tres residuos. Se generan dos productos de PCR para cada biblioteca: un producto de PCR enriquecido (sp) y un producto PCR no enriquecido. Los productos de PCR enriquecido y no enriquecido se combinan para generar una biblioteca de scFv mutagenizada con CDR intacta.

La figura 7 es una representación esquemática que muestra cómo se construyó la biblioteca de scFv TnI 19C7 usando recombinación homóloga de levadura. Más específicamente, el producto de PCR enriquecido con CDR y el vector de expresión en levadura escindido se transformaron en la cepa de *S. cerevisiae* EBY100. Se seleccionaron los clones transformados en medio de glucosa con deficiencia de triptófano.

La figura 8 es un resumen que muestra los cebadores de PCR que se usaron para generar la construcción de scFv (tpVHfor a tpVLrev), los que se utilizan para generar bibliotecas enriquecido con CDR (19H1spfor a pYD41rev2) y los que se utilizan para generar la biblioteca de combinación (19FRH2for a 19FRL3) (ver SEQ ID Nos: 1-22). Las áreas en negrita y ampliadas de los cebadores representan aquellas regiones en las que se incorpora un "70% tipo salvaje, 30% mezcla de otros nucleótidos" mientras se producían los cebadores. Dicho cebador "enriquecido" generó la diversidad dentro de la biblioteca.

La figura 9 representa mediciones de la constante de disociación en equilibrio (KD) de TnI 19C7 scFv seleccionados determinadas tal como se describe anteriormente en la figura. 5.

La figura 10 muestra los resultados de la afinidad relativa del anticuerpo, medida como un 50% de antígeno (Ag50). Se convirtieron cuatro clones de TnI 19C7 en anticuerpos IgG2ak de ratón mediante clonación de los dominios variables sobre los dominios constantes de inmunoglobulina. Los anticuerpos se expresaron en un sistema transitorio de células HEK 294. La Ag50 es la concentración de scTnI-C en la que es el 50% de la señal máxima y representa la clasificación de la afinidad relativa de los candidatos TnI 19C7 AM seleccionados. TnI 19C7 AM1 ejemplifica la afinidad relativa más estrecha en comparación con el anticuerpo TnI 19C7 de tipo salvaje.

La figura 11 ilustra la capacidad de TnI 19C7 AM1 para unirse a scTnI-C en un formato de ensayo ARCHITECT® (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). TnI 19C7 se marcó con acridinio y se ensayó para la unión a scTnI-C usando partículas de captura anti-TnI. (X = señal generada con la concentración del calibrador determinado de scTnI-C, X/A = relación de la señal X del calibrador con respecto a la señal A del calibrador; RLU = unidades relativas de luz). TnI 19C7 AM1 mostró una mejor unión en este formato de ensayo para el conjunto de calibradores en comparación con el anticuerpo TnI 19C7 de tipo salvaje.

La figura 12 ilustra las secuencias de nucleótidos (SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 (complemento), SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 27 (complemento)) y las secuencias de aminoácidos codificadas de las cadenas pesada (SEQ ID NO: 25) y ligera (SEQ ID NO: 28) de anticuerpo monoclonal 19C7 TnI AM1 y, en particular, de las regiones determinantes de complementariedad (CDR).

La figura 13 ilustra las posiciones dentro de las cadenas pesada y ligera de las CDR de TnI 19C7 que pueden estar sustituidos por aminoácidos distintos de los que se muestran en la figura. 12 (-SEQ ID Nos: 29-49).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA PRESENTE INVENCION

[0028] A menos que se defina lo contrario en el presente documento, los términos científicos y técnicos utilizados en relación con la presente invención tendrán los significados que se entienden habitualmente por los expertos en la materia. El significado y el alcance de los términos deben ser claros; sin embargo, en el caso de cualquier ambigüedad latente, las definiciones proporcionadas en este documento tienen prioridad sobre cualquier definición de diccionario o extrínseca. Además, a menos que sea requerido por el contexto, los términos en singular incluirán pluralidades y los términos en plural incluirán el singular. En esta solicitud, el uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique lo contrario. Además, el uso del término "que incluye", así como otras formas, tales como "incluye" "incluido", no es limitante. Además, términos, tales como "elemento" o "componente" abarcan los elementos y componentes que comprenden una unidad y los elementos y componentes que comprenden más de una subunidad a menos que se especifique lo contrario.

[0029] Generalmente, las nomenclaturas utilizadas en relación con, y las técnicas de, cultivo de células y tejidos, biología molecular, inmunología, microbiología, genética y química de proteínas y de ácidos nucleicos e hibridación descritas en este documento son las conocidas y habitualmente utilizadas en la técnica. Los métodos y técnicas de la presente invención se realizan generalmente de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y tal como se describen en diversas referencias generales y más específicas que se citan y discuten a lo largo de la presente memoria descriptiva a menos que se indique lo contrario. Las reacciones enzimáticas y técnicas de purificación se realizan según las especificaciones del fabricante, tal como se llevan a cabo habitualmente en la técnica o tal como se describen en el presente documento. Las nomenclaturas utilizadas en relación con, y los procedimientos y técnicas de laboratorio de, química analítica, química orgánica sintética, y química médica y farmacéutica descritas en el presente documento son bien conocidas y habitualmente utilizadas en la técnica. Se utilizan técnicas estándar para la síntesis química, análisis químico, preparación farmacéutica, formulación, y administración, y tratamiento de los pacientes.

[0030] A fin de que la presente invención pueda entenderse más fácilmente, se definen a continuación términos seleccionados.

[0031] El término "polipéptido", tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier cadena polimérica de aminoácidos. Los términos "péptido" y "proteína" se usan de forma intercambiable con el término polipéptido y también se refieren a una cadena polimérica de aminoácidos. El término "polipéptido" abarca proteínas nativas o artificiales, fragmentos de proteínas y análogos polipeptídicos de una secuencia de proteína. Un polipéptido puede ser monomérico o polimérico.

[0032] El término "proteína aislada" o "polipéptido aislado" es una proteína o polipéptido que en virtud de su origen o fuente de derivación no está asociado con componentes asociados de forma natural que lo acompañan en su estado nativo; está sustancialmente libre de otras proteínas de la misma especie; se expresa por una célula de una especie diferente; o no tiene lugar en la naturaleza. Por lo tanto, un polipéptido que se sintetiza químicamente o se sintetiza en un sistema celular diferente de la célula de la que se origina de forma natural estará "aislado" de sus componentes asociados de forma natural. Una proteína también puede volverse sustancialmente libre de componentes asociados de forma natural mediante aislamiento, usando técnicas de purificación de proteínas bien conocidas en la técnica.

[0033] El término "recuperación", tal como se usa en el presente documento, se refiere al proceso de hacer que una especie química, tal como un polipéptido, esté sustancialmente libre de componentes asociados de forma natural mediante aislamiento, por ejemplo, usando técnicas de purificación de proteínas bien conocidas en la técnica.

[0034] La descripción también incluye secuencias de nucleótidos aisladas (o fragmentos de las mismas) que codifican las cadenas ligera y pesada variables de los anticuerpos descritos en el presente documento, así como aquellas secuencias de nucleótidos (o fragmentos de las mismas) que tienen secuencias que comprenden, corresponden a, son idénticas a, se hibridan a, o son complementarias a, al menos, aproximadamente el 70% (por ejemplo, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78% ó 79%), preferiblemente al menos aproximadamente el 80% (por ejemplo, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88% ó 89%), y más preferiblemente al menos aproximadamente el 90% (por ejemplo, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ó 100%) de identidad de estas secuencias de nucleótidos codificantes. (Todos los números enteros (y partes de los mismos) entre e incluyendo el 70% y el 100% se consideran dentro del alcance de la presente descripción con respecto al porcentaje de identidad). Dichas secuencias pueden derivar de cualquier fuente (por ejemplo, pueden aislarse de una fuente natural, producirse a través de una ruta semi-sintética, o sintetizarse de novo). En particular, dichas secuencias pueden aislarse o derivarse de fuentes distintas a las descritas en los ejemplos (por ejemplo, bacterias, hongos, algas, ratón o humanos).

[0035] Además de las secuencias de nucleótidos descritas anteriormente, la presente descripción también incluye secuencias de aminoácidos de las cadenas ligera y pesada variables de los anticuerpos descritos en el presente documento (o fragmentos de estas secuencias de aminoácidos). Además, la presente descripción también incluye

secuencias de aminoácidos (o fragmentos de las mismas) que comprenden, corresponden a, son idénticas a, o complementarias a al menos aproximadamente el 70% (por ejemplo, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75 %, 76%, 77%, 78% ó 79%), preferiblemente al menos aproximadamente el 80% (por ejemplo, 80% 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88% ó 89%), y más preferiblemente al menos aproximadamente el 90% de identidad (por ejemplo, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ó 100%), a las secuencias de aminoácidos de las proteínas de la presente descripción. (De nuevo, todos los números enteros (y partes de los mismos) entre e incluyendo 70% y 100% (tal como se ha indicado en relación con las identidades de secuencia de nucleótidos indicadas anteriormente) también se consideran dentro del alcance de la presente descripción con respecto al porcentaje de identidad).

[0036] Para los propósitos de la presente descripción, un "fragmento" de una secuencia de nucleótidos se define como una secuencia contigua de aproximadamente al menos 6, preferiblemente, al menos aproximadamente 8, más preferiblemente, al menos aproximadamente 10 nucleótidos, e incluso más preferiblemente, al menos aproximadamente 15 nucleótidos correspondientes a una región de la secuencia de nucleótidos especificada.

[0037] El término "identidad" se refiere a la relación de dos secuencias en una base de nucleótido por nucleótido sobre una ventana o segmento de comparación. Por lo tanto, la identidad se define como el grado de igualdad, correspondencia o equivalencia entre las mismas cadenas (ya sea sentido o antisentido) de dos segmentos de ADN (o dos secuencias de aminoácidos). "Porcentaje de identidad de secuencia" se calcula comparando dos secuencias óptimamente alineadas sobre una región concreta, determinando el número de posiciones en las que la base o aminoácido idénticos aparecen en ambas secuencias con el fin de producir el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de tales posiciones por el número total de posiciones en el segmento que se compara y multiplicando el resultado por 100. El alineamiento óptimo de secuencias se puede realizar mediante el algoritmo de Smith y Waterman, Appl. Math. 2: 482 (1981), mediante el algoritmo de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970), por el método de Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85: 2444 (1988) y mediante programas informáticos que implementan los algoritmos relevantes (por ejemplo, Clustal Macaw Pileup (<http://cmgm.stanford.edu/biochem218/11Multiple.pdf>; Higgins et al, CABIOS 5L151-153 (1989)), FASTDB (Intelligenetics), BLAST (Centro Nacional de Información Biomédica; Altschul et al., Nucleic Acids Research 25: 3.389 a 3.402 (1997)), PILEUP (Genetics Computer Group, Madison, WI) o GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA (paquete informático Wisconsin Genetics versión 7.0, Genetics Computer Group, Madison, WI). (Véase la Patente de Estados Unidos. Nº 5.912.120.)

[0038] Para los propósitos de la presente invención, "complementariedad" se define como el grado de relación entre dos segmentos de ADN. Se determina midiendo la capacidad de la cadena sentido de un segmento de ADN de hibridarse con la cadena anti-sentido del otro segmento de ADN, en condiciones apropiadas, para formar una doble hélice. Un "complemento" se define como una secuencia que se empareja con una secuencia determinada basándose en las reglas de emparejamiento de bases canónicas. Por ejemplo, una secuencia de A-G-T en una cadena de nucleótidos es "complementaria" a T-C-A en la otra cadena.

[0039] En la doble hélice, la adenina aparece en una cadena, la timina aparece en la otra cadena. Del mismo modo, siempre que guanina se encuentre en una cadena, citosina se encuentra en la otra. Cuanto mayor sea la relación entre las secuencias de nucleótidos de dos segmentos de ADN, mayor será la capacidad para formar dobles cadenas híbridas entre las cadenas de los dos segmentos de ADN.

[0040] La similitud "entre dos secuencias de aminoácidos se define como la presencia de una serie de residuos de aminoácidos idénticos, así como residuos de aminoácidos conservados en ambas secuencias. Cuanto mayor sea el grado de similitud entre dos secuencias de aminoácidos, mayor será la correspondencia, igualdad o equivalencia de las dos secuencias. ("La identidad entre dos secuencias de aminoácidos se define como la presencia de una serie de residuos de aminoácidos exactamente iguales o invariantes en ambas secuencias). Las definiciones de "complementariedad", "identidad" y "similitud" son bien conocidas por los expertos en la materia.

[0041] "Codificada por" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de polipéptido, en la que la secuencia de polipéptido o una parte de la misma contiene una secuencia de aminoácidos de al menos 3 aminoácidos, más preferiblemente al menos 8 aminoácidos, e incluso más preferiblemente al menos 15 aminoácidos de un polipéptido codificado por la secuencia de ácido nucleico.

[0042] "Actividad biológica", tal como se usa en el presente documento, se refiere a todas las propiedades biológicas inherentes de un anticuerpo contra la troponina I o la troponina I. Dichas propiedades incluyen, por ejemplo, la capacidad del anticuerpo para unirse a la troponina I y anticuerpos relacionados funcionalmente descritos en este documento.

[0043] Los términos "unión específica" o "se unen específicamente", tal como se usa en el presente documento, en referencia a la interacción de un anticuerpo, una proteína, o un péptido con una segunda especie química, quieren decir que la interacción depende de la presencia de una estructura particular (por ejemplo, un determinante antigénico o epítipo) en la especie química; por ejemplo, un anticuerpo reconoce y se une a una estructura proteica específica en lugar de a las proteínas en general. Si un anticuerpo es específico para el epítipo "A", la presencia de

una molécula que contiene epítipo A (o libre, A no marcado), en una reacción que contiene la "A" marcado y el anticuerpo, reducirá la cantidad de A marcado unido al anticuerpo.

[0044] El término "anticuerpo", tal como se usa en el presente documento, se refiere ampliamente a cualquier molécula de inmunoglobulina (Ig) compuesta por cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L), o cualquier fragmento funcional, mutante, variante, o derivación de la misma, que conserva las características esenciales de unión a epítipo de una molécula de Ig. Dichas entidades de anticuerpo mutante, variante, o derivado son conocidos en la técnica, realizaciones no limitantes de las cuales se discuten a continuación.

[0045] En un anticuerpo de longitud completa, cada cadena pesada está compuesta de una región variable de cadena pesada (abreviada en este documento como HCVR o VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está compuesta de tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de cadena ligera (abreviada en este documento como LCVR o VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está compuesta de un dominio, CL. Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que son más conservadas, denominadas regiones armazón ("framework") (FR). Cada VH y VL está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino terminal al extremo carboxi terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 y IgA2) o subclase y pueden ser de cualquier especie (por ejemplo, ratón, humano, pollo, rata, conejo, oveja, tiburón y camélido).

[0046] Las CDR de los anticuerpos de la presente invención se muestran en las Tablas 1 y 2 siguientes:

TABLA 1: CDR DE CADENA PESADA PARA TnI 19C7 AM1

SEQ ID No:	Región de proteína	Secuencia
52	CDR H1	GYTFTDYNLH
53	CDR H2	YIYPYNGITGYNQKFKS
54	CDR H3	DAYDYDYLTD

TABLA 2: CDR DE CADENA LIGERA PARA TnI 19C7 AM1

SEQ ID No:	Región de proteína	Secuencia
55	CDR L1	RTSKNVGTNIH
56	CDR L2	YASERLP
57	CDR L3	QQSNNWPYT

[0047] El término "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "parte de anticuerpo"), tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno. Se ha demostrado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo puede realizarse por uno o más fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Dichas realizaciones de anticuerpos también pueden ser biespecíficos, específicos dualmente, o multiespecíficos, que se unen específicamente a dos o más antígenos diferentes. Los ejemplos de fragmentos de unión incluidos dentro del término "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward et al, (1989) Nature 341: 544-546, Winter et al, publicación de solicitud internacional No. WO 90/05144 A1), que comprende un único dominio variable; y (vi) una región determinante de complementariedad (CDR) aislada. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, pueden unirse, usando métodos recombinantes, por un enlazador sintético que les permite formarse como una única cadena de proteína en la que las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv); véase, por ejemplo, Bird et al (1988) Science 242: 423-426; y Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5.879-5.883). Dichos anticuerpos de cadena sencilla también se incluyen en el presente documento dentro del término "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo. También se incluyen otras formas de anticuerpos de cadena sencilla, tales como diacuerpos. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes biespecíficos en los que los dominios VH y VL se expresan en una sola cadena polipeptídica, pero usando un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, forzando de este modo los dominios a emparejarse con dominios complementarios de otra cadena y creando dos sitios de unión a antígeno (véase, por ejemplo, Holliger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448; Poljak, RJ, et al. (1994) Structure 2:1121-1123). Dichas parte de unión a antígeno son conocidas en la técnica (Kontermann y Dubel Eds., Antibody Engineering (2001) Springer-Verlag. Nueva York. 790 pp. (ISBN 3-540-41354-5)).

[0048] El término "constructo de anticuerpo", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un polipéptido que comprende una o más de partes de unión a antígeno de la presente invención unidas a un polipéptido enlazador o un dominio constante de inmunoglobulina. Los polipéptidos enlazadores comprenden dos o más residuos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos y se utilizan para enlazar una o más partes de unión a antígeno. Dichos polipéptidos enlazadores son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Holliger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448; Poljak, RJ, et al. (1994) Structure 2:1121-1123). Un dominio constante de inmunoglobulina se refiere a un dominio constante de cadena pesada o ligera. Las secuencias de aminoácidos del dominio constante de cadena pesada y de cadena ligera de IgG humana se conocen en la técnica, y los ejemplos se presentan en la Tabla 3.

TABLA 3 SEQUENCIA DEL DOMINIO CONSTANTE DE CADENA PESADA Y DEL DOMINIO CONSTANTE DE CADENA LIGERA DE IgG HUMANA

Proteína	Identificador de secuencia	Secuencia
		12345678901234567890123456789012
Región constante de Ig gamma-1	SEQ ID NO: 50	ASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Mutante de la región constante de Ig gamma-1	SEQ ID NO: 51	STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Región constante de IG kappa	SEQ ID NO: 61	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGE
Región constante de IG lambda	SEQ ID NO: 62	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYP GAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAAS SYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPT ECS

[0049] Todavía adicionalmente, un anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo puede ser parte de una molécula de inmunoadhesión más grande, formada mediante asociación covalente o no covalente del anticuerpo o parte de anticuerpo con una o más de otras proteínas o péptidos. Ejemplos de dichas moléculas de inmunoadhesión incluyen el uso de la región del núcleo de estreptavidina para formar una molécula scFv tetramérica (Kiprianov, SM, et al. (1995) Human antibodies and Hybridomes 6: 93-101) y el uso de un residuo de cisteína, un péptido marcador y una etiqueta de polihistidina C-terminal para formar moléculas scFv bivalentes y biotiniladas (Kiprianov, SM, et al. (1994) Mol. Immunol. 31: 1047-1058). Las partes de anticuerpo, tales como fragmentos Fab y F(ab')₂, se pueden preparar a partir de anticuerpos enteros usando técnicas convencionales, tales como la digestión con papaína o pepsina, respectivamente, de anticuerpos enteros. Además, los anticuerpos, partes de anticuerpo y moléculas de inmunoadhesión pueden obtenerse utilizando técnicas estándar de ADN recombinante, tal como se describe en el presente documento.

[0050] Un "anticuerpo aislado", tal como se usa en el presente documento, pretende referirse a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen especificidades antigénicas diferentes (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a troponina I está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos de troponina I). Un anticuerpo aislado que se une específicamente a troponina I puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos, tales como moléculas de troponina I de otras especies. Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o productos químicos.

[0051] El término "anticuerpo humano", tal como se usa en el presente documento, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio in vitro o por mutación somática in vivo), por ejemplo en las CDR y en particular CDR3. Sin embargo, el término "anticuerpo humano", tal como se usa en el presente documento, no pretende incluir anticuerpos en los que las secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamíferos, tal como un ratón, han sido injertadas en secuencias armazón humanas.

[0052] El término "anticuerpo humano recombinante", tal como se usa en el presente documento, pretende incluir todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan mediante medios recombinantes, tales como anticuerpos expresados usando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula huésped (descrito a continuación), anticuerpos aislados de una biblioteca combinatoria recombinante de anticuerpos humanos (Hoogenboom HR, (1997) TIB Tech. 15: 62-70; Azzazy H., y Highsmith W.E., (2002) Clin. Biochem. 35: 425-445; Gavilondo JV, y Latrick JW (2002) 29: 128-145 BioTechniques; Hoogenboom H. y Chames P. (2000) Immunology Today 21: 371-378), anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico para genes de inmunoglobulina humana (véase, por ejemplo, Taylor, LD, et al (1992) Nucl.Acids Res. 20: 6287-6295; Kellermann, S-A. y Green, L.L. (2002) Current Opinion in Biotechnology 13: 593-597; Little M. et al (2000) Immunology Today 21: 364-370) o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique corte y empalme de las secuencias de genes de inmunoglobulina humana con otras secuencias de ADN. Dichos anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. En ciertos casos, sin embargo, dichos anticuerpos humanos recombinantes se someten a mutagénesis in vitro (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humanas, mutagénesis somática in vivo) y por lo tanto las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivadas de y relacionadas con las secuencias VH y VL de la línea germinal humana, pueden no existir de forma natural dentro del repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos in vivo.

[0053] El término "anticuerpo quimérico" se refiere a anticuerpos que comprenden secuencias de la región variable de cadena pesada y cadena ligera de una especie y secuencias de la región constante de otra especie. La presente invención abarca anticuerpos quiméricos que tienen, por ejemplo, regiones variables de cadena pesada y ligera murinas ligadas a regiones constantes humanas.

[0054] El término "anticuerpo injertado con CDR" se refiere a anticuerpos que comprenden secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera de una especie pero en los que las secuencias de una o más de las regiones CDR de VH y/o VL se sustituyen por secuencias CDR de otra especie, tales como anticuerpos que tienen regiones variables de cadena pesada y ligera murinas en los que una o más de las CDR murinas (por ejemplo, CDR3) se han sustituido por secuencias CDR humanas.

[0055] El término "anticuerpo humanizado" se refiere a anticuerpos que comprenden secuencias de la región variable de cadena pesada y ligera de una especie no humana (por ejemplo, un ratón), pero en los que al menos una parte de la secuencia de VH y/o VL ha sido alterada para ser más similar a "humana", es decir, más similares a secuencias variables de línea germinal humana. Un tipo de anticuerpo humanizado es un anticuerpo injertado con CDR, en el que las secuencias CDR humanas se introducen en secuencias de VH y VL no humanas para reemplazar las correspondientes secuencias de CDR no humanas.

[0056] Los términos, "numeración de Kabat", "definiciones de Kabat" y "marcaje de Kabat" se usan de manera intercambiable en el presente documento. Estos términos, que son reconocidos en la técnica, se refieren a un sistema de numeración de residuos de aminoácidos que son más variables (es decir hipervariable) que otros residuos de aminoácidos en las regiones variables de cadena pesada y ligera de un anticuerpo, o una parte de unión a antígeno del mismo (Kabat et al. (1971) Ann. NY Acad. Sci. 190: 382-391 y Kabat, EA, et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos, NIH Publication No. 91-3242). Para la región variable de cadena pesada, la región hipervariable varía de las posiciones de aminoácidos 31 a 35 para la CDR1, las posiciones de aminoácidos 50 a 65 para la CDR2, y las posiciones de aminoácidos 95 a 102 de CDR3. Para la región variable de cadena ligera, la región hipervariable varía de las posiciones de aminoácidos 24 a 34 para la CDR1, las posiciones de aminoácidos 50 a 56 para la CDR2, y posiciones de aminoácidos 89 a 97 para la CDR3. (Además, para los propósitos de la presente invención, se utilizó la definición de AbM tal como se define por el software de modelaje de anticuerpos ABM de Oxford Molecular para definir la región CDR-H1 de los aminoácidos 26-35 de la cadena pesada.)

[0057] Tal como se utiliza en el presente documento, los términos "aceptor" y "anticuerpo aceptor" se refieren a que el anticuerpo o secuencia de ácido nucleico que proporciona o codifica al menos el 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o 100% de las secuencias de aminoácidos de una o más de las regiones armazón. En algunas realizaciones, el término "aceptor" se refiere a la secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos del anticuerpo que proporciona o codifica la región o regiones constantes. En aún otra realización, el término "aceptor" se refiere a la secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos del anticuerpo que proporciona o codifica una

o más de las regiones armazón y la región o regiones constantes. En una realización específica, el término "aceptor" se refiere a una secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos de anticuerpo humano que proporciona o codifica al menos el 80%, preferiblemente, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98 %, o 100% de las secuencias de aminoácidos de una o más de las regiones armazón. Según esta realización, un aceptor puede

[0058] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "CDR" se refiere a la región determinante de complementariedad dentro de las secuencias variables de anticuerpos. Existen tres CDR en cada una de las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera, que se designan CDR1, CDR2 y CDR3, para cada una de las regiones variables. El término "conjunto de CDR", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo de tres CDR que aparecen en una única región variable capaz de unirse al antígeno. Los límites exactos de estas CDR se han definido de manera diferente de acuerdo a diferentes sistemas. El sistema descrito por Kabat (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest (Instituto Nacional de Salud, Bethesda, Md. (1987) y (1991)) no sólo proporciona un sistema de numeración de residuos inequívoca aplicable a cualquier región variable de un anticuerpo, sino que también proporciona los límites precisos de residuos que definen las tres CDR. Estas CDR pueden referirse como CDR de Kabat. Chothia y colaboradores (Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987) y Chothia et al, Nature 342: 877-883 (1989)) encontraron que ciertas subpartes dentro de las CDR de Kabat adoptan conformaciones de cadena principal peptídica casi idénticas, a pesar de tener una gran diversidad a nivel de secuencia de aminoácidos. Estas subpartes se designaron como L1, L2 y L3 o H1, H2 y H3, donde la "L" y "H" designan las regiones de cadena ligera y cadena pesada, respectivamente. Estas regiones pueden referirse como las CDR de Chothia, que tienen límites que se superponen con las CDR de Kabat. Se han descrito otros límites que definen las CDR que se solapan con las CDR de Kabat por Padlan (FASEB J. 9: 133-139 (1995)) y MacCallum (J Mol Biol 262 (5): 732-45 (1996)). Otras definiciones de límites de CDR pueden no seguir estrictamente uno de los sistemas anteriores, tales como las definiciones de AbM, pero, no obstante, se solapan con las CDR de Kabat, aunque pueden acortarse o alargarse a la luz de los resultados de predicción o experimentales de que los residuos o grupos de residuos particulares o incluso las CDR completas no afectan significativamente en la unión al antígeno. Los métodos utilizados en el presente documento pueden utilizar CDR definidas según cualquiera de estos sistemas, aunque las realizaciones preferidas utilizan las CDR definidas por Kabat, AbM o Chothia.

[0059] Tal como se utiliza en el presente documento, el término residuo "canónico" se refiere a un residuo en una CDR o armazón que define una estructura de CDR canónica particular, tal como se define por Chothia et al. (J. Mol. Biol. 196: 901-907 (1987); Chothia et al., J. Mol. Biol. 227: 799 (1992)). De acuerdo con Chothia et al., las partes críticas de las CDR de muchos anticuerpos tienen conformaciones de cadena principal peptídica casi idénticas a pesar de la gran diversidad a nivel de secuencia de aminoácidos. Cada estructura canónica especifica principalmente un conjunto de ángulos de torsión de cadena principal peptídica para un segmento contiguo de residuos de aminoácidos que forman un bucle.

[0060] Tal como se utiliza en el presente documento, los términos "dador" y "anticuerpo dador" se refieren a un anticuerpo que proporciona una o más CDR. En una realización preferida, el anticuerpo dador es un anticuerpo de una especie diferente del anticuerpo del que se obtienen o derivan las regiones armazón. En el contexto de un anticuerpo humanizado, el término "anticuerpo dador" se refiere a un anticuerpo no humano que proporciona una o más CDR.

[0061] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "armazón" o "secuencia de armazón" se refiere a las secuencias restantes de una región variable menos las CDR. Debido a que la definición exacta de una secuencia de CDR puede determinarse mediante diferentes sistemas, el significado de una secuencia armazón está sujeto a las correspondientes interpretaciones diferentes. Las seis CDR (CDR-L1, -L2, y -L3 de cadena ligera y CDR-H1, -H2 y -H3 de cadena pesada) también dividen las regiones armazón en la cadena ligera y la cadena pesada en cuatro subregiones (FR1, FR2, FR3 y FR4) en cada cadena, en las que CDR1 se coloca entre FR1 y FR2, CDR2 entre FR2 y FR3, y CDR3 entre FR3 y FR4. Sin precisar las subregiones particulares como FR1, FR2, FR3 o FR4, una región armazón, tal como se refiere por otros, representa las FR combinadas dentro de la región variable de una única cadena de inmunoglobulina de origen natural. Tal como se usa en este documento, una FR representa una de las cuatro subregiones, y las FR representan dos o más de las cuatro subregiones que constituyen una región armazón.

[0062] En una realización de la presente invención, las secuencias dadoras de cadena pesada y cadena ligera murinas se seleccionan a partir de las secuencias descritas a continuación:

TABLA 4: SECUENCIAS DADORAS DE CADENA PESADA PARA Tn1 19C7 AM1

SEQ No.	ID	Secuencia
		12345678901234567890123456789012

69	EVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSL
70	WIRQPPGKALEWLA
71	RLTISKDTSKNQVLTMTNMDPVDATYYCAR
72	WGQGTTVTVSS
73	EVTLKESGPVLVKPTETTLTLTCTVSGFSL
74	WIRQPPGKALEWLA
75	RLTISKDTSKSQVLTMTNMDPVDATYYCAR
76	WGQGTTVTVSS
77	EVQLVESGGGLVQPGLSLRLSCAASGFTFS
78	WVRQAPGKGLEWVG
79	RFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDAVYYCAR
80	WGQGTTVTVSS
81	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS
82	WVRQAPGKGLEWVS
83	RFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDAVYYCAR
84	WGQGTTVTVSS
85	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFS
86	WVRQAPGQGLEWMG
87	RVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR
88	WGQGTTVTVSS
89	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT
90	WVRQAPGQGLEWMG
91	RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR
92	WGQGTTVTVSS

TABLA 5: SECUENCIAS DADORAS DE CADENA PESADA PARA Tr1 19C7 AM1

SEQ No.	ID	Secuencia
		12345678901234567890123456789012
93		DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC
94		WYQQKPGQPPKLLIY
95		GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYC
96		FGGGTKVEIKR
97		EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC
98		WYQQKPGQAPRLIY
99		GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC
100		FGGGTKVEIKR
101		DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC
102		WYQQKPEKAPKSLIY
103		GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC
104		FGGGTKVEIKR
105		DIQMTQSPSSVSASVGDRTITC
106		WYQOKPGKAPKLLIY
107		GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC
108		FGGGTKVEIKR

- 5 [0063] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "gen de anticuerpo de línea germinal" o "fragmento del gen" se refiere a una secuencia de inmunoglobulina codificada por células no linfoides que no han sufrido el proceso de maduración que conduce a la reorganización y mutación genética para la expresión de una inmunoglobulina particular. (Véase, por ejemplo, Shapiro et al., Crit. Rev. Immunol. 22 (3): 183-200 (2002); Marchalonis et al., Adv Exp Med Biol. 484: 13-30 (2001)). Una de las ventajas proporcionadas por diversas realizaciones de la presente invención deriva del reconocimiento de que los genes de anticuerpos de la línea
- 10 germinal son más propensas que los genes de anticuerpos maduros para conservar las estructuras de secuencias de aminoácidos esenciales características de los individuos en las especies, por lo tanto menos probabilidades de ser reconocidos como de una fuente exógena cuando se usa terapéuticamente en esa especie.
- 15 [0064] Tal como se utiliza en el presente documento, el término residuos "clave" se refiere a ciertos residuos dentro de la región variable que tienen un mayor impacto en la especificidad y/o afinidad de unión de un anticuerpo, en particular, un anticuerpo humanizado. Un residuo de clave incluye, pero sin limitación, uno o más de los siguientes: un residuo que es adyacente a una CDR, un sitio de glicosilación potencial (puede ser un sitio de N- u O-glicosilación), un residuo raro, un residuo capaz de interactuar con el antígeno, un residuo capaz de interactuar con una CDR, un residuo canónico, un residuo de contacto entre la región variable de cadena pesada y la región
- 20 variable de la cadena ligera, un residuo dentro de la zona Vernier, y un residuo en la región que se superpone entre

la definición de Chothia de una CDR! De cadena pesada variable y la definición de Kabat del primer armazón de cadena pesada.

[0065] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "anticuerpo humanizado" es un anticuerpo o una variante, derivado, análogo o fragmento del mismo que se une inmunoespecíficamente a un antígeno de interés y que comprende una región armazón (FR) que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo humano y una región determinante de la complementariedad (CDR) que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo no humano. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "sustancialmente" en el contexto de una CDR se refiere a una CDR que tiene una secuencia de aminoácidos al menos el 80%, preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, más preferiblemente al menos 98% y lo más preferiblemente al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de una CDR de anticuerpo no humano. Un anticuerpo humanizado comprende sustancialmente la totalidad de al menos uno, y habitualmente dos, dominios variables (Fab, Fab', F(ab')₂, FabC, Fv) en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana (es decir, anticuerpo dador), y todas o sustancialmente todas las regiones armazón son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. Preferiblemente, un anticuerpo humanizado también comprende al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), habitualmente la de una inmunoglobulina humana. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado contiene tanto la cadena ligera, así como al menos el dominio variable de una cadena pesada. El anticuerpo también puede incluir las regiones CH₁, bisagra, CH₂, CH₃, y CH₄ de la cadena pesada. En otras realizaciones, un anticuerpo humanizado sólo contiene una cadena ligera humanizada. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado sólo contiene una cadena pesada humanizada. En realizaciones específicas, un anticuerpo humanizado sólo contiene un dominio variable humanizado de una cadena ligera y/o de la cadena pesada humanizada.

[0066] El anticuerpo humanizado puede seleccionarse de cualquier clase de inmunoglobulinas, incluyendo IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, y cualquier isotipo, incluyendo, sin limitación, IgG 1, IgG2, IgG3 e IgG4. El anticuerpo humanizado puede comprender secuencias de más de una clase o isotipo, y pueden seleccionarse dominios constantes particulares para optimizar las funciones efectoras deseadas usando técnicas bien conocidas en el sector.

[0067] Las regiones armazón y CDR de un anticuerpo humanizado no necesitan corresponderse exactamente con las secuencias parentales, por ejemplo, la CDR del anticuerpo dador o el armazón consenso pueden mutagenizarse por sustitución, inserción y/o delección de al menos un residuo de aminoácido, de manera que el residuo de la CDR o armazón en ese sitio no se corresponde con el anticuerpo dador o el armazón consenso. En una realización preferida, dichas mutaciones, sin embargo, no serán extensas. Normalmente, al menos el 80%, preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90%, y lo más preferiblemente al menos 95% de los residuos del anticuerpo humanizado corresponderán con los de las secuencias parentales de FR y CDR. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "armazón consenso" se refiere a la región armazón en la secuencia consenso de inmunoglobulina. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "secuencia consenso de inmunoglobulina" se refiere a la secuencia formada a partir de los aminoácidos (o nucleótidos) que aparecen más frecuentemente en una familia de secuencias de inmunoglobulina relacionadas (Véase, por ejemplo, Winnaker, From Genes to Clones (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Alemania 1987). En una familia de inmunoglobulinas, cada posición en la secuencia consenso está ocupada por el aminoácido que aparece con más frecuencia en esa posición en la familia. Si dos aminoácidos aparecen con igual frecuencia, cualquiera puede incluirse en la secuencia consenso.

[0068] Tal como se usa en el presente documento, la zona "Vernier" se refiere a un subconjunto de residuos de armazón que pueden ajustar la estructura de CDR y afinar el ajuste a antígeno tal como se describe por Foote y Winter (1992, J. Mol. Biol. 224: 487-499). Los residuos de la zona de Vernier forman una capa que subyace a las CDR y pueden afectar sobre la estructura de las CDR y la afinidad del anticuerpo.

[0069] El término "actividad" incluye actividades, tales como la especificidad/afinidad de unión de un anticuerpo por un antígeno, por ejemplo, un anticuerpo anti-troponina I que se une a la troponina I.

[0070] El término "epítipo" incluye cualquier determinante polipéptido capaz de unirse específicamente a una inmunoglobulina o receptor de células T. En ciertas realizaciones, los determinantes epítopos incluyen agrupaciones de superficie químicamente activos de moléculas, tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcares, fosforilo o sulfonilo, y, en ciertas realizaciones, pueden tener características estructurales tridimensionales específicas, y/o características de carga específicas. Un epítipo es una región de un antígeno que está unido por un anticuerpo. En ciertas realizaciones, se dice que un anticuerpo se une específicamente a un antígeno cuando reconoce preferencialmente su antígeno diana en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas.

[0071] El término "resonancia de plasmón superficial", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un fenómeno óptico que permite el análisis de interacciones bioespecíficas en tiempo real mediante la detección de alteraciones en las concentraciones de proteínas dentro de una matriz de biosensor, por ejemplo usando el sistema BIAcore (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia y Piscataway, NJ). Para una descripción más detallada, véase Jönsson, U., et al. (1993) Ann. Biol. Clin. 51: 19-26; Jönsson, U., et al. (1991) Biotechniques 11: 620-627; Jönsson, B., et al. (1995) J. Mol. Recognit. 8: 125-131; y Johnson, B., et al. (1991) Anal. Biochem. 198: 268-277.

[0072] El término " K_{on} ", tal como se usa en el presente documento, pretende referirse a la constante de velocidad para la asociación de un anticuerpo al antígeno para formar el complejo anticuerpo/antígeno tal como se conoce en la técnica.

[0073] El término " K_{off} ", tal como se usa en el presente documento, pretende referirse a la constante de velocidad de disociación para la disociación de un anticuerpo del complejo anticuerpo/antígeno tal como se conoce en la técnica.

[0074] El término " K_d " o " K_D ", tal como se usa en el presente documento, pretende referirse a la constante de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular tal como se conoce en la técnica.

[0075] El término "proteína de unión marcada", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína con un marcador incorporado que proporciona la identificación de la proteína de unión. Preferiblemente, el marcador es un marcador detectable, por ejemplo, la incorporación de un aminoácido radiomarcado o la unión a un polipéptido de restos biotínico que se pueden detectar por avidina marcada (por ejemplo, estreptavidina que contiene un marcador fluorescente o actividad enzimática que se puede detectar por medios ópticos o métodos colorimétricos). Los ejemplos de marcadores para polipéptidos incluyen, pero sin limitación, los siguientes: radioisótopos o radionúclidos (por ejemplo, 3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho , o ^{153}Sm); marcadores fluorescentes (por ejemplo, FITC, rodamina, fósforos de lantánidos), marcadores enzimáticos (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, luciferasa, fosfatasa alcalina); marcadores quimioluminiscentes; grupos biotínico; epítopos polipeptídicos predeterminados reconocidos por un indicador secundario (por ejemplo, secuencias de pares de cremalleras de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metal, etiquetas de epítopo); y agentes magnéticos, tales como quelatos de gadolinio.

[0076] El término "conjugado de anticuerpo" se refiere a una proteína de unión, tal como un anticuerpo, unido químicamente a un segundo grupo químico, tal como un agente terapéutico o citotóxico. El término "agente" se usa en el presente documento para indicar un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica o un extracto producido de materiales biológicos. Preferiblemente, los agentes terapéuticos o citotóxicos incluyen, pero sin limitación, la toxina pertussis, taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi antracindiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, y puomicina y análogos u homólogos de los mismos. Los términos "cristal", y "cristalizado", tal como se usan en el presente documento, se refieren a un anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, que existe en forma de un cristal. Los cristales son una forma de estado sólido de la materia, que es distinta de otras formas, tales como el estado sólido amorfo o el estado cristalino líquido. Los cristales están compuestos de grupos tridimensionales repetitivos regulares de átomos, iones, moléculas (por ejemplo, proteínas, tales como anticuerpos), o ensamblajes moleculares (por ejemplo, complejos antígeno/anticuerpo). Estos grupos tridimensionales están dispuestos de acuerdo con las relaciones matemáticas específicas que son bien comprendidas en el sector. La unidad fundamental, o bloque de construcción, que se repite en un cristal se llama la unidad asimétrica. La repetición de la unidad asimétrica en una disposición que se ajusta a una simetría cristalográfica determinada bien definida proporciona la "celda unitaria" del cristal. La repetición de la celda unitaria por translaciones regulares en las tres dimensiones proporciona el cristal. Véase Giege, R. y Ducruix, A. Barrett, *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach*, 2ª ed., pág. 20 1-16, Oxford University Press, Nueva York, NY, (1999).

[0077] El término "polinucleótido", tal como se refiere en el presente documento, significa una forma polimérica de dos o más nucleótidos, ribonucleótidos o desoxinucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. El término incluye formas de cadena sencilla y de doble cadena de ADN, pero preferiblemente es ADN de doble cadena.

[0078] El término "polinucleótido aislado", tal como se usa en el presente documento, significará un polinucleótido (por ejemplo, de origen genómico, ADNc, o sintético, o alguna combinación de los mismos) que, en virtud de su origen, no está asociado con todo o una parte de un polinucleótido con el que el "polinucleótido aislado" se encuentra en la naturaleza; está unido operativamente a un polinucleótido al que no está unido en la naturaleza; o no se produce en la naturaleza como parte de una secuencia más grande.

[0079] El término "vector", tal como se usa en el presente documento, pretende referirse a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular en el que se pueden unir segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, en el que se pueden unir segmentos de ADN adicionales en el genoma viral. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episomales de mamífero). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamífero no episomales) se pueden integrar en el genoma de una célula huésped tras la introducción en la célula huésped, y de ese modo se replican junto con el genoma del huésped. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están unidos operativamente. Dichos vectores se denominan en el presente documento como "vectores de expresión recombinantes" (o

5 simplemente, "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante están a menudo en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" pueden usarse indistintamente ya que el plásmido es la forma más comúnmente utilizada de vector. Sin embargo, la invención pretende incluir dichas otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (por ejemplo, retrovirus defectuosos de replicación, adenovirus y virus adeno-asociados), que realizan funciones equivalentes.

10 [0080] El término "unido operativamente" se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar en su manera prevista. Una secuencia de control "unida operativamente" a una secuencia codificante está ligada de tal manera que la expresión de la secuencia codificante se consigue en condiciones compatibles con las secuencias de control. Secuencias "unidas operativamente" incluyen tanto secuencias de control de la expresión que son contiguas con el gen de interés como secuencias de control de la expresión que actúan en *trans* o a una distancia para controlar el gen de interés. El término "secuencia de control de la expresión", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a secuencias de polinucleótidos que son necesarias para efectuar la expresión y el procesamiento de secuencias codificantes a las que están ligadas. Las 15 secuencias de control de la expresión incluyen secuencias de iniciación, terminación, promotoras y potenciadoras de la transcripción apropiadas; señales de procesamiento del ARN eficaces, tales como señales de empalme y poliadenilación; secuencias que estabilizan el ARNm citoplásmico; secuencias que aumentan la eficiencia de la traducción (es decir, secuencia de consenso Kozak); secuencias que potencian la estabilidad de la proteína; y cuando se desee, secuencias que potencian la secreción de proteínas. La naturaleza de dichas secuencias de control difiere dependiendo del organismo huésped; en procariotas, dichas secuencias de control generalmente incluyen promotor, sitio de unión ribosomal, y secuencia de terminación de la transcripción; en eucariotas, generalmente, dichas secuencias de control incluyen promotores y secuencia de terminación de la transcripción. El término "secuencias de control" pretende incluir componentes cuya presencia es esencial para la expresión y el procesamiento, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por 20 ejemplo, secuencias líder y secuencias de parejas de fusión.

25 [0081] "Transformación", tal como se define en el presente documento, se refiere a cualquier proceso por el que el ADN exógeno entra en una célula huésped. La transformación puede tener lugar bajo condiciones naturales o artificiales usando diversos métodos bien conocidos en la técnica. La transformación puede basarse en cualquier método conocido para la inserción de secuencias de ácido nucleico exógenas en una célula huésped procariota o eucariota. El método se selecciona basado en la célula huésped que se transforma y puede incluir, pero sin limitación, infección viral, electroporación, lipofección, y bombardeo de partículas. Dichas células "transformadas" incluyen células transformadas de manera estable en las que el ADN insertado es capaz de replicarse, ya sea como un plásmido de replicación autónoma o como parte del cromosoma huésped. También se incluyen las células que 30 expresan transitoriamente el ADN o ARN insertado durante períodos limitados de tiempo.

35 [0082] El término "célula huésped recombinante" (o simplemente "célula huésped"), tal como se usa en el presente documento, pretende referirse a una célula en la que se ha introducido ADN exógeno. Se debe entender que dichos términos pretenden referirse no sólo a la célula sujeto particular, sino también a la progenie de dicha célula. Debido a que pueden producirse ciertas modificaciones en generaciones sucesivas debido a mutación o influencias ambientales, dicha progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula parental, pero todavía se incluyen dentro del alcance de la expresión "célula huésped" tal como se usa en el presente documento. Preferiblemente las células huésped incluyen células procariotas y eucariotas seleccionadas de cualquiera de los reinos de la vida. Las células eucariotas preferidas incluyen células de protistas, hongos, plantas y animales. Lo más preferiblemente, las células huésped incluyen, pero sin limitación, la línea celular procariota de *E. coli*; líneas celulares de mamíferos CHO, HEK 293 y COS; la línea celular de insecto Sf9; y la célula fúngica *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia pastoris*. 40 45

50 [0083] Se pueden utilizar técnicas estándar para el ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos, y el cultivo y transformación de tejidos (por ejemplo, electroporación, lipofección). Las reacciones enzimáticas y técnicas de purificación se pueden realizar según las especificaciones del fabricante o tal como se realiza habitualmente en la técnica o tal como se describe en el presente documento. Las técnicas y procedimientos anteriores pueden realizarse generalmente según métodos convencionales bien conocidos en la técnica y tal como se describe en diversas referencias generales y más específicas que se citan y discuten a lo largo de la presente memoria descriptiva. Véase, por ejemplo, Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989)). 55

60 [0084] "Organismo transgénico", tal como se conoce en la técnica y tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un organismo que tiene células que contienen un transgén, en el que el transgén introducido en el organismo (o un antepasado del organismo) expresa un polipéptido que no se expresa naturalmente en el organismo. Un "transgén" es un constructo de ADN, el cual está integrado de forma estable y operativamente en el genoma de una célula de la que se desarrolla un organismo transgénico, que dirige la expresión de un producto génico codificado en uno o más tipos de células o tejidos del organismo transgénico.

65 [0085] El término "regular" y "modular" se utilizan indistintamente, y, tal como se usan en el presente documento, se refiere a un cambio o una alteración en la actividad de una molécula de interés (por ejemplo, la actividad biológica de la troponina I). La modulación puede ser un aumento o una disminución en la magnitud de una determinada

actividad o función de la molécula de interés. Actividades y funciones de una molécula de ejemplo incluyen, pero sin limitación, las características de unión, la actividad enzimática, la activación del receptor celular y la transducción de señales.

[0086] Correspondientemente, el término "modulador", tal como se usa en el presente documento, es un compuesto capaz de cambiar o alterar una actividad o función de una molécula de interés (por ejemplo, la actividad biológica de la troponina I). Por ejemplo, un modulador puede causar un aumento o disminución en la magnitud de una determinada actividad o función de una molécula en comparación con la magnitud de la actividad o función observada en ausencia del modulador. En ciertas realizaciones, un modulador es un inhibidor que disminuye la magnitud de al menos una actividad o función de una molécula. Los inhibidores de ejemplo incluyen, pero sin limitación, proteínas, péptidos, anticuerpos, peptidocuerpos, carbohidratos o pequeñas moléculas orgánicas. Los peptidocuerpos se describen, por ejemplo, en la publicación de la Solicitud Internacional N° WO 01/83525.

[0087] El término "agonista", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un modulador que, cuando se pone en contacto con una molécula de interés, provoca un aumento en la magnitud de una determinada actividad o función de la molécula en comparación con la magnitud de la actividad o función observada en ausencia del agonista. Los agonistas particulares de interés pueden incluir, pero sin limitación, polipéptidos de troponina I, ácidos nucleicos, carbohidratos o cualquier otra molécula que se une a la troponina I.

[0088] El término "antagonista" o "inhibidor", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un modulador que, cuando se pone en contacto con una molécula de interés provoca una disminución en la magnitud de una determinada actividad o función de la molécula en comparación con la magnitud de la actividad o función observada en ausencia del antagonista.

[0089] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad de una terapia que es suficiente para reducir o mejorar la gravedad y/o duración de un trastorno o uno o más de sus síntomas, evitar el avance de un trastorno, inducir la regresión de un trastorno, prevenir la recurrencia, el desarrollo, inicio o progresión de uno o más síntomas asociados con un trastorno, detectar un trastorno, o aumentar o mejorar el efecto o efectos profilácticos o terapéuticos de otra terapia (por ejemplo, agente profiláctico o terapéutico).

[0090] El término "muestra", tal como se usa en el presente documento, se utiliza en su sentido más amplio. Una "muestra biológica", tal como se usa en el presente documento, incluye, pero sin limitación, cualquier cantidad de una sustancia de un ser vivo o un ser anteriormente vivo. Dichos seres vivos incluyen, pero sin limitación, seres humanos, ratones, ratas, monos, perros, conejos y otros animales mamíferos o no mamíferos. Dichas sustancias incluyen, pero sin limitación, sangre, suero, orina, líquido sinovial, células, órganos, tejidos (por ejemplo, cerebro), médula ósea, ganglios linfáticos, líquido cerebroespinal y el bazo.

MÉTODOS DE FABRICACIÓN DE ANTICUERPOS

[0091] Los anticuerpos de la presente invención se pueden preparar por cualquiera de una serie de técnicas conocidas en el sector. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden preparar usando una amplia variedad de técnicas, incluyendo el uso de tecnologías de expresión recombinante o en fagos, o una combinación de las mismas. El término "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que se deriva de un único clon, incluyendo cualquier clon eucariota, procariota, o de fago, y no al método por el cual se produce.

[0092] En una realización, la presente invención proporciona un método para generar anticuerpos recombinantes (así como anticuerpos producidos por el método) que comprende cultivar una línea celular de ovario de hámster chino que secreta un anticuerpo de la presente invención.

[0093] Además, los fragmentos del anticuerpo de la presente invención que reconocen epítopos específicos pueden generarse por técnicas conocidas. Por ejemplo, los fragmentos Fab y F(ab')₂ de la presente invención pueden producirse por escisión proteolítica de moléculas de inmunoglobulina, utilizando enzimas, tales como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab')₂). Los fragmentos F(ab')₂ contienen la región variable, la región constante de la cadena ligera y el dominio CHI de la cadena pesada.

PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-TROPONINA I UTILIZANDO BIBLIOTECAS DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES

[0094] También se pueden utilizar métodos in vitro para producir los anticuerpos de la descripción, en los que se criba una biblioteca de anticuerpos para identificar un anticuerpo que tiene la especificidad de unión deseada. Los métodos para dicho cribado de bibliotecas de anticuerpos recombinantes son bien conocidos en la técnica e incluyen métodos descritos en, por ejemplo, Ladner et al., patente de Estados Unidos. No. 5.223.409; Kang et al., publicación de solicitud internacional N° WO 92/18619; Dower et al., publicación de solicitud internacional N° WO 91/17271; Winter et al., publicación de solicitud internacional N° WO 92/20791; Markland et al., publicación de solicitud internacional N° WO 92/15679; Breitling et al., publicación de solicitud internacional N° WO 93/01288; McCafferty et al., Publicación PCT N° WO 92/01047.; Garrard et al., publicación de solicitud internacional N° WO 92/09690; Fuchs

et al. (1991), Bio/Technology 9: 1370-1372; Hay et al, (1992) Hum Antibod Hybridomas Hybridomas 3: 81-85; Huse et al. (1989), Science 246: 1275-1281; McCafferty et al., Nature (1990) 348: 552-554; Griffiths et al. (1993) EMBO J 12: 725-734; Hawkins et al, (1992) J Mol Biol 226: 889-896; Clackson et al, (1991) Nature 352: 624-628; Gram et al, (1992) PNAS 89: 3.576-3.580; Garrad et al. (1991) Bio/Technology 9: 1373-1377; Hoogenboom et al. (1991), Nuc Acid Res 19: 4.133-4.137; y Barbas et al. (1991), PNAS 88: 7.978-7982, publicación de la Solicitud de Patente de Estados Unidos No. 20030186374, y la Publicación de la Solicitud Internacional N° WO 97/29131.

[0095] La biblioteca de anticuerpos recombinantes puede ser de un sujeto inmunizado con troponina I, o una parte de la misma. Alternativamente, la biblioteca de anticuerpos recombinantes puede ser de un sujeto sin tratar, es decir, uno que no ha sido inmunizado con la troponina I, tal como una biblioteca de anticuerpos humanos de un sujeto humano que no ha sido inmunizado con troponina I. Los anticuerpos se seleccionan mediante el cribado de la biblioteca de anticuerpos recombinantes con el péptido que comprende la troponina I humana para seleccionar de ese modo los anticuerpos que reconocen la troponina I. Los métodos para la realización de dicho cribado y la selección son bien conocidos en la técnica, tal como se describe en las referencias en el párrafo anterior. Para seleccionar anticuerpos que tienen afinidades de unión particulares para la troponina I, tales como los que se disocian de la troponina I humana con una constante de velocidad k_{off} particular, se puede utilizar el método conocido en la técnica de la resonancia de plasmón de superficie para seleccionar anticuerpos que tienen la constante de velocidad k_{off} deseada.

[0096] En otro enfoque, los anticuerpos también pueden generarse usando métodos de expresión en levadura conocidos en la técnica. En los métodos de expresión en levadura, se utilizan métodos genéticos para unir dominios de anticuerpos a la pared celular de levadura y expresarlos en la superficie de la levadura. En particular, dicha levadura se puede utilizar para expresar dominios de unión a antígeno expresados a partir de un repertorio o biblioteca combinatoria de anticuerpos (por ejemplo, humana o murina). Ejemplos de métodos de expresión en levadura que se pueden utilizar para producir los anticuerpos incluyen los descritos en Wittrup et al., Patente de Estados Unidos. No. 6.699.658.

PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES

[0097] Como se señaló anteriormente, los anticuerpos de la presente invención pueden ser producirse mediante cualquier número de técnicas conocidas en el sector. Por ejemplo, la expresión de células huésped, en la que el vector o vectores de expresión que codifican las cadenas pesadas y ligeras son transfectados en una célula huésped mediante técnicas estándar es el método preferido de producción de los anticuerpos de la presente invención. (Las diversas formas del término "transfección" pretenden abarcar una amplia variedad de técnicas habitualmente usadas para la introducción de ADN exógeno en una célula huésped procariota o eucariota, por ejemplo, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, transfección DEAE-dextrano y similares.) Aunque es posible expresar los anticuerpos de la presente invención en células huésped procarióticas o eucarióticas, la expresión de anticuerpos en células eucariotas es preferible, y lo más preferible en células huésped de mamífero, porque dichas células eucariotas (y en particular las células de mamíferos) son más probables que las células procariotas para ensamblar y secretar un anticuerpo correctamente plegado e inmunológicamente activo.

[0098] Las células huésped de mamífero preferidas para expresar los anticuerpos recombinantes de la presente invención incluyen ovario de hámster chino (células CHO) (incluyendo células dhfr-CHO, descritas en Urlaub y Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216-4220, utilizadas con un marcador seleccionable DHFR, por ejemplo, tal como se describe en R.J. Kaufman y P.A. Sharp (1982) Mol. Biol. 159: 601-621), células de mieloma NS0, células COS y células SP2. Cuando los vectores de expresión recombinantes que codifican genes de anticuerpos se introducen en células huésped de mamífero, los anticuerpos se producen cultivando las células huésped durante un período de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células huésped o, más preferiblemente, la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el que se desarrollan las células huésped. Los anticuerpos pueden recuperarse del medio de cultivo utilizando métodos estándar de purificación de proteínas.

[0099] Las células huésped también se pueden utilizar para producir fragmentos de anticuerpos funcionales, tales como fragmentos Fab o moléculas scFv. Se entenderá que las variaciones sobre el procedimiento anterior están dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, puede ser deseable transfectar una célula huésped con ADN que codifica fragmentos funcionales de la cadena ligera y/o la cadena pesada de un anticuerpo de la presente invención. La tecnología de ADN recombinante también puede usarse para extraer parte, o todo, el ADN que codifica una o ambas de las cadenas ligeras y pesadas que no es necesario para la unión a los antígenos de interés. Las moléculas expresadas a partir de dichas moléculas de ADN truncadas también están comprendidas por los anticuerpos de la presente invención. Además, los anticuerpos bifuncionales pueden producirse en el que una cadena pesada y una cadena ligera son un anticuerpo de la presente invención y la otra cadena pesada y ligera son específicas para un antígeno distinto de los antígenos de interés por reticulación de un anticuerpo de la presente invención a un segundo anticuerpo mediante métodos estándar de reticulación química.

[0100] En un sistema preferido para la expresión recombinante de un anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, de la presente invención de unión al antígeno, se introduce un vector de expresión recombinante que codifica tanto la cadena pesada de anticuerpo como la cadena ligera del anticuerpo en células CHO dhfr- mediante

transfección mediada por fosfato de calcio. Dentro del vector de expresión recombinante, los genes de cadena pesada y ligera de anticuerpo están cada uno unidos operativamente a los elementos reguladores del potenciador CMV/promotor AdMLP para impulsar altos niveles de transcripción de los genes. El vector de expresión recombinante también lleva un gen de DHFR, que permite la selección de células CHO que han sido transfectadas con el vector usando selección/amplificación con metotrexato. Las células huésped transformantes seleccionadas se cultivan para permitir la expresión de las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpo y se recupera el anticuerpo intacto del medio de cultivo. Se utilizan técnicas estándar de biología molecular para preparar el vector de expresión recombinante, transfectar las células huésped, seleccionar los transformantes, cultivar las células huésped y recuperar el anticuerpo del medio de cultivo. Adicionalmente, la invención proporciona un método para sintetizar un anticuerpo recombinante de la presente invención mediante el cultivo de una célula huésped de la presente invención en un medio de cultivo adecuado hasta que se sintetiza un anticuerpo recombinante de la presente invención. El método puede comprender además aislar el anticuerpo recombinante del medio de cultivo.

ANTICUERPOS ANTI-TROPONINA

[0101] Las secuencias de CDR del anticuerpo anti-troponina I aisladas descritas en este documento (véanse las tablas 1 y 2) establecen una nueva familia de proteínas de unión a la troponina I, aisladas según la presente invención, y que comprenden polipéptidos que incluyen las secuencias de CDR indicadas en las Tablas 1 y 2 anteriores. Para generar y seleccionar CDR de la presente invención que tienen una actividad de unión a troponina I preferida, se pueden utilizar métodos estándar conocidos en la técnica para la generación de las proteínas de unión de la presente invención y evaluar las características de unión de los mismos, incluyendo, pero sin limitación, los descritos específicamente en este documento.

ANTICUERPOS QUIMÉRICOS ANTI-TROPONINA I

[0102] Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes porciones del anticuerpo se derivan de diferentes especies animales, tales como anticuerpos que tienen una región variable derivada de un anticuerpo monoclonal murino y una región constante de inmunoglobulina humana. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos, tales como los de la presente invención, son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Morrison, Science 229: 1202 (1985); Oi et al, BioTechniques 4; 214 (1986); Gillies et al., (1989) J. Immunol. Methods 125: 191-202; Patente de Estados Unidos Nos. 5.807.715; 4.816.567; y 4.816.397. Además, pueden usarse técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos" (Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 851-855; Neuberger et al, 1984, Nature 312: 604-608; Takeda et al, 1985, Nature 314: 452-454) mediante empalme de genes de una molécula de anticuerpo de ratón de especificidad de antígeno apropiada junto con genes de una molécula de anticuerpo humano de actividad biológica apropiada.

[0103] En una realización, los anticuerpos quiméricos de la presente invención se producen mediante la sustitución de la región constante de cadena pesada de los anticuerpos descritos anteriormente con una región constante de IgG1 humana. En una realización específica, el anticuerpo quimérico de la presente invención comprende una región variable de cadena pesada (V_H) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 y una región variable de cadena ligera (V_L) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28.

ANTICUERPOS INJERTADOS CON CDR ANTI-TROPONINA I

[0104] Los anticuerpos injertados con CDR de la presente invención comprenden secuencias de región variable de cadena pesada y ligera de un anticuerpo humano, en el que una o más de las regiones CDR de V_H y/o V_L se sustituyen por secuencias de CDR de los anticuerpos murinos de la presente invención. Una secuencia de armazón de cualquier anticuerpo humano puede servir como plantilla para el injerto de CDR. Sin embargo, la sustitución de la cadena lineal sobre dicho armazón a menudo conduce a cierta pérdida de afinidad de unión al antígeno. Cuanto más homólogo es un anticuerpo humano al anticuerpo murino original, menos probable es la posibilidad de que la combinación de las CDR murinas con el armazón humano introduzca distorsiones en las CDR que podrían reducir la afinidad. Por lo tanto, es preferible que el armazón variable humana que se elige para reemplazar el armazón variable murino además de las CDR tenga al menos un 65% de identidad de secuencia con el armazón de la región variable del anticuerpo murino. Es más preferible que las regiones variables murinas y humanas, aparte de las CDR, tengan al menos el 70% de identidad de secuencia. Es aún más preferible que las regiones variables humanas y murinas, aparte de las CDR, tengan al menos el 75% de identidad de secuencia. Lo más preferible es que las regiones variables humanas y murinas, aparte de las CDR, tengan al menos el 80% de identidad de secuencia. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos son conocidos en la técnica y se discuten en detalle en el Ejemplo 2.2. (Véase también el documento EP 239.400; Publicación de la solicitud internacional N° WO 91/09967; Patente de Estados Unidos Nos. 5.225.539; 5.530.101; y 5.585.089), de recubrimiento o revestimiento (EP 592 106; EP 519.596; Padlan, Molecular Immunology 28 (4/5): 489-498 (1991); Studnicka et al, Protein Engineering 7 (6): 805-814 (1994); Roguska et al, PNAS 91: 969-973 (1994)), y mezcla aleatoria de cadenas (patente de Estados Unidos No. 5.565.352).

ANTICUERPOS HUMANIZADOS

[0105] Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpo de anticuerpos de especies no humanas que se unen al antígeno deseado que tienen una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de las especies no humanas y regiones de armazón de una molécula de inmunoglobulina humana. Las secuencias de Ig humana conocidas se describen, por ejemplo, www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi; www.atcc.org/phage/hdb.html; www.sciquest.com/; www.abcam.com/; www.antibodyresource.com/onlinecomp.html; www.public.iastate.edu/~about.pedro/research_tools.html; www.mgen.uni-heidelberg.de/SD/IT/IT.html; www.whfreeman.com/immunology/CH-05/kuby05.htm; www.library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html; www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/; www.path.cam.ac.uk/~about.mrc7/m-ikeimages.html; www.antibodyresource.com/; mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html; www.immunologylink.com/; pathbox.wustl.edu/~about.hcenter/index.-html; www.biotech.ufl.edu/~about.hcl/; www.pebio.com/pa/340913/340913.html; www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/; www.m.ehimeu.ac.jp/~about.yasuhito-Elisa.html; www.biodesign.com/table.asp; www.icnet.uk/axp/facs/davies/links.html; www.biotech.ufl.edu/~about.fccl/protocol.html; www.isac-net.org/sites_geo.html; aximtl.imt.unimarburg.de/~about.rek/AEP-Start.html; baserv.uci.kun.nl/~about.jraats/links.html; www.recab.unihd.de/immuno.bme.nwu.edu/; www.mrc-cpe.cam.ac.uk/abt-doc/public/INTRO.html; www.ibt.unam.mx/vir/V_mice.html; imgt.cnusc.fr:8104/; www.biochem.ucl.ac.uk/~about.martin/abs/index.html; antibody.bath.ac.uk/; abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html; www.unizh.ch/~about.honegger/AHOseminar/Slide01.html; www.cryst.bbk.ac.uk/~about.ubcg07s/; www.nimr.mrc.ac.uk/CC/caewg/caewg.htm; www.path.cam.ac.uk/~about.mrc7/h-umanisation/TAHHP.html; www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat_aim.html; www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html; www.cryst.bioc.cam.ac.uk/~abo-ut.fmolina/Webpages/Pept/spottech.html; www.jerini.de/fr_roducts.htm; www.patents.ibm.com/ibm.html. Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health (1983).

[0106] Dichas secuencias importadas se pueden usar para reducir la inmunogenicidad o reducir, mejorar o modificar de unión, afinidad, velocidad de asociación, velocidad de disociación, avidez, especificidad, vida media, o cualquier otra característica adecuada, tal como se conoce en la técnica.

[0107] Los residuos del armazón de las regiones de armazón humanas pueden sustituirse por el residuo correspondiente del anticuerpo dador de CDR para alterar, preferiblemente mejorar, la unión al antígeno. Estas sustituciones de armazón se identifican mediante métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante modelado de las interacciones de las CDR y los residuos de armazón para identificar residuos de armazón importantes para la unión a antígeno y la comparación de secuencias para identificar residuos de armazón inusuales en posiciones particulares. (Véase, por ejemplo, Queen et al, Patente de Estados Unidos N° 5.585.089; Riechmann et al, Nature 332: 323 (1988). Los modelos de inmunoglobulina tridimensionales están habitualmente disponibles y son familiares para los expertos en la técnica. Existen programas informáticos que ilustran y muestran probables estructuras conformacionales tridimensionales de secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. La inspección de estas visualizaciones permite el análisis del papel probable de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, los residuos de FR se pueden seleccionar y combinar a partir de las secuencias consenso y de importación de manera que se consigue la característica deseada del anticuerpo, tal como una mayor afinidad para el antígeno o antígenos dianas. En general, los residuos de CDR están directamente y más sustancialmente implicados en la influencia sobre la unión al antígeno. Los anticuerpos pueden humanizarse usando una variedad de técnicas conocidas en el sector, tales como, pero sin limitación, los descritos en Jones et al, Nature 321: 522 (1986); Verhoeyen et al., Science 239: 1534 (1988)), Sims et al, J. Immunol. 151: 2296 (1993); Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196: 901 (1987), Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA: 4285 (1992); Presta et al, J. Immunol. 151: 2623 (1993), Padlan, Molecular Immunology 28 (4/5): 489-498 (1991); Studnicka et al, Protein Engineering 7 (6): 805-814 (1994); Roguska et al, PNAS 91: 969-973 (1994); publicación de solicitud internacional N° WO 91/09967, PCT: US98/16280, US96/18978, US91/09630, US91/05939, US94/01234, GB89/01334, GB91/01134, GB92/01755; WO90/14443, WO90/14424, WO90/14430, EP 229.246, EP 592.106; EP 519596, EP 239400, patentes de Estados Unidos Nos. 5.565.332, 5.723.323, 5.976.862, 5.824.514, 5.817.483, 5.814.476, 5.763.192, 5.723.323, 5.766.886, 5.714.352, 6.204.023, 6.180.370, 5.693.762, 5.530.101, 5.585.089, 5.225.539; 4.816.567.

PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS Y LÍNEAS CELULARES PRODUCTORAS DE ANTICUERPOS

[0108] Tal como se indicó anteriormente, preferiblemente, los anticuerpos de la presente invención muestran una alta capacidad para unirse específicamente a la troponina I, por ejemplo, tal como se evaluó mediante uno cualquiera de varios ensayos in vitro e in vivo conocidos en la técnica (por ejemplo, ver ejemplos a continuación).

[0109] En ciertas realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada, tal como una región constante IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD. Preferiblemente, la región constante de cadena pesada es una región constante de cadena pesada de IgG1 o una región constante de cadena pesada de IgG4. Además, el anticuerpo puede comprender una región constante de cadena ligera, ya sea una región constante de cadena ligera kappa o una región constante de cadena ligera lambda. Preferiblemente, el anticuerpo comprende una región constante de cadena ligera kappa. Alternativamente, la parte de anticuerpo puede ser, por ejemplo, un fragmento Fab o un fragmento Fv de cadena única.

[0110] Las sustituciones de residuos de aminoácidos en la parte Fc para alterar la función efectora del anticuerpo son conocidas en la técnica (Winter et al., Patente de Estados Unidos Nos. 5.648.260 y 5.624.821). La parte Fc de un anticuerpo media en varias funciones efectoras importantes, por ejemplo, la inducción de citoquinas, ADCC, fagocitosis, citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y la vida media/velocidad de depuración del anticuerpo y los complejos antígeno-anticuerpo. En algunos casos, estas funciones efectoras son deseables para un anticuerpo terapéutico pero en otros casos podría ser innecesario o incluso perjudicial, dependiendo de los objetivos terapéuticos. Algunos isotipos de IgG humana, particularmente IgG1 e IgG3, median en ADCC y CDC a través de la unión a FcγR y complemento C1q, respectivamente. Los receptores de Fc (FcRn) neonatales son los componentes críticos que determinan la vida media de circulación de los anticuerpos. En todavía otra realización, al menos un residuo de aminoácido se sustituye en la región constante del anticuerpo, por ejemplo, la región Fc del anticuerpo, de manera que se alteran las funciones efectoras del anticuerpo.

[0111] Una realización proporciona una proteína de unión marcada en la que un anticuerpo o parte de anticuerpo de la presente invención se derivatiza o une a otra molécula funcional (por ejemplo, otro péptido o proteína). Por ejemplo, una proteína de unión marcada de la presente invención se puede derivar mediante la unión funcional de un anticuerpo o parte de anticuerpo de la presente invención (mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otra manera) a una o más entidades moleculares, tales como otro anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico o un diacuerpo), un agente detectable, un agente citotóxico, un agente farmacéutico, y/o una proteína o péptido que puede mediar en la asociación del anticuerpo o parte de anticuerpo con otra molécula (tal como una región núcleo de estreptavidina o una etiqueta de polihistidina).

[0112] Los agentes detectables útiles con los que un anticuerpo o parte de anticuerpo de la presente invención se pueden derivatizar incluyen compuestos fluorescentes. Los agentes fluorescentes detectables de ejemplo incluyen fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, cloruro de 5-dimetilamina-1-naftalenosulfonilo, ficoeritrina y similares. Un anticuerpo también puede derivatizarse con enzimas detectables, tales como fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante, glucosa oxidasa y similares. Cuando un anticuerpo se derivatiza con una enzima detectable, se detecta mediante la adición de reactivos adicionales que la enzima utiliza para producir un producto de reacción detectable. Por ejemplo, cuando el agente detectable peroxidasa de rábano está presente, la adición de peróxido de hidrógeno y diaminobencidina conduce a un producto de reacción coloreado, que es detectable. También puede derivatizarse un anticuerpo con biotina, y detectarlo a través de una medición indirecta de la unión a avidina o estreptavidina.

[0113] Otra realización de la presente invención proporciona cristales de anticuerpos anti-troponina I completos y fragmentos de los mismos, y formulaciones y composiciones que comprenden dichos cristales. En una realización, el anticuerpo cristalizado o fragmento tiene una mayor vida media in vivo que el homólogo soluble del anticuerpo o fragmento. En otra realización, el anticuerpo o fragmento retiene la actividad biológica después de la cristalización.

[0114] El anticuerpo cristalizado o fragmento de la presente invención se pueden producir según los métodos conocidos en la técnica y tal como se describe en la publicación de solicitud internacional Nº WO 02/072636. En otra realización de la presente invención, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende uno o más residuos de carbohidrato. La producción de proteína in vivo emergente puede someterse a procesamiento adicional, conocido como modificación post-traducciona. En particular, los residuos de azúcar (glicosilo) pueden añadirse enzimáticamente, un proceso conocido como glicosilación. Las proteínas resultantes que llevan cadenas laterales de oligosacáridos unidos covalentemente se conocen como proteínas glicosiladas o glicoproteínas. Los anticuerpos son glicoproteínas con uno o más residuos de carbohidratos en el dominio Fc, así como el dominio variable. Los residuos de carbohidrato en el dominio Fc tienen efecto importante en la función efectora del dominio Fc, con un efecto mínimo sobre la unión a antígeno o la vida media del anticuerpo (R. Jefferis, Biotechnol. Prog. 21 (2005), pág. 11-16). En cambio, la glicosilación del dominio variable puede tener un efecto sobre la actividad de unión a antígeno del anticuerpo. La glicosilación en el dominio variable puede tener un efecto negativo sobre la afinidad de unión del anticuerpo, probablemente debido al impedimento estérico (Co, M.S., et al., Mol. Immunol. (1993) 30: 1361-1367), o dar lugar a un aumento de la afinidad por el antígeno (Wallick, S.C., et al, Exp. Med. (1988) 168: 1099-1109; Wright, A., et al, EMBO J. (1991) 10: 2717 2723).

[0115] Un aspecto de la presente descripción está dirigida a la generación de mutantes del sitio de glicosilación en la se ha mutado el sitio de glicosilación und o a O o N de la proteína de unión. Un experto en la materia puede generar dichos mutantes usando tecnologías estándar bien conocidas. La creación de mutantes del sitio de glicosilación que retienen la actividad biológica, pero que han aumentado o disminuido la actividad de unión, son otro objeto de la presente descripción.

[0116] En aún otra realización, se modifica la glicosilación del anticuerpo o parte de unión a antígeno de la presente invención. Por ejemplo, se puede fabricar un anticuerpo aglicosilado (es decir, el anticuerpo carece de glicosilación). La glicosilación se puede alterar para, por ejemplo, aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Dichas modificaciones con carbohidratos se puede lograr mediante, por ejemplo, la alteración de uno o más sitios de glicosilación dentro de la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, se pueden realizar una o más sustituciones de aminoácidos que dan lugar a la eliminación de uno o más sitios de glicosilación de la región variable para eliminar de

ese modo la glicosilación en ese sitio. Dicha aglicosilación puede aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Dicha estrategia se describe con más detalle en la publicación de solicitud internacional nº WO 03/016466A2, y las patentes de Estados Unidos Nos. 5.714.350 y 6.350.861.

[0117] Adicional o alternativamente, un anticuerpo modificado de la presente invención puede fabricarse para que tenga un tipo alterado de glicosilación, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tiene cantidades reducidas de residuos fucosilo o un anticuerpo que tiene más estructuras de GlcNAc biseccionadas. Dichos patrones de glicosilación alterados se han demostrado que aumentan la capacidad de ADCC de los anticuerpos. Dichas modificaciones con carbohidratos se pueden lograr mediante, por ejemplo, la expresión del anticuerpo en una célula huésped con la maquinaria de glicosilación alterada. Las células con la maquinaria de glicosilación alterado se han descrito en la técnica y se pueden utilizar como células huésped en las que expresar los anticuerpos recombinantes de la presente invención para producir de este modo un anticuerpo con la glicosilación alterada. Véase, por ejemplo, Shields, RL et al. (2002) J. Biol. Chem. 277: 26.733-26.740; Umana et al. (1999) Nat. Biotech. 17: 176-1, así como, la Patente Europea No: EP 1176195; Publicación de solicitud internacional Nos. WO 03/035835 y WO 99/5434280.

[0118] La glicosilación de proteínas depende de la secuencia de aminoácidos de la proteína de interés, así como de la célula huésped en la que se expresa la proteína. Diferentes organismos pueden producir diferentes enzimas de glicosilación (por ejemplo, glicosiltransferasas y glicosidasas), y tienen diferentes sustratos (azúcares de nucleótidos) disponibles. Debido a estos factores, el patrón de glicosilación de proteínas, y la composición de los residuos de glicosilo, pueden diferir dependiendo del sistema huésped en el que se expresa la proteína en particular. Los residuos de glicosilo útiles en la invención pueden incluir, pero sin limitación, glucosa, galactosa, manosa, fucosa, N-acetilglucosamina y ácido siálico. Preferiblemente, la proteína de unión glicosilada comprende los residuos de glicosilo de tal manera que el patrón de glicosilación es humano.

[0119] Es conocido para los expertos en la técnica que la diferente glicosilación de proteínas puede dar lugar a diferentes características de proteínas. Por ejemplo, la eficacia de una proteína terapéutica producida en un microorganismo huésped, tal como levadura, y glicosilada utilizando la ruta endógena de levadura puede reducirse en comparación con la de la misma proteína expresada en una célula de mamífero, tal como una línea celular CHO. Dichas glicoproteínas también pueden ser inmunogénicas en seres humanos y muestran una vida media reducida in vivo después de la administración. Los receptores específicos en los seres humanos y otros animales pueden reconocer residuos de glicosilo específicos y promover la rápida depuración de la proteína del torrente sanguíneo. Otros efectos adversos pueden incluir cambios en el plegado de proteínas, solubilidad, susceptibilidad a las proteasas, tráfico, transporte, compartimentación, secreción, reconocimiento por otras proteínas o factores, antigenicidad, o alergenidad. Por consiguiente, un médico puede preferir una proteína terapéutica con una composición y patrón de glicosilación específicos, por ejemplo una composición y patrón de glicosilación idénticos, o al menos similares, a los producidos en células humanas o en las células específicas de especie del animal objetivo pretendido.

[0120] La expresión proteínas glicosiladas diferentes de las de una célula huésped puede conseguirse modificando genéticamente la célula huésped para expresar enzimas de glicosilación heterólogas. Utilizando técnicas conocidas en el sector, un médico puede generar anticuerpos o partes de unión a antígeno de los mismos que muestran glicosilación de la proteína humana. Por ejemplo, se han modificado genéticamente cepas de levadura para expresar enzimas de glicosilación no naturales, de manera que las proteínas glicosiladas (glicoproteínas) producidas en estas cepas de levadura muestran una glicosilación de la proteína idéntica a la de las células animales, especialmente células humanas (Publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos Nos. 20040018590 y 20020137134 y publicación de solicitud internacional No. WO 05/100584 A2).

[0121] El término "proteína de unión multivalente" se utiliza en esta memoria para indicar una proteína de unión que comprende dos o más sitios de unión a antígeno. La proteína de unión multivalente está diseñada preferentemente para que tenga tres o más sitios de unión a antígeno, y generalmente no es un anticuerpo de origen natural. El término "proteína de unión multiespecífica" se refiere a una proteína de unión capaz de unirse a dos o más dianas relacionadas o no relacionadas. Las proteínas de unión de Dominio de doble variable (DVD), tal como se utilizan en este documento, son proteínas de unión que comprenden dos o más sitios de unión a antígeno y son proteínas de unión tetravalentes o multivalentes. Dichas DVD pueden ser monoespecíficas, es decir, capaces de unirse a un antígeno o multiespecífica, es decir, capaces de unirse a dos o más antígenos. A las proteínas de unión DVD que comprenden dos polipéptidos DVD de cadena pesada y dos polipéptidos DVD de cadena ligera se hace referencia como Ig DVD. Cada mitad de una Ig DVD comprende un polipéptido DVD de cadena pesada y un polipéptido DVD de cadena ligera, y dos sitios de unión a antígeno. Cada sitio de unión comprende un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera con un total de 6 CDR implicadas en la unión al antígeno por sitio de unión a antígeno. Las proteínas de unión DVD y los métodos de fabricación de las proteínas de unión DVD se describen en la solicitud de patente de Estados Unidos No. 11 / 507.050.

[0122] Un aspecto de la descripción se refiere a una proteína de unión DVD que comprende proteínas de unión capaces de unirse a la troponina I. Preferiblemente, la proteína de unión DVD es capaz de unirse a la troponina I y una segunda diana. La presente descripción también abarca proteínas de unión de dominio de triple variable (TVD)

en las que el anticuerpo es capaz de unirse a troponina I, así como a dos dianas adicionales (es decir, una segunda y tercera dianas).

[0123] Además de las proteínas de unión, la presente descripción también se refiere a un anticuerpo anti-idiotípico (anti-Id) específico para dichas proteínas de unión de la descripción. Un anticuerpo anti-Id es un anticuerpo que reconoce determinantes únicos asociados generalmente con la región de unión al antígeno de otro anticuerpo. El anti-Id se puede preparar mediante la inmunización de un animal con la proteína de unión (por ejemplo, anticuerpo de interés) o una región que contenga de la misma. El animal inmunizado reconocerá y responderá a los determinantes idiotípicos del anticuerpo inmunizante y producirá un anticuerpo anti-Id. El anticuerpo anti-Id también se puede usar como un "inmunógeno" para inducir una respuesta inmune en aún otro animal, produciendo un anticuerpo denominado anti-anti-Id.

[0124] Además, se entenderá por un experto en la materia que una proteína de interés puede expresarse usando una biblioteca de células huésped manipuladas genéticamente para expresar diversas enzimas de glicosilación, de tal manera que las células huésped miembros de la biblioteca producen la proteína de interés con patrones de glicosilación variantes. Un médico puede entonces seleccionar y aislar la proteína de interés con determinados patrones de glicosilación novedosos. Preferiblemente, la proteína que tiene un patrón de glicosilación nuevo particularmente seleccionado muestra propiedades biológicas mejoradas o alteradas.

USOS DE DIAGNÓSTICO DE ANTICUERPOS ANTI-TROPONINA I

[0125] Dada su capacidad para unirse a la troponina I, los anticuerpos anti-troponina I, o partes de los mismos, de la presente invención pueden utilizarse para detectar la troponina I (por ejemplo, en una muestra biológica, tal como suero, sangre completa, CSF, tejido cerebral o plasma), usando un ensayo competitivo o no competitivo inmunoensayo convencional, tal como, por ejemplo, un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA), un ensayo inmunométrico o inmunohistoquímica de tejidos. Por tanto, la presente invención proporciona un método para detectar la troponina I en una muestra biológica que comprende poner en contacto una muestra biológica con un anticuerpo, o parte de anticuerpo, de la presente invención y detectar el anticuerpo (o parte de anticuerpo) unido a la troponina I o el anticuerpo no unido (o parte de anticuerpo), para detectar de ese modo la troponina I en la muestra biológica. El anticuerpo está directa o indirectamente marcado con una sustancia detectable para facilitar la detección del anticuerpo unido o no unido. Las sustancias detectables adecuadas incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes y materiales radioactivos. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, o acetilcolinesterasa; ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; y ejemplos de materiales radiactivos adecuados incluyen ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho , o ^{153}Sm .

[0126] Como alternativa a marcar el anticuerpo, la troponina I pueden analizarse en fluidos biológicos mediante un inmunoensayo de competición utilizando patrones de troponina I recombinante marcados con una sustancia detectable y un anticuerpo anti-troponina I no marcado. En este ensayo, se combinan la muestra biológica, los patrones de troponina I recombinantes marcados y el anticuerpo anti-troponina I, y se determina la cantidad de patrón de troponina I recombinante marcado unido al anticuerpo no marcado. La cantidad de troponina I en la muestra biológica es inversamente proporcional a la cantidad de patrón de troponina I recombinante marcado unido al anticuerpo anti-troponina I.

[0127] En particular, en una realización de la presente invención, uno o más de los anticuerpos de la presente invención se recubren sobre una fase sólida (o están en una fase líquida). La prueba o muestra biológica (por ejemplo, suero, plasma, orina, etc.) se pone en contacto a continuación con la fase sólida. Si los antígenos de troponina I están presentes en la muestra, dichos antígenos se unen a los anticuerpos en la fase sólida y a continuación se detectan mediante un método directo o indirecto. El método directo comprende simplemente detectar la presencia del propio complejo y por lo tanto la presencia de los antígenos. Cabe señalar que se puede utilizar el anticuerpo completo o un fragmento del mismo en relación con los anticuerpos recubiertos en la fase sólida. (Para los fines de la presente invención, un "fragmento" o "parte" de un anticuerpo se definen como una subunidad del anticuerpo que reacciona de la misma manera, funcionalmente, que el anticuerpo completo con respecto a las propiedades de unión.)

[0128] Tal como se mencionó anteriormente, en el método indirecto, se añade un conjugado al antígeno unido. El conjugado comprende un segundo anticuerpo, que se une al antígeno unido, unido a un compuesto generador de señales o marcador. Si el segundo anticuerpo se une al antígeno unido, el compuesto generador de señales genera una señal medible. Dicha señal indica a continuación la presencia del antígeno (es decir, troponina I) en la muestra de prueba.

[0129] Los ejemplos de fases sólidas usadas en inmunoensayos de diagnóstico son materiales porosos y no porosos, partículas de látex, partículas magnéticas, micropartículas (véase la Patente de Estados Unidos No.

5.705.330.), microesferas, membranas, pocillos de microtitulación y tubos de plástico. La elección del material de fase sólida y el método de marcaje del antígeno o anticuerpo presente en el conjugado, si se desea, se determinan en base a las características de rendimiento del formato de ensayo deseado.

[0130] Tal como se señaló anteriormente, el conjugado (o reactivo indicador) comprenderá un anticuerpo (o quizás anti-anticuerpo, dependiendo del ensayo), unido a un compuesto generador de señales o marcador. Este compuesto generador de señales o "marcador" es en sí mismo detectable o se pueden hacer reaccionar con uno o más compuestos adicionales para generar un producto detectable. Los ejemplos de compuestos generadores de señales incluyen cromógenos, radioisótopos (por ejemplo, ^{125}I , ^{131}I , ^{32}P , ^3H , ^{35}S y ^{14}C), compuestos quimioluminiscentes (por ejemplo, acridinio), partículas (visibles o fluorescentes), ácidos nucleicos, agentes complejantes, o catalizadores, tales como enzimas (por ejemplo, fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida, peroxidasa de rábano picante, beta-galactosidasa y ribonucleasa). En el caso del uso de enzimas (por ejemplo, fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano picante), la adición de un sustrato cromogénico, fluorogénico, o lumogénico en la generación de una señal detectable. También son útiles otros sistemas de detección, tales como fluorescencia resuelta en el tiempo, fluorescencia de reflexión interna, la amplificación (por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa) y espectroscopía Raman.

[0131] Tal como se señaló anteriormente, los ejemplos de fluidos biológicos que pueden ser analizados por los inmunoensayos anteriores incluyen plasma, orina, sangre completa, sangre completa seca, suero, líquido cefalorraquídeo, saliva, lágrimas, lavados nasales o extractos acuosos de tejidos y células.

[0132] Además, también debe tenerse en cuenta que el anticuerpo de captura inicial (para la detección de antígenos de troponina I) utilizado en el inmunoensayo puede ser covalente o no covalentemente (por ejemplo, iónica, hidrofóbico, etc.) unido a la fase sólida. Los agentes de unión para la unión covalente son conocidos en la técnica y pueden ser parte de la fase sólida o derivatizarse antes del recubrimiento.

[0133] Además, los ensayos y kits de la presente invención opcionalmente se pueden adaptar u optimizar para sistemas de ensayo de punto de atención, incluyendo el sistema de inmunoensayo electroquímico Abbot's Point of Care (i-STATTM). Los inmunosensores y los métodos de fabricación y su funcionamiento en los dispositivos de prueba de un solo uso se describen, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos No. 5.063.081 y la solicitud de patente de los Estados Unidos publicadas Nos. 20030170881, 20040018577, 20050054078, 20060160164.

[0134] Naturalmente, cualquiera de los formatos de ejemplo de este documento y cualquier ensayo o kit según la presente invención, se puede adaptar u optimizar para su uso en sistemas automatizados y semi-automatizados (incluyendo aquellos en los que hay una fase sólida que comprende una micropartícula), tal como se describe, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos Nos. 5.089.424 y 5.006.309, y tal como, por ejemplo, se comercializa por Abbott Laboratories (Abbott Park, Ill.) Incluyendo, pero sin limitación, las plataformas ARCHITECT®, AXSYM, IMX, PRISM, y Quantum II de Abbott, así como otras plataformas.

[0135] Otros formatos de ensayo que pueden usarse para los propósitos de la presente invención incluyen, por ejemplo, una prueba rápida, una transferencia Western, así como el uso de partículas paramagnéticas en, por ejemplo, un ensayo ARCHITECT® (véase Frank Quinn, The immunoassay Handbook, Segunda edición, editado por David Wild, páginas 363-367, 2001).

[0136] Dichos formatos son conocidos por los expertos en la técnica.

[0137] También cabe señalar que los elementos de los ensayos descritos anteriormente son particularmente adecuados para su uso en forma de un kit. El kit también puede comprender un recipiente, tal como un vial, botella o tira. Estos kits también pueden contener viales o recipientes de otros reactivos necesarios para realizar el ensayo, tales como lavado, procesado y reactivos indicadores.

COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

[0138] La invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, de la presente invención y un portador farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos de la presente invención son para el uso en, pero sin limitación, el diagnóstico, la detección, o el seguimiento de un trastorno, en la prevención, el tratamiento, el manejo, o la mejora de un trastorno o uno o más síntomas del mismo, y/o en investigación. En una realización específica, una composición comprende uno o más anticuerpos de la presente invención. En otra realización, la composición farmacéutica comprende uno o más anticuerpos de la presente invención y uno o más agentes profilácticos o terapéuticos distintos de los anticuerpos de la presente invención para tratar un trastorno en el que la actividad de la troponina I es perjudicial. Preferiblemente, los agentes profilácticos o terapéuticos conocidos por ser útiles para o haber sido o que actualmente se utilizan en la prevención, tratamiento, manejo, o mejora de un trastorno o uno o más de los síntomas del mismo. De acuerdo con estas realizaciones, la composición puede comprender además un portador, diluyente o excipiente.

[0139] Los anticuerpos y partes de anticuerpo de la presente invención se pueden incorporar en composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración a un sujeto. Habitualmente, la composición farmacéutica comprende un anticuerpo o parte de anticuerpo de la presente invención y un portador farmacéuticamente aceptable. Tal como se usa en este documento, "portador farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y agentes que retrasan la absorción, y similares, que son fisiológicamente compatibles. Ejemplos de portadores farmacéuticamente aceptables incluyen uno o más de agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como combinaciones de los mismos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol, o cloruro de sodio en la composición. Los portadores farmacéuticamente aceptables pueden comprender además cantidades menores de sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o tampones, que aumentan la vida útil o la eficacia del anticuerpo o parte de anticuerpo.

[0140] Se conocen varios sistemas de liberación y se pueden usar para administrar uno o más anticuerpos de la presente invención o la combinación de uno o más anticuerpos de la presente invención y un agente profiláctico o agente terapéutico útil para la prevención, manejo, tratamiento o mejora de un trastorno o uno o más de síntomas del mismo, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el anticuerpo o fragmento de anticuerpo, endocitosis mediada por receptor (véase, por ejemplo, Wu y Wu, J. Biol. Chem. 262: 4.429-4.432 (1987)), construcción de un ácido nucleico como parte de un vector retroviral o de otro tipo, etc. Los métodos de administración de un agente profiláctico o terapéutico de la presente invención incluyen, pero sin limitación, la administración parenteral (por ejemplo, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea), administración epidural, administración intratumoral, y administración en la mucosa (por ejemplo, vías intranasal y oral). Además, se puede emplear la administración pulmonar, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y una formulación con un agente de aerosolización. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Nos. 6.019.968, 5.985.320, 5.985.309, 5.934.272, 5.874.064, 5.855.913, 5.290.540, y 4.880.078; y las publicaciones de solicitud internacional Nos. WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346, y WO 99/66903, cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento como referencia su totalidad. En una realización, un anticuerpo de la presente invención, la terapia de combinación, o una composición de la presente invención, se administran utilizando la tecnología de administración de fármacos pulmonar Alkermes AIR® (Alkermes, Inc., Cambridge, Mass.). En una realización específica, los agentes profilácticos o terapéuticos de la presente invención se administran por vía intramuscular, intravenosa, intratumoral, oral, intranasal, pulmonar, o subcutánea. Los agentes profilácticos o terapéuticos pueden administrarse por cualquier vía conveniente, por ejemplo por infusión o inyección en bolo, por absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y se pueden administrar junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local.

[0141] En una realización específica, puede ser deseable administrar los agentes profilácticos o terapéuticos de la presente invención localmente al área en necesidad de tratamiento; esto puede lograrse mediante, por ejemplo, y no a modo de limitación, infusión local, mediante inyección, o por medio de un implante, siendo dicho implante de un material poroso o no poroso, incluyendo membranas y matrices, tales como membranas sialásticas, polímeros, matrices fibrosas (por ejemplo, Tissuel® o matrices de colágeno. En una realización, se administra una cantidad eficaz de uno o más anticuerpos de los antagonistas de la presente invención localmente al área afectada a un sujeto para prevenir, tratar, manejar, y/o mejorar un trastorno o un síntoma del mismo. En otra realización, se administra una cantidad eficaz de uno o más anticuerpos de la presente invención localmente al área afectada en combinación con una cantidad eficaz de una o más terapias (por ejemplo, uno o más agentes profilácticos o terapéuticos) distintos de un anticuerpo de la presente invención de un sujeto para prevenir, tratar, manejar y/o mejorar un trastorno o uno o más de síntomas del mismo.

[0142] En otra realización, el agente profiláctico o terapéutico se puede liberar en un sistema de liberación controlada o de liberación prolongada. En una realización, se puede usar una bomba para conseguir una liberación controlada o prolongada (véase Langer, supra; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:20; Buchwald et al, 1980, Surgery 88: 507; Saudek et al., 1989, N. Engl. J. Med. 321: 574). En otra realización, pueden utilizarse materiales poliméricos para lograr la liberación controlada o prolongada de las terapias de la presente invención (véase, por ejemplo, Medical Applications of Controlled Release, Langer y Wise (eds.), CRC Pres., Boca Ratón, FL (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen y Ball (eds.), Wiley, Nueva York (1984); Ranger y Peppas, 1983, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61; ver también Levy et al, 1985, Science 228: 190; During et al., 1989, Ann. Neurol. 25: 351; Howard et al., 1989, J. Neurosurg. 71: 105); Patente de Estados Unidos. Nº 5.679.377; Patente de Estados Unidos. Nº 5.916.597; Patente de Estados Unidos. Nº 5.912.015; Patente de Estados Unidos. Nº 5.989.463; Patente de Estados Unidos. Nº 5.128.326; publicación de solicitud internacional Nº WO 99/15154; y publicación de solicitud internacional Nº WO 99/20253. Los ejemplos de polímeros usados en formulaciones de liberación prolongada incluyen, pero sin limitación, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), poli(metacrilato de metilo), poli(ácido acrílico), poli(acetato de vinilo-etileno), poli(ácido metacrílico), poliglicólidos (PLG), polianhídridos, poli(N-vinilpirrolidona), poli(alcohol vinílico), poli(acrilamida), poli(etilenglicol), poliláctidos (PLA), poli(láctido-glicólidos) (PLGA), y poliortoésteres. En una realización preferida, el polímero utilizado en una formulación de liberación prolongada es inerte, libre de impurezas lixiviables, estables al almacenamiento, estéril y biodegradable. En todavía otra realización, se puede colocar un sistema de liberación controlada o prolongada en las

proximidades de la diana profiláctica o terapéutica, requiriendo así sólo una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, en *Medical Applications of Controlled Release*, supra, vol. 2, pág. 115-138 (1984)).

[0143] Los sistemas de liberación controlada se discuten en la revisión de Langer (1990, *Science* 249: 1527-1533). Se puede usar cualquier técnica conocida por un experto en la materia para producir formulaciones de liberación prolongada que comprenda uno o más agentes terapéuticos de la presente invención. Véase, por ejemplo, patente de Estados Unidos N° 4.526.938 publicación de solicitud internacional N° WO 91/05548, publicación de solicitud internacional No. WO 96/20698, Ning et al, 1996, "Intratumoral Radio immunotherapy of a Human Colon Xenograft using a Sustained-Release Gel", *Radiotherapy and Oncology* 39: 179-189, Song et al, 1995, "Antibody mediated lung targeting of lung-circulating emulsions", *PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology* 50: 372-397, Cleek et al, 1997, "Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application", *Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 24: 853-854, y Lam et al, 1997, "Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery" *Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.* 24: 759-760.

[0144] Debe entenderse que los anticuerpos de la presente invención o parte de unión a antígeno de los mismos pueden usarse solos o en combinación con uno o más agentes adicionales, por ejemplo, un agente terapéutico (por ejemplo, una molécula pequeña o agente biológico), seleccionándose dicho agente por el experto en la materia para su propósito previsto. El agente adicional también puede ser un agente que proporciona una característica beneficiosa a la composición terapéutica por ejemplo, un agente que afecta a la viscosidad de la composición.

[0145] Además, debe entenderse que las combinaciones que se van a incluir dentro de esta invención son las combinaciones útiles para su propósito previsto. Los agentes expuestos a continuación son ilustrativos para los propósitos y no pretenden ser limitantes. Las combinaciones, que son parte de esta invención, pueden ser los anticuerpos de la presente invención y al menos un agente adicional seleccionado de la lista de abajo. La combinación también puede incluir más de un agente adicional, por ejemplo, dos o tres agentes adicionales si la combinación es tal que la composición formada puede realizar su función prevista.

[0146] Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden incluir una "cantidad terapéuticamente eficaz" o una "cantidad profilácticamente eficaz" de un anticuerpo o parte de anticuerpo de la presente invención. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o parte de anticuerpo puede determinarse por una persona experta en la materia y puede variar de acuerdo con factores, tales como el estado de la enfermedad, edad, sexo y peso del individuo, y la capacidad del anticuerpo o parte del anticuerpo para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es aquella en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo o parte de anticuerpo, son superados por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado profiláctico deseado. Habitualmente, dado que se usa una dosis profiláctica en sujetos antes o en una etapa más temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

[0147] Habiendo descrito ahora la presente invención en detalle, la misma se entenderá más claramente por referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen solamente para propósitos de ilustración y no están destinados a limitar el alcance de la presente invención.

EJEMPLOS

EJEMPLO I

GENERACIÓN Y AISLAMIENTO DE 19C7

Identificación de genes de inmunoglobulina

[0148] Se aisló ARN mensajero de células de hibridoma anti-TnI 19C7-144 subclonadas. (La línea celular de hibridoma 19C7 TnI se describe en la publicación de solicitud de Patente de Estados Unidos N° US2006/0018897.) Se utilizó ARNm de TnI 19C7 en una reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa utilizando un kit de un conjunto de cebadores de Ig de ratón adquirido de Novagen (Novagen (que es una filial de Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), Cat N° 69831-3) con cebadores específicos de genes de inmunoglobulina contenidos en el kit. Los productos de PCR resultantes se secuenciaron y por lo tanto se identificaron los genes de las cadenas ligera variable y pesada variable de inmunoglobulina (véase la figura 2).

Clonación de genes de la región variable de TnI 19C7 en el vector pYD41

[0149] Se utilizó un sistema de expresión en levadura para expresar proteínas anti-TnI de tipo salvaje o no mutadas (descritas en este documento *infra*) y una biblioteca de proteínas anti-TnI en la superficie de levadura como una fusión a la proteína de levadura AGA2. Se utilizó un vector de expresión en levadura denominado PYD (Invitrogen,

Carlsbad, California), ya que permite la clonación del gen de anti-TnI en el extremo C-terminal del gen de AGA2, un factor de apareamiento en la levadura (véase, Boder y Wittrup, Nature Biotechnology, 15: 553-557 (junio de 1997)). Otras características críticas del vector PYD incluyen un promotor inducible por galactosa y un epítipo etiqueta, V5, en el extremo C-terminal del gen de anti-TnI insertado (véase la figura 12).

[0150] La plataforma de expresión en levadura utiliza un formato de anticuerpo conocido como el fragmento variable de cadena única. En el formato scFv, el dominio pesado variable está conectado al dominio ligero variable a través de un enlazador flexible (dominio pesado variable - enlazador GPAKELTPLKEAKVS (SEQ ID NO: 58) – dominio ligero variable).

[0151] Se utilizó la PCR de extensión por solapamiento único (SOE) para combinar los genes de cadena variable pesada (VH) y los genes de cadena variable ligera (VL) para la construcción scFV TnI 19C7 (figura 2, y SEQ ID NOs: 54 y 55). El ADN de scFv TnI 19C7 se clonó en el vector de expresión en levadura pYD41 utilizando los sitios de restricción de vectores *Sfi*I y *Xho*I. El vector pYD41-TnI 19C7scFv se transformó en DH5 α E. coli. A continuación, se aisló el ADN plasmídico del E. coli y el inserto de scFv TnI 19C7 se secuenció para asegurar que el scFv se clonó en el armazón con la proteína AGA2.

[0152] El sitio de clonación para el scFv en el vector de expresión en levadura pYD41 está en un ORF que incluye los siguientes genes: AGA2-enlazador de unión 41-X-epítipo etiqueta press X-cadena pesada variable de TnI 19C7 -enlazador 40- cadena ligera variable de TnI 19C7- epítipo etiqueta V5- etiqueta (SEQ ID NO: 29). Además, la cepa de levadura EBY100 es un auxótrofo de triptófano y el vector pYD41 codifica para el triptófano como marcador de selección del sistema.

Transformación en la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* EBY100

[0153] El plásmido de expresión en levadura, pYD41-TnI 19C7 scFv, se transformó en *S. cerevisiae* EBY100 usando el método de Gietz y Schiestl (Ver Schiestl y Gietz, Current Genetics, 16 (5-6): 339-46 (diciembre de 1989)). Las diluciones de la reacción de transformación se sembraron en placas selectivas de glucosa (glucosa al 2% (0,67% de base de nitrógeno de levadura, 0,105% de HSM-trp-ura, 1,8% de agar bacteriano, 18,2% de sorbitol, 0,86% de NaH₂PO₄ H₂O, 1,02% Na₂HPO₄ 7H₂O)) y se incubaron a 30°C durante 48-72 horas. Los medios selectivos de glucosa se inocularon con colonias individuales y se desarrollaron con agitación a 30°C durante 16-20 horas. La expresión de proteínas se indujo en las colonias mediante la transferencia de 0,5 DO600 de células/ml (1E7 células/0,50 D/ml) a medio selectivo de galactosa. Las colonias se agitaron a 20°C durante 16-24 horas y después se analizaron mediante el citómetro de flujo FACS Aria para la unión a scTnI-C-2 y anti-V5. (Cabe señalar que scTnI-C-2 es un TnI de una cadena unido (28-110 aa) enlazador-TnC (1-160aa) de Spectral Diagnostics, Toronto, Canadá. ScTnI-C-2 se abrevia como "scTnI-C" para los propósitos de la presente discusión). Para los ensayos de citometría de flujo, las células de levadura que expresan TnI 19C7 scFv se incubaron con scTnI-C-2 o anti-V5 seguido de mAb anti-troponina y anticuerpo de cabra anti-ratón ficoeritrina (GAM:PE) (Figura 3B) o GAM:PE respectivamente (Figura 3A). Los histogramas de la citometría de flujo ilustran la expresión de longitud completa de TnI 19C7 scFv tal como se detecta mediante anti-V5 y la capacidad de TnI 19C7 scFv de unirse a scTnI-C-2.

Análisis de la velocidad de disociación para TnI 19C7 scFv y variantes de TnI 19C7 en levadura

[0154] Las mediciones de la velocidad de disociación de TnI 19C7 scFv y variantes de TnI 19C7 en levadura se realizaron incubando 0.05OD de levadura (1*10⁶ células) con scTnI-C-2 50 nM durante 30-60 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las células se lavaron dos veces con tampón de bloqueo que contenía solución salina tamponada con fosfato a pH 6,8 con 2% de albúmina de suero bovino y 0,2% de Standapol ES-1 (PBS/BSA/Standapol) y se incubaron a temperatura ambiente durante cantidades de tiempo variables (0, 0,25 horas, 0,5 horas, 1 hora, 2 horas, 4,25 horas, 25,5 horas, 50 horas 75 horas y 144 horas (véase la Figura 4). En cada punto de tiempo individual, las células de levadura se transfirieron a hielo para detener la reacción. Las células se lavaron a continuación dos veces con tampón de bloqueo y se suspendieron en el siguiente reactivo de tinción, específicamente, mAb anti-TnI 8E10 a 100 nM. Las células se incubaron en hielo durante 30 minutos, se lavaron dos veces y a continuación se incubaron con anticuerpo de cabra anti-ratón ficoeritrina (GAM:PE). Finalmente, las células se lavaron y analizaron en el citómetro de flujo FACS Aria. La figura 4 muestra los datos de velocidad de disociación representados como unidades de fluorescencia media ("MFU") frente al tiempo (en segundos). Se usó una ecuación de descomposición de primer orden para ajustar los datos. La velocidad de disociación, m2 en la ecuación mostrada en la figura. 4, se ajustó a 0,007 s⁻¹. La vida media de TnI 19C7 scFv (t_{1/2}) fue de aproximadamente 8,5 min (t_{1/2} = ln 2/k_{off}).

[0155] Se utilizó una estrategia de clasificación según la velocidad de disociación para identificar variantes TnI 19C7 mejoradas en la velocidad de disociación de bibliotecas mutagénicas. Por lo tanto, se utilizó la vida media de TnI 19C7 scFv, no mutado o de tipo salvaje ("wt"), para determinar el tiempo apropiado para clasificar las bibliotecas mutagénicas. Las bibliotecas mutagénicas de TnI 19C7 se clasificaron aproximadamente 9 minutos después del lavado de células libres de scTnI-C-2 con las mismas condiciones de ensayo para TnI 19C8 scFv de tipo salvaje.

Análisis de la disociación (KD) en equilibrio de TnI 19C7 scFv y TnI

[0156] Las mediciones de KD de TnI 19C7 scFv y variantes de TnI 19C7 en la levadura se realizaron mediante la incubación de 0,05 DO levadura (1×10^6 células) con concentraciones variables de scTnI-C-2 durante 45-60 minutos a temperatura ambiente. Se utilizó tampón de bloqueo que contenía solución salina tamponada con fosfato a pH 6,8 con 2% de albúmina de suero bovino y 0,2% de Standapol ES-1 (PBS/BSA/Standapol) para lavados y diluciones de reactivos. A continuación, las células se lavaron dos veces y se incubaron durante 30 min con mAb anti-TnI, 8E10. Las células se lavaron de nuevo y se incubaron con ficoeritrina de cabra anti-ratón durante 30 min. Finalmente, las células se lavaron y analizaron en el citómetro de flujo FACS Aria (véase la figura 5). La figura 5 muestra los datos de KD representados como unidades de fluorescencia promedio ("MFU") normalizadas frente a la concentración de scTnI-C-2 (en molaridad). La intensidad promedio de fluorescencia de unión a antígeno normalizada para anticuerpo se representó frente a la concentración del antígeno y se utilizó un ajuste de mínimos cuadrados no lineales ($y = m_1 + m_2 * m_0 / (m_3 + m_0)$) para determinar KD.

Generación de bibliotecas enriquecidas de CDR de TnI 19C7

[0157] La mutagénesis se dirigió a las tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de cadena pesada y las tres de cadena ligera del anticuerpo de TnI 19C7, ya que estos bucles son los principales sitios de contacto a antígeno. Las longitudes de bucle de CDR y la numeración se definieron usando la nomenclatura de Kabat y de modelación AbM de Oxford. Las bibliotecas individuales se compusieron de manera que se incorporan mutaciones aleatorias en cada posición de aminoácidos de la CDR de una sola biblioteca. Se generaron un total de seis bibliotecas correspondientes a una biblioteca por cada CDR.

[0158] Las bibliotecas se generaron mediante la combinación de vector pYD41 digerido con SfiI/XhoI y productos de PCR con levadura EBY100 químicamente competente (véase la figura 7). Se generaron dos productos de PCR para cada biblioteca de CDR para permitir la clasificación por PCR y la recombinación homóloga en levadura. Un producto de PCR utilizó un cebador que se diseñó, de manera que para la longitud completa de la CDR, se usó en la síntesis de cebadores una proporción del 70% de tipo salvaje 70% al 30% de otro nucleótido. Este producto se denominó producto enriquecido (sp) (véase la figura 7). El segundo producto de PCR se diseñó para incluir la parte restante del gen de scFv. Los dos productos de PCR se combinaron y se utilizaron para generar un fragmento variable de cadena sencilla o un producto scFv. El vector digerido (1 ug) y los productos de PCR scFv (5 ug) se combinaron con levadura EBY100 ($5,2 \times 10^6$ - $6,4 \times 10^8$ células) y se transformaron utilizando electroporación. El producto PCR scFv y el vector digerido pYD41 se ciclan durante la transformación debido a la recombinación homóloga facilitada por la superposición de nucleótidos y el mecanismo de reparación de espacios endógenos de la levadura. Se desarrollaron bibliotecas a 30°C durante 48-72 horas en medio selectivo de glucosa y se pasaron de nuevo por medio selectivo de glucosa antes de la inducción de la expresión de la proteína para la clasificación de la biblioteca.

Bibliotecas de CDR mutagénicas de TnI 19C7

[0159] Se clasificaron las bibliotecas de TnI 19C7 en base a una estrategia de clasificación según la velocidad de disociación. Se indujeron bibliotecas mutagénicas de CDR de TnI 19C7 en medio de expresión de galactosa a 20°C durante 18-24 horas. Se incubaron las bibliotecas de TnI 19C7 scFv y TnI 19C7 en levadura con scTnI-C-2 25-50 nM durante 10-15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las células se lavaron dos veces con tampón de bloqueo que contenía solución salinada tamponada con fosfato a pH 6,8 con 2% de albúmina de suero bovino y 0,2% de Standapol ES-1 (PBS/BSA/Standapol) y se incubaron a temperatura ambiente durante 8 min. Las células de levadura se transfirieron a hielo para detener la reacción. A continuación, se lavaron las células dos veces con tampón de bloqueo y se suspendieron en el siguiente reactivo de tinción, específicamente, mAb anti-TnI 8E10 a 100 nM y anti-V5 a 1,5-2 ug/ml. Las células se incubaron en hielo durante 30 minutos, se lavaron dos veces y a continuación se incubaron con 1:200 anticuerpo de cabra anti IgG2a de ratón-ficoeritrina (GAMlgG2a:PE) y con una dilución 1:200 de anticuerpo de cabra anti-IgG1 de ratón-Alexa Fluor488 (GAMlgG1:488). Finalmente, las células se lavaron, se analizaron, y se clasificaron en el citómetro de flujo FACS Aria. Las entradas de clasificación se establecieron en base a la unión a TnI 19C7 no mutada a los 8-9 minutos con un conjunto de entradas para clasificar clones de unión a TnI de longitud completa. Cada clasificación recogió el máximo de 0,1-0,5% de la población de unión a TnI. Las células clasificadas se cultivaron en medio selectivo de glucosa y se cultivaron 18-24 horas a 30°C. Se indujeron las células de la clasificación 1 y se repitió la clasificación durante dos o tres rondas adicionales.

[0160] Después de la última clasificación, las células clasificadas se sembraron en placas selectivas de glucosa y se colocaron a 30°C durante 72 horas. Se inocularon las colonias de levadura individuales de estas bibliotecas en medio selectivo de glucosa, se crioconservaron y se indujeron en medio selectivo de galactosa. A continuación, las colonias individuales se caracterizaron y clasificaron en un ensayo de velocidad de disociación. Se aisló TnI 19C7 AM4 y se identificó a partir del resultado de esta clasificación.

Generación y análisis de clones mutantes combinatorios de TnI 19C7

[0161] Los clones que se caracterizaron por la velocidad de disociación de cada biblioteca de CDR madre o el resultado de la biblioteca de CDR madre total se utilizaron para la construcción de genes de scFv que contenían diferentes emparejamientos de las mutaciones individuales. Esta estrategia permitió la determinación de si las

propiedades de unión se mejoraron adicionalmente tras la combinación de mutaciones individuales. Se construyeron clones combinatorios que contenían diversas mutaciones en cada región CDR mediante amplificación por PCR y se combinaron usando técnicas rutinarias conocidas por los expertos en la materia. Las bibliotecas de mutantes combinatorios se transformaron en la levadura, tal como se describe anteriormente, y se clasificaron dos veces usando las presiones de selección de la velocidad de disociación y la KD. Para la selección por KD, se utilizó scTnI-C 100 pM (ronda 1) y 50 pM (ronda 2) en el experimento de KD descrito anteriormente (Figura 5). Para la clasificación por la velocidad de disociación, la clasificación se llevó a cabo tal como se describe anteriormente con tiempos de incubación después del lavado de separación del antígeno de 3 h 40 min (ronda 1) y 4 h 25 min (ronda 2). Las entradas de la clasificación se establecieron en base a la unión a TnI 19C7 no mutada para cada condición con un conjunto de entradas para clasificar los clones de unión a TnI de longitud completa. Cada clasificación recogió el máximo de 0,1-0,5% de la población de unión a TnI. Las células clasificadas se cultivaron en medio selectivo de glucosa durante 18-24 horas a 30°C. Se indujeron las células de la clasificación 1 y se repitió la clasificación durante dos o tres rondas adicionales.

[0162] Después de la última clasificación, las células clasificadas se sembraron en placas selectivas de glucosa y se colocaron a 30°C durante 72 horas. Se inocularon las colonias de levadura individuales de estas bibliotecas en medio selectivo de glucosa, se crioconservaron y se indujeron en medio selectivo de galactosa. A continuación, las colonias individuales se caracterizaron y clasificaron en un ensayo de velocidad de disociación. Se aislaron TnI 19C7 AM1, AM2 y AM3 y se identificaron a partir del resultado de esta clasificación.

Análisis de variantes de TnI 19C7 seleccionadas

[0163] Los clones seleccionados se caracterizaron inicialmente por las mejoras en KD tal como se describe anteriormente para TnI 19C7 scFv de tipo salvaje. La figura 9 muestra los valores KD de scFv determinados para cuatro clones seleccionados. El clon de TnI 19C7 AM1 mostró la mejor unión a 0,36 nM en comparación con el anticuerpo de TnI 19C7 de tipo salvaje 1,7 nM.

[0164] Las variantes de TnI 19C7 scFv seleccionadas se secuenciaron para determinar las mutaciones de aminoácidos que se expresan. Inicialmente, el ADN plasmídico se aisló de los cultivos en suspensión de levadura utilizando un kit minipreparativo de levadura (Cat No. D2001, Zymo Investigación Orange, CA). Con el fin de obtener ADN plasmídico de calidad de secuenciación, el plásmido del kit minipreparativo de levadura se transformó en DH5α E. coli, y a continuación se purificó a partir del cultivo usando kits minipreparativo de E. coli (Qiagen). A continuación, el ADN plasmídico puro se secuenció usando cebadores específicos del vector pYD41 (pYD41 for-TAGCATGACTGGTGGACAGC (SEQ ID NO: 59) y pYD41rev-CGTAGAATCGAGACCGAG (SEQ ID NO: 60)). Los datos de la secuencia de aminoácidos para las variantes de TnI 19C7 scFv se muestran en la figura 13. Los números de posición se refieren a la posición del aminoácido en la CDR respectiva (enumerado según el método de Kabat).

[0165] En general, la fuente de diversidad de secuencia del clon de tipo salvaje se halló en CDR L2 y CDR H1, mientras que CDR L1 y H3 estaba plegada en un motivo consenso. CDR L3 y CDR H2 permanecieron sin mutar. Los datos de la secuencia para CDR H1 indicaron una preferencia por un cambio conservador en la posición 34 de isoleucina a leucina tal como se identifica en los 3 clones aislados de la biblioteca combinatoria. La secuencia de consenso para CDR H3 indicaba una fuerte preferencia en la posición 100a para tirosina en lugar de triptófano, en la posición 101 para treonina en lugar de alanina, y en la posición 102 para aspartato en lugar de tirosina, tal como se identifica en los 3 clones aislados de la biblioteca combinatoria. A partir de la clasificación de CDR madre en la que se identificó el clon 19C7 AM4, la CDR H3 era la única CDR con mutaciones que eran diferentes del conjunto de secuencias de consenso combinatorias. Específicamente las mutaciones fueron Ala96Phe, Tyr99Ser, Trp100aAla, y Tyr102Asp.

[0166] Los datos de la secuencia consenso para la CDR L1 indicaron una preferencia por treonina en la posición 25, lisina en la posición 27, asparagina en la posición 28, valina en la posición 29 e histidina en la posición 34. Para la CDR L2, cada clon tiene mutaciones únicas o no tiene con sólo TnI 19C7 AM1 y AM2 compartiendo la mutación Ser54Arg.

Clonación y expresión soluble de anticuerpos quiméricos de TnI 19C7 en un sistema de expresión transitoria o estable

[0167] Las variantes de TnI 19C7 seleccionadas se convirtieron en anticuerpos quiméricos de IgG2a ratón-ratón/kappa de ratón y/o IgG₁ ratón-humano/kappa de humano a través de la clonación de los dominios variables de TnI 19C7 en el sistema de vectores de expresión transitoria llamados pBOS (Abbott Bioresearch Center, Worcester, Massachusetts). Más específicamente, se usó PCR para amplificar los genes de la cadena pesada variable y ligera variable con sitios de restricción para la clonación en vectores pBOs separados (Mizushima y Nagata, Nucleic Acids Research, 18: 5322 (1990)). Los genes de cadena pesada variable y ligera variable se ligaron en el vector digerido y desfosforilado y se transformaron en DH5α E. coli. El ADN plasmídico se purificó a partir de E. coli y se transfectó en células 293H utilizando PEI (1 mg/ml). El anticuerpo transitorio se expresó para las siguientes variantes de TnI 19C7: TnI 19C7 wt, AM1, AM2, AM3 y AM4.

[0168] Por ejemplo, utilizando los vectores de cadena pesada y ligera de pBOS Tnl-19C7 AM1, se creó un plásmido de línea celular estable CHO en un procedimiento de clonación de dos etapas. En primer lugar, se ligaron los genes de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable en el armazón a los genes constantes humanos en los plásmidos PBV y PJV (Abbott Bioresearch Center, Worcester, MA), respectivamente, utilizando las enzimas de restricción SrfI/NotI. Las reacciones de unión se transformaron en DH5 α E. coli y el ADN plasmídico se aisló posteriormente de colonias individuales. Se secuenciaron en los sitios de clonación IgG1 humana – cadena pesada variable de ratón Tnl 19C7-pBV y kappa humana – cadena ligera variable de ratón Tnl 19C7-pJV.

[0169] La segunda etapa de clonación implicaba la combinación de los genes de la cadena pesada de IgG₁ y los genes de cadena ligera kappa en una solo vector de línea celular estable. Los vectores IgG1 humana Tnl 19C7 AM1-pBV y kappa humana Tnl 19C7 AM1-pJV se digirieron con AscI/PacI. Los fragmentos de ADN constante kappa humano-VL y constante de IgG₁ humana-VH se purificaron en gel y se ligaron para producir el vector de línea celular estable llamado pBJ- Tnl 19C7 AM1. El plásmido quimérico de cadena pesada/ligera humana de Tnl 19C7 AM1-pBJ se transformó en células CHO utilizando un protocolo de lipofectamina (Invitrogen). Las líneas celulares estables se subclonaron a partir de la transformación inicial. Se ha desarrollado una línea de células CHO estables para el clon AM1 (también referido como "Tnl 19C7AM1 hG1kCHO204") y fue depositado en la American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209 el 11 de febrero 2009 y recibió la designación de depósito PTA-9816.

EJEMPLO II

AFINIDAD RELATIVA DEL CLON DE TROPONINA I 19C7 DE TIPO SALVAJE Y ANTICUERPOS MADURADOS POR AFINIDAD

[0170] Se evaluaron el clon de troponina I 19C7 de tipo salvaje (construcción de ratón completa) y los anticuerpos madurados por afinidad (región constante humana) por la afinidad relativa en un inmunoensayo enzimático de microtitulación. Se recubrieron placas de ensayo de 96 pocillos (NUNC Corporation, Rochester, NY) mediante la adición de 100 μ L/pocillo de una solución de 2 μ g/mL de anticuerpo específico de oveja anti-Fc γ de IgG de ratón (Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pa) o de anticuerpo específico de burro anti-fragmento de Fc γ de IgG de humano (Jackson ImmunoResearch). Ambos anticuerpos se diluyeron en solución salina tamponada con fosfato (PBS, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). Las placas de ensayo se incubaron durante la noche a 15-30°C. Al día siguiente, se extrajo el reactivo de recubrimiento y se añadieron 200 μ L/pocillo de solución de BSA (albúmina de suero bovino [Abbott Laboratories] diluida en PBS). La solución de BSA se incubó en los pocillos de ensayo durante 30 minutos a 15-30°C, se extrajo y los pocillos de ensayo se lavaron mediante la adición de 300 μ L/pocillo de agua destilada (dH₂O, Abbott Laboratories) y aspirando durante tres ciclos de lavado. A continuación, se añadieron 100 μ L/pocillo de muestras de ensayo. Las muestras de ensayo se prepararon mediante la creación de una solución inicial de 2 μ g/mL (en solución BSA) de cada anticuerpo, seguido por diluciones de log 3, en solución de BSA. Las muestras de ensayo se incubaron durante 2-3 horas a 15-30°C, después de lo cual se separaron por aspiración y los pocillos se lavaron con dH₂O tal como se describe anteriormente. A continuación, se añadieron 100 μ L/pocillo de soluciones de antígeno de ensayo a cada pocillo de ensayo. Las soluciones de antígeno de ensayo se crearon mediante primeramente la preparación de una solución 1.000 ng/ml de scTnl-C-2 (aa 28-100 de troponina I cardíaca unida a troponina C cardíaca de longitud completa, Spectral Diagnostics) en solución de BSA, seguido por diluciones de log 2. Las soluciones de antígeno se incubaron en los pocillos de ensayo durante 10 minutos a 15-30°C y a continuación se extrajeron mediante agitación violenta de las soluciones. Las placas de ensayo se lavaron a continuación con dH₂O tal como se describió anteriormente. A continuación, se añadieron 100 μ L/pocillo de anticuerpos anti-troponina I de cabra marcados con biotina (HyTest, diluido a 500 ng/ml en solución de BSA) a cada pocillo de ensayo y se incubaron durante 30 minutos a 15-30°C. A continuación, se separó el anticuerpo por aspiración y los pocillos se lavaron con dH₂O tal como se describe. A continuación, se añadieron 100 μ L/pocillo de una solución de 200 ng/ml (en solución BSA) de peroxidasa de rábano picante marcada con estreptavidina (SA-HRPO, Jackson ImmunoResearch) y se incubaron durante 30 minutos a 15-30°C. El reactivo SA-HRPO se separó a continuación por aspiración y las placas se lavaron tal como se describe. A continuación, se preparó la solución de sustrato disolviendo 1 comprimido de OPD por 10 ml de diluyente de OPD (o-fenilendiamina, ambos de Abbott Laboratories). Se añadieron 100 μ L/pocillo de la solución de sustrato preparada a las placas de ensayo, se incubaron durante aproximadamente 4-5 minutos y a continuación se inactivó la reacción mediante la adición de 100 μ L/pocillo de ácido sulfúrico 1 N (Abbott Laboratories). La señal resultante se leyó a 492 nm usando un fluorómetro óptico. Los resultados del experimento se representaron gráficamente usando el software KaleidaGraph. Se determinó el valor Ag₅₀ (la concentración de antígeno en el 50% de la unión máxima) y se utilizó para comparar los anticuerpos por la afinidad relativa al antígeno ensayado.

EJEMPLO III

USO DE ANTICUERPO MONOCLONAL 19C7 EN UN INMUNOENSAYO

[0171] Se evaluaron el clon de troponina I 19C7 de tipo salvaje (construcción de ratón completa) y los anticuerpos madurados por afinidad (región constante humana) por la afinidad relativa en un analizador de inmunoensayo

ARCHITECT® (Abbott Laboratories). El ensayo fue totalmente automatizado, y el analizador realiza todas las etapas. Se mezclaron micropartículas magnéticas recubiertas con un anticuerpo de ratón anti-troponina I (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) con diferentes niveles de scTnI-C-2 (aa 28-100 de la troponina I cardíaca unida a la troponina cardíaca C de longitud completa (Spectral Diagnostics) y se incubaron durante 18 minutos a 15-30°C. Durante este tiempo, la micropartícula recubierta de anticuerpo se unió a scTnI-C-2. A continuación, se atrajeron las micropartículas a un imán, se aspiró la solución de ensayo restante, y las partículas se lavaron con diluyente de ensayo (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). A continuación, los anticuerpos 19C7 de tipo salvaje o madurados por afinidad, todos marcados con acridinio (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) se añadieron a las micropartículas y se incubaron durante 4 minutos a 15-30°C. A continuación, las micropartículas se atrajeron a un imán, se aspiró la solución de ensayo restante, y las partículas se lavaron con diluyente de ensayo. Se generó una señal (unidades de luz relativas) mediante la adición de soluciones de desactivación y activación (ambos de Abbott Laboratories). Se calcularon las proporciones de las señales y se utilizaron para comparar los anticuerpos. Tal como se puede establecer en base a los resultados mostrados en la figura 11, el anticuerpo AM1 produjo una señal mejor que el anticuerpo de tipo salvaje.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0172]

<110> BROPHY, SUSAN E. TU, BAILIN TYNER, JOAN D. HUANG, DAGANG ZIEMANN, ROBERT N.

<120> ANTICUERPOS CONTRA TROPONINA I Y MÉTODOS DE USO DE LOS MISMOS

<130> 9816W001

<140>

<141> 2010-02-23

<160> 110

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 48

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

<400> 1

gaattcgcgg cccagccggc catggccgag gtccagcttc agcagtca

48

<210> 2

<211> 45

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

<400> 2

cttcaggggc gtcaactcct tggcgggacc tgcagagaca gtgac

45

<210> 3

<211> 45

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

<400> 3

ttgacgcccc tgaaggaggc gaaggtctct gacatcttgc tgact

45

<210> 4

<211> 45

<212> ADN

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético	
	<400> 4	
	gaagggccct ctagactcga gggcggccgc ccgttttatt tccag	45
10	<210> 5	
	<211> 91	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético	
	<400> 5	
	gaaacctggg gcctcagtga ggatattcctg caaggcttct ggatacacat tcactgacta	60
20	caacatacac tgggtgaaac agagccatgg a	91
	<210> 6	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético	
	<400> 6	
30	agaagccttg caggatatcc tcactgaggc	30
	<210> 7	
	<211> 22	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético	
40	<400> 7	
	agtaacgttt gtcagtaatt gc	22
	<210> 8	
45	<211> 108	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético	
	<400> 8	
	agccatggaa agagccttga gtggattgga tatattttatc cttacaatgg tattactggc	60
	tacaaccaga aattcaagag caaggccaca ttgactgtag acagttcc	108
55	<210> 9	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético	
	<400> 9	
65	tccaatccac tcaaggctct ttccatggct	30
	<210> 10	
	<211> 92	
	<212> ADN	

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético	
	<400> 10	
	catctgagga ctctgcagtc tattttttgtg ctagagacgc ttatgattac gactgggttg	60
	cttactgggg ccaagggact ctggtcactg tc	92
10	<210> 11	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético	
	<400> 11	
20	tctagcaciaa aaatagactg cagagtcctc	30
	<210> 12	
	<211> 95	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético	
	<400> 12	
30	ctgtgagtc aggagaaaga gtcagtttct cctgcagggc cagtcagagc attggcaciaa	60
	acatatattg gtatcagcaa agaacaatg gttct	95
	<210> 13	
	<211> 30	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético	
40	<400> 13	
	gcaggagaaa ctgactcttt ctcctggact	30
	<210> 14	
45	<211> 83	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético	
	<400> 14	
	aaagaacaaa tggttctcca aggcttctca taaagtatgc ttctgagtct atctctggga	60
55	tcccttccag gtttagtggc agt	83
	<210> 15	
	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético	
	<400> 15	
65	ctttatgaga agccttggag aaccatt	27
	<210> 16	
	<211> 88	

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 5 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

 <400> 16
 gtgtggagtc tgaagatatt gctgattatt actgtcaaca aataataact ggccatacac 60
 gttcggaggg gggaccaagc tggaata 88
 10
 <210> 17
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

 <400> 17
 20 acagtaataa tcagcaatat cttcaga 27

 <210> 18
 <211> 27
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético
 30 <400> 18
 atagaaaagg atattacatg ggaaaac 27

 <210> 19
 <211> 30
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético
 40 <400> 19
 tgggtgaaac agagccatgg aaagagcctt 30

 <210> 20
 45 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 50 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

 <400> 20
 aaggccacat tgactgtaga cagtt 25
 55 <210> 21
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

 <400> 21
 65 tggatatcagc aaagaaca 18

 <210> 22
 <211> 24
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

5 <400> 22
gggatccctt ccaggtttag tggc 24

<210> 23

10 <211> 357
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(357)

20 <400> 23
gag gtc cag ctt cag cag tca gga cct gac ctg gtg aaa cct ggg gcc 48
Glu Val Gln Leu 5 Gln Ser Gly Pro Asp Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 15
25 tca gtg agg ata tcc tgc aag gct tct gga tac aca ttc acg gac tat 96
Ser Val Arg Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30
aac tta cac tgg gtg aaa cag agc cat gga aag agc ctt gag tgg att 144
Asn Leu His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
30 35 40 45
gga tat att tat cct tac aat ggt att act ggc tac aac cag aaa ttc 192
Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Ile Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
aag agc aag gcc aca ttg act gta gac agt tcc tcc aat aca gcc tac 240
Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Ser Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
35 65 70 75 80
atg gac ctc cgc agc ctg aca tct gag gac tct gca gtc tat ttt tgt 288
Met Asp Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
40 gct aga gac gct tat gat tac gac tat ctg acg gac tgg ggc caa ggg 336
Ala Arg Asp Ala Tyr Asp Tyr Asp Tyr Leu Thr Asp Trp Gly Gln Gly
100 105 110
act ctg gtc act gtc agc gct 357
Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
45 115

<210> 24

<211> 357

<212> ADN

50 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético

55 <400> 24
ctccaggtcg aagtcgtcag tcctggactg gaccactttg gaccccggag tcactcctat 60
aggacgttcc gaagacctat gtgtaagtgc ctgatattga atgtgaccca ctttgtctcg 120
gtacatttct cggaactcac ctaacctata taaataggaa tgttaccata atgaccgatg 180
ttggtcttta agttctcggt ccggtgtaac tgacatctgt caaggagggt atgtcggatg 240
60 tacctggagg cgtcggactg tagactcctg agacgtcaga taaaaacacg atctctgcga 300
atactaattgc tgatagactg cctgaccccg gttccctgag accagtgaca gtcgcga 357

<210> 25

<211> 119

65 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 25

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

<210> 26

<211> 324

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(324)

<400> 26

35 gac atc ttg ctg act cag tca tcc agt ctc ctg tct gtg agt cca gga 48
1 Asp Ile Leu Leu 5 Gln Ser Ser Ser 10 Leu Ser Val Ser 15 Pro Gly
gaa aga gtc agt ttc tcc tgc agg acc agt aag aac gtt ggc aca aac 96
Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Thr Ser Lys Asn Val Gly Thr Asn
20 25 30
40 att cat tgg tat cag caa aga aca aat ggt tct cca agg ctt ctc ata 144
Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45
aag tat gct tca gag cgt tta cct ggg atc cct tcc agg ttt agt ggc 192
Lys Tyr Ala Ser Glu Arg Leu Pro Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
45 agt ggg tca ggg aca gat ttt act ctt agc atc aac agt gtg gag tct 240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser 75 Asn Ser Val Glu Ser 80
65 gaa gat att gct gat tat tac tgt caa caa agt aat aac tgg cca tac 288
Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Asn Trp Pro Tyr 95
85 90 95
acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa cgg 324
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 27

<211> 324

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético

<400> 27

65 ctgtagaacg actgagtcag aggtcagtag gacagacact caggctcctt ttctcagtc 60
aagaggacgt cctggtcatt cttgcaaccg tgtttgtaag taaccatagt cgtttcttgt 120
ttaccaagag gttccgaaga gtatttcata cgaagtctcg caaatggacc ctagggaagg 180
tccaaatcac cgtcacccag tccctgtcta aaatgagaat cgtagttgtc acacctcaga 240

```

cttctataac gactaataat gacagttggtt tcattattga ccggtatgtg caagcctccc 300
ccctggttcg acctttattt tgcc 324

<210> 28
5 <211> 108
  <212> PRT
  <213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Descripción de la secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 28
Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Ser Ser Leu Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15
15 Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Thr Ser Lys Asn Val Gly Thr Asn
20 25 30
Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45
20 Lys Tyr Ala Ser Glu Arg Leu Pro Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
65 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser
70 75 80
Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Asn Trp Pro Tyr
85 90 95
25 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 29
30 <211> 6
  <212> PRT
  <213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> Descripción de secuencia artificial: etiqueta de 6xHis sintética

<400> 29
His His His His His His
1 5

40 <210> 30
  <211> 10
  <212> PRT
  <213> Desconocido

45 <220>
  <223> Descripción de desconocido: péptido de tipo salvaje desconocido

<400> 30
50 Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Asn Ile His
1 5 10

<210> 31
  <211> 10
  <212> PRT
55 <213> Secuencia artificial

<220>
  <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

60 <400> 31
Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Asn Leu His
1 5 10

<210> 32
65 <211> 10
  <212> PRT
  <213> Secuencia artificial

```

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 32
 5 Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Asn Leu His
 1 5 10

 <210> 33
 <211> 10
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 15
 <400> 33
 Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr Asn Leu His
 1 5 10

 20 <210> 34
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 34
 30 Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Asn Ile His
 1 5 10

 <210> 35
 <211> 10
 <212> PRT
 35 <213> Desconocido

 <220>
 <223> Descripción de desconocido: péptido de tipo salvaje desconocido

 40 <400> 35
 Asp Ala Tyr Asp Tyr Asp Trp Leu Ala Tyr
 1 5 10

 45 <210> 36
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 50 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 36
 Asp Ala Tyr Asp Tyr Asp Tyr Leu Thr Asp
 1 5 10
 55
 <210> 37
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 60
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 37
 65 Asp Ala Tyr Asp Tyr Asp Tyr Leu Thr Asp
 1 5 10

 <210> 38

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 38
 Asp Ala Tyr Asp Tyr Asp Tyr Leu Thr Asp
 10 1 5 10
 <210> 39
 <211> 10
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 20 <400> 39
 Asp Phe Tyr Asp Ser Asp Ala Leu Ala Asp
 1 5 10
 <210> 40
 25 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Desconocido
 <220>
 30 <223> Descripción de desconocido: péptido de tipo salvaje desconocido
 <400> 40
 Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile Tyr
 1 5 10
 35 <210> 41
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 41
 45 Arg Thr Ser Lys Asn Val Gly Thr Asn Ile His
 1 5 10
 <210> 42
 <211> 11
 50 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 55 <400> 42
 Arg Thr Ser Lys Asn Val Gly Thr Asn Ile His
 1 5 10
 60 <210> 43
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 43

Arg Thr Ser Lys Asn Val Gly Thr Asn Ile His
 1 5 10

5 <210> 44
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 44
 Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile Tyr
 1 5 10

15 <210> 45
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Desconocido

20 <220>
 <223> Descripción de desconocido: péptido de tipo salvaje desconocido

25 <400> 45
 Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser
 1 5

30 <210> 46
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 46
 Tyr Ala Ser Glu Arg Leu Pro
 1 5

40 <210> 47
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

50 <400> 47
 Tyr Gly Thr Glu Arg Val Phe
 1 5

55 <210> 48
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

60 <400> 48
 Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser
 1 5

65 <210> 49
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 49

5 Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser
1 5

<210> 50

<211> 330

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

15 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Phe Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
25 85 90 95
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125
30 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
35 165 170 175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205
40 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
45 245 250 255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285
50 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
55 325 330

<210> 51

<211> 330

60 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 51

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

ES 2 525 799 T3

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 5 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 10 Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 15 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 20 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 25 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255 260
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 265 270 275
 30 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300 305
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 35 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

40 <210> 52
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

50 <400> 52
 Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Asn Leu His
 1 5 10

55 <210> 53
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

65 <400> 53
 Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Ile Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15
 Ser

65 <210> 54
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 54
 5 Asp Ala Tyr Asp Tyr Asp Leu Thr Asp
 1 5

 <210> 55
 <211> 11
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 15
 <400> 55
 Arg Thr Ser Lys Asn Val Gly Thr Asn Ile His
 1 5 10

 20 <210> 56
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 56
 30 Tyr Ala Ser Glu Arg Leu Pro
 1 5

 <210> 57
 <211> 9
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 40 <400> 57
 Gln Gln Ser Asn Asn Trp Pro Tyr Thr
 1 5

 45 <210> 58
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 50 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 58
 Gly Pro Ala Lys Glu Leu Thr Pro Leu Lys Glu Ala Lys Val Ser
 1 5 10 15
 55
 <210> 59
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

 <400> 59
 65 tagcatgact ggtggacagc

 <210> 60
 <211> 18

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

<400> 60
cgtagaatcg agaccgag

18

10 <210> 61
<211> 106
<212> PRT
<213> Homo sapiens

15 <400> 61
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
1 5 10 15
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
20 20 25 30
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
35 40 45
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
50 55 60
25 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
65 70 75 80
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
85 90 95
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
30 100 105

<210> 62
<211> 105
<212> PRT
35 <213> Homo sapiens

<400> 62
Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
1 5 10 15
40 Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
20 25 30
Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
35 40 45
Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
50 55 60
45 Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
65 70 75 80
His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
85 90 95
50 Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
100 105

<210> 63
<211> 10
55 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
60 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> Thr o Ser

65 <220>
<221> MOD_RES
<222> (9)..(9)

<223> Ile o Leu
 <400> 63
 Gly Tyr Xaa Phe Thr Asp Tyr Asn Xaa His
 5 1 5 10
 <210> 64
 <211> 17
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 15 <400> 64
 Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Ile Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15
 Ser
 20 <210> 65
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <220>
 30 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Ala o Phe
 <220>
 35 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> Tyr o Ser
 <220>
 40 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> Trp, Tyr o Ala
 <220>
 45 <221> MOD_RES
 <222> (9)..(9)
 <223> Ala o Thr
 <220>
 50 <221> MOD_RES
 <222> (10)..(10)
 <223> Tyr o Asp
 <400> 65
 Asp Xaa Tyr Asp Xaa Asp Xaa Leu Xaa Xaa
 55 1 5 10
 <210> 66
 <211> 11
 <212> PRT
 60 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 65 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Ala o Thr

5 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> Gln o Lys

10 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> Ser o Asn

15 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> Ile o Val

20 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (11)..(11)
 <223> Tyr o His

25 <400> 66
 Arg Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Gly Thr Asn Ile Xaa
 1 5 10

30 <210> 67
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Ala o Gly

40 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> Ser o Thr

45 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> Ser o Arg

50 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> Ile, Leu o Val

55 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> Ser, Pro o Phe

60 <400> 67
 Tyr Xaa Xaa Glu Xaa Xaa Xaa
 1 5

65 <210> 68
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 68

5 Gln Gln Ser Asn Asn Trp Pro Tyr Thr
1 5

<210> 69

<211> 30

<212> PRT

10 <213> Mus sp.

<400> 69

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

<210> 70

<211> 14

20 <212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 70

25 Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 71

<211> 32

<212> PRT

30 <213> Mus sp.

<400> 71

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

<210> 72

<211> 11

40 <212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 72

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

<210> 73

<211> 30

<212> PRT

50 <213> Mus sp.

<400> 73

55 Glu Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Thr Glu
1 5 10 15
Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser
20 25 30

<210> 74

<211> 14

60 <212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 74

65 Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 75

<211> 32

<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 75

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

<210> 76

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 76

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

<210> 77

<211> 30

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 77

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

<210> 78

<211> 14

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 78

35 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
1 5 10

<210> 79

<211> 32

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 79

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

<210> 80

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 80

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

<210> 81

<211> 30

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 81

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

<210> 82
 <211> 14
 <212> PRT
 5 <213> Mus sp.

 <400> 82
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
 1 5 10
 10
 <210> 83
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Mus sp.
 15
 <400> 83
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15
 20 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

 <210> 84
 <211> 11
 <212> PRT
 25 <213> Mus sp.

 <400> 84
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10
 30
 <210> 85
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Mus sp.
 35
 <400> 85
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 40 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser
 20 25 30

 <210> 86
 <211> 14
 <212> PRT
 45 <213> Mus sp.

 <400> 86
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
 1 5 10
 50
 <210> 87
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Mus sp.
 55
 <400> 87
 Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
 1 5 10 15
 60 Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

 <210> 88
 <211> 11
 <212> PRT
 65 <213> Mus sp.

 <400> 88
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 89
 <211> 30
 5 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 89
 10 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 20 25 30

<210> 90
 15 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 90
 20 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
 1 5 10

<210> 91
 25 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 91
 30 Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
 1 5 10 15
 Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 92
 35 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 92
 40 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 93
 45 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 93
 50 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys
 20

<210> 94
 55 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 94
 60 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 95
 65 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 95

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15
 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30
 5
 <210> 96
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus sp.
 10
 <400> 96
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 1 5 10
 15
 <210> 97
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Mus sp.
 20
 <400> 97
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
 20
 25
 <210> 98
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Mus sp.
 30
 <400> 98
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15
 35
 <210> 99
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Mus sp.
 40
 <400> 99
 Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr
 1 5 10 15
 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30
 45
 <210> 100
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus sp.
 50
 <400> 100
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 1 5 10
 55
 <210> 101
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Mus sp.
 60
 <400> 101
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 20
 65
 <210> 102
 <211> 15
 <212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 102
 5 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 103
 <211> 32
 <212> PRT
 10 <213> Mus sp.

<400> 103
 15 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15
 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 104
 <211> 11
 20 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 104
 25 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 1 5 10

<210> 105
 <211> 23
 <212> PRT
 30 <213> Mus sp.

<400> 105
 35 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 20

<210> 106
 <211> 15
 40 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 106
 45 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 107
 <211> 32
 <212> PRT
 50 <213> Mus sp.

<400> 107
 55 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15
 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 108
 <211> 11
 60 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 108
 65 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 1 5 10

<210> 109
 <211> 726

<212> ADN
<213> Desconocido

<220>

5 <223> Descripción de desconocido: polinucleótido de tipo salvaje desconocido

<400> 109

	gaggtccagc	ttcagcagtc	aggacctgac	ctggtgaaac	ctggggcctc	agtgaggata	60
	tcctgcaagg	cttctggata	cacattcact	gactacaaca	tacactgggt	gaaacagagc	120
10	catggaaaga	gccttgagtg	gattggatat	atttatcctt	acaatgggtat	tactggctac	180
	aaccagaaat	tcaagagcaa	ggccacattg	actgtagaca	gttcctccaa	tacagcctac	240
	atggacctcc	gcagcctgac	atctgaggac	tctgcagtct	atttttgtgc	tagagacgct	300
	tatgattacg	actggttggc	ttactggggc	caagggactc	tggtcactgt	ctctgcaggt	360
	cccgccaagg	agttgacgcc	cctgaaggag	gcgaaggctc	ctgacatctt	gctgactcag	420
15	tctccagtca	tcctgtctgt	gagtcaggga	gaaagagtca	gtttctcctg	cagggccagt	480
	cagagcattg	gcacaaacat	atattgggtat	cagcaaagaa	caaatgggtc	tccaaggctt	540
	ctcataaagt	atgcttctga	gtctatctct	gggatccctt	ccaggtttag	tggcagtgagg	600
	tcagggacag	attttactct	tagcatcaac	agtgtggagt	ctgaagatat	tgctgattat	660
	tactgtcaac	aaagtaataa	ctggccatac	acgttcggag	gggggaccaa	gctggaaata	720
20	aaacgg						726

<210> 110

<211> 726

<212> ADN

25 <213> Desconocido

<220>

<223> Descripción de desconocido: polinucleótido de tipo salvaje desconocido

30 <400> 110

	ctccaggtcg	aagtcgtcag	tcctggactg	gaccactttg	gaccccgagg	tcactcctat	60
	aggacgttcc	gaagacctat	gtgtaagtga	ctgatgttgt	atgtgaccca	ctttgtctcg	120
	gtacctttct	cggaactcac	ctaacctata	taaataggaa	tgttaccata	atgaccgatg	180
	ttggtcttta	agttctcgtt	ccggtgtaac	tgacatctgt	caaggagggt	atgtcggatg	240
35	tacctggagg	cgtcggactg	tagactcctg	agacgtcaga	taaaaacacg	atctctgcga	300
	atactaattgc	tgaccaaccg	aatgaccccg	gttccctgag	accagtgaca	gagacgtcca	360
	gggcggttcc	tcaactgcgg	ggacttcctc	cgcttccaga	gactgtagaa	cgactgagtc	420
	agaggtcagt	aggacagaca	ctcagggtcct	ctttctcagt	caaagaggac	gtcccgggtca	480
	gtctcgtaac	cgtgttttga	tataaccata	gtcgtttctt	gtttaccaag	aggttccgaa	540
40	gagtatttca	tacgaagact	cagatagaga	ccctagggaa	ggtccaaatc	accgtcaccc	600
	agtccctgtc	taaaatgaga	atcgtagttg	tcacacctca	gacttctata	acgactaata	660
	atgacagttg	tttcattatt	gaccggtatg	tgcaagcctc	ccccctggtt	cgacctttat	720
	tttgcc						726

REIVINDICACIONES

1. Línea celular de ovario de hámster chino (CHO), referida como TnI 19C7 AM1 hG1 CHO 204, designada por la American Type Culture Collection (ATCC) con el número de depósito PTA-9816.
2. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo producido por dicha línea celular de CHO, según la reivindicación 1.
3. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a Troponina I, que comprende una región VH y una región VL, en el que la región VH comprende:
CDR H1 que tiene la secuencia de aminoácidos GYTFTDYNLH SEQ ID NO: 52;
CDR H2 que tiene la secuencia de aminoácidos YIYPYNGITGYNQKFKS SEQ ID NO: 53; y
CDR H3 que tiene la secuencia de aminoácidos DAYDYDYLTLD SEQ ID NO: 54; y
en el que la región VL comprende:
CDR L1 que tiene la secuencia de aminoácidos RTSKNVGTNIH SEQ ID NO: 55;
CDR L2 que tiene la secuencia de aminoácidos YASERLP SEQ ID NO: 56; y
CDR L3 que tiene la secuencia de aminoácidos QQSNNWPYT SEQ ID NO: 57.
4. Anticuerpo o fragmento, según la reivindicación 3, en el que la secuencia de aminoácidos de la región VH tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 y la secuencia de aminoácidos de la región VL tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28.
5. Anticuerpo o fragmento, según la reivindicación 3 ó 4, en el que dicho anticuerpo o fragmento se selecciona del grupo que consiste en: una molécula de inmunoglobulina, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo injertado con CDR, un anticuerpo humanizado, un Fab, un Fab', un F(ab')₂, un Fv, un Fv unido a disulfuro, un scFv, un anticuerpo de dominio único, un diacuerpo, un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo de doble especificidad, un anticuerpo anti-idiotípico, un anticuerpo biespecífico, y un fragmento de unión a epítipo funcionalmente activo de los mismos.
6. Anticuerpo o fragmento, según cualquiera de las reivindicaciones 2-5, en el que dicho anticuerpo o fragmento está unido de manera funcional a un marcador detectable.
7. Anticuerpo o fragmento, según la reivindicación 6, en el que dicho marcador detectable se selecciona entre un compuesto fluorescente, una enzima detectable, biotina, un material luminiscente y un material radioactivo.
8. Célula huésped que comprende uno o más vectores de expresión que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo o fragmento, según cualquiera de las reivindicaciones 3-6.
9. Composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o fragmento, según cualquiera de las reivindicaciones 2-7, y un portador farmacéuticamente aceptable.
10. Kit que comprende un recipiente que contiene el anticuerpo o fragmento, según cualquiera de las reivindicaciones 2, 3 ó 5.
11. Uso del anticuerpo o fragmento, según cualquiera de las reivindicaciones 2-7, para detectar troponina I en una muestra biológica obtenida de un paciente.
12. Uso, según la reivindicación 11, en el que el uso comprende poner en contacto dicha muestra biológica con dicho anticuerpo o fragmento, y detectar dicho anticuerpo o fragmento unido a troponina I.
13. Uso, según la reivindicación 12, en el que el uso comprende:
a) recubrir uno o más de dichos anticuerpos o fragmentos sobre una fase sólida;
b) poner en contacto la muestra biológica con la fase sólida; y
c) detectar la troponina I unida a dichos anticuerpos o fragmentos sobre la fase sólida.
14. Uso, según la reivindicación 13, en el que la troponina se detecta mediante:
a) adición de un segundo anticuerpo, que se une a la troponina I, y que está unido a un compuesto generador de señales; y
b) detección de la presencia de una señal generada por dicho compuesto generador de señales, en la que la presencia de dicha señal indica la presencia de troponina I.
15. Uso, según la reivindicación 13 ó 14, en el que la fase sólida se selecciona del grupo que consiste en: material poroso, material no poroso, una partícula de látex, una partícula magnética, una micropartícula, una microesfera, una membrana, un pocillo de microtitulación y un tubo de plástico.
16. Uso, según la reivindicación 11, en el que el uso comprende:

a) poner en contacto dicha muestra biológica con 1) un antígeno de referencia de troponina I, en el que dicho antígeno está unido a un compuesto generador de señales capaz de generar una señal detectable y 2) dicho anticuerpo o fragmento; y

5 b) detectar una señal generada por dicho compuesto generador de señales, en el que la cantidad de antígeno de troponina I detectado en dicha muestra de ensayo es inversamente proporcional a la cantidad de antígeno de referencia de troponina I unido a dicho anticuerpo.

10 17. Uso, según cualquiera de las reivindicaciones 11-16, en el que la muestra biológica es plasma, orina, sangre completa, sangre completa seca, suero, fluido cefalorraquídeo, saliva, lágrimas, lavados nasales o extractos acuosos de tejidos y células.

18. Anticuerpo o fragmento, según cualquiera de las reivindicaciones 2-8, para usar en el diagnóstico del síndrome coronario agudo o el infarto de miocardio en un paciente sospechoso de tener una de estas afecciones.

15 19. Método de generación del anticuerpo o fragmento, según la reivindicación 2, en el que el método comprende cultivar la línea de células CHO de la reivindicación 1.

20 20. Método de generación del anticuerpo o fragmento, según la reivindicación 3, en el que el método comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 8.

**Aislamiento de ARNm de hibridoma
específico anti-BNP**



**Identificación de genes
variables de anticuerpo**



**Construcción y
caracterización de scFv**



**Mutagénesis dirigida de CDR y
construcción de bibliotecas**



**Aislamiento de variantes de scFv con mejoras en
la velocidad de disociación de las bibliotecas**



Caracterización de clones individuales



**Expresión transitoria/estable de
anticuerpos**



**Caracterización de
anticuerpos quiméricos
estables**

Figura 1

construcción scFv usado para diseñar la expresión en levadura

Gen de cadena pesada variable 19C7

SEQ ID NO: 54 1 GAGGTCCAG CTTACAGCAG TCAGGACCT GACCTGGTG AAACCTGGG GCCTCAGTG
SEQ ID NO: 55 CTCCAGGTC GAAGTCGTC AGTCCTGGA CTGGACCAC TTTGGACCC CGGAGTCAC

Gen de cadena pesada variable 19C7

55 AGGATATCC TGCAAGGCT TCTGGATAC ACATTCACT GACTACAAAC ATACACTGG
TCCTATAGG ACGTTCCGA AGACCTATG TGTAAGTGA CTGATGTTG TATGTGACC

Gen de cadena pesada variable 19C7

109 GTGAAACAG AGCCATGGA AAGAGCCTT GAGTGGATT GGATATATT TATCCTTAC
CACTTTGTC TGGTACCT TTCTCGGAA CTCACCTAA CCTATATAA ATAGGAATG

Gen de cadena pesada variable 19C7

163 AATGGTATT ACTGGCTAC AACCAGAAA TTCAAGAGC AAGGCCACA TTGACTGTA
TTACCATAA TGACCGATG TTGGTCTTT AAGTTCTCG TTCGGTGT AACTGACAT

Gen de cadena pesada variable 19C7

217 GACAGTTCC TCCAATACA GCCTACATG GACCTCCGC AGCCTGACA TCTGAGGAC
CTGTCAAGG AGGTTATGT CGGATGTAC CTGGAGGCG TCGGACTGT AGACTCCTG

Gen de cadena pesada variable 19C7

271 TCTGCAGTC TATTTTGT GCTAGAGAC GCTTATGAT TACGACTGG TTGGCTTAC
AGACGTCAG ATAAAACA CGATCTCTG CGAATACTA ATGCTGACC AACCGAATG

Gen de cadena pesada variable 19C7

325 TGGGGCCAA GGGACTCTG GTCAGTCTG TCTGCAGGT CCGGCCAAG GAGTTGACG
ACCCCGGTT CCCTGAGAC CAGTGACAG AGACGTCCA GGGCGGTTT CTCAACTGC

Enlazador

Gen de cadena ligera variable 19C7

Enlazador

379 CCCCTGAAG GAGGCGAAG GTCTCTGAC ATCTTGCTG ACTCAGTCT CCAGTCATC
GGGGAATTC CTCGGCTTC CAGAGACTG TAGAACGAC TGAGTCAGA GGTCAGTAG

Figura 2A

Gen de cadena ligera variable 19C7

 433 CTGTCTGTG AGTCCAGGA GAAAGAGTC AGTTTCTCC TGCAGGGCC AGTCAGAGC
 GACAGACAC TCAGGTCCT CTTTCTCAG TCAAAGAGG ACGTCCCGG TCAGTCTCG

Gen de cadena ligera variable 19C7

 487 ATTGGCACA AACATATAT TGGTATCAG CAAAGAACA AATGGTTCT CCAAGGCTT
 TAACCGTGT TTGTATATA ACCATAGTC GTTTCTTGT TTACCAAGA GGTTCGAA

Gen de cadena ligera variable 19C7

 541 CTCATAAAG TATGCTTCT GAGTCTATC TCTGGGATC CCTTCCAGG TTTAGTGGC
 GAGTATTTT ATACGAAGA CTCAGATAG AGACCCTAG GGAAGGTCC AAATCACCG

Gen de cadena ligera variable 19C7

 595 AGTGGGTCA GGGACAGAT TTTACTCTT AGCATCAAC AGTGTGGAG TCTGAAGAT
 TCACCCAGT CCCTGTCTA AAATGAGAA TCGTAGTTG TCACACCTC AGACTTCTA

Gen de cadena ligera variable 19C7

 649 ATTGCTGAT TATTACTGT CAACAAAGT AATAACTGG CCATACACG TTCGGAGGG
 TAACGACTA ATAATGACA GTTGTTTCA TTATTGACC GGTATGTGC AAGCCTCCC

Gen de cadena ligera variable 19C7

 703 GGGACCAAG CTGGAAATA AAACGG
 CCCTGGTTC GACCTTTAT TTGCCC

Figura 2B

Expresión de Tnl 19C7 scFV en levadura

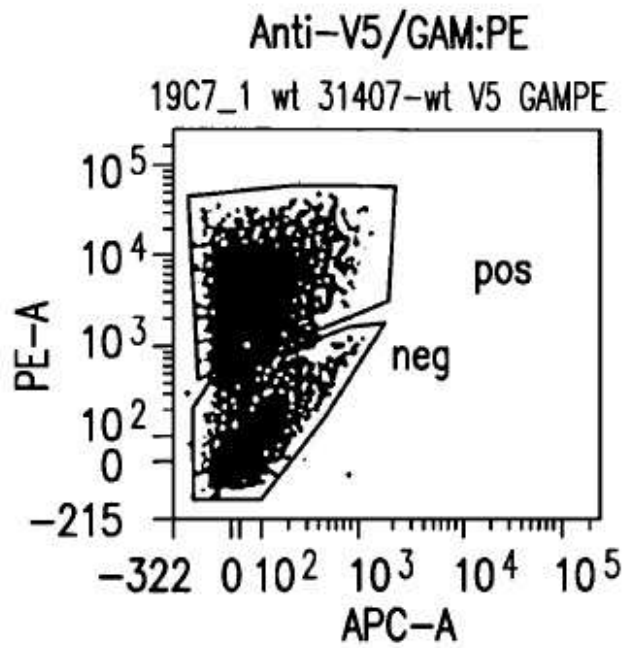


Figura 3A

Expresión de Tnl 19C7 scFV en levadura

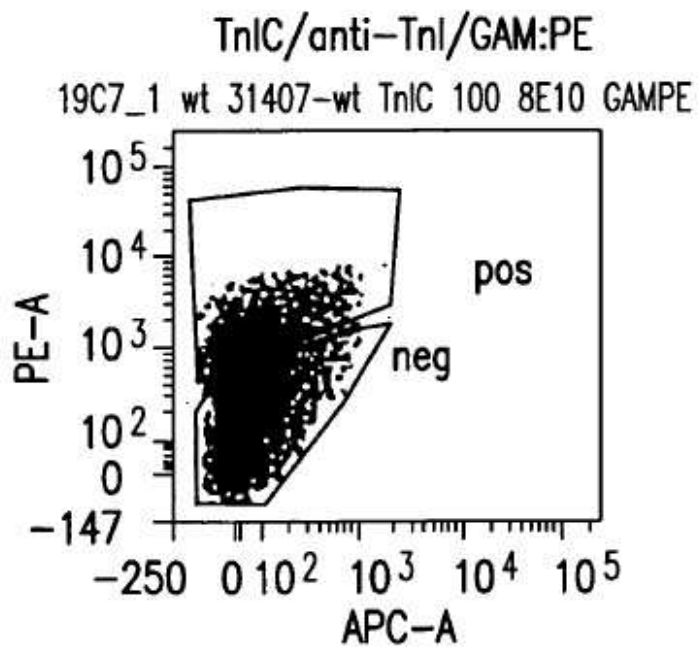
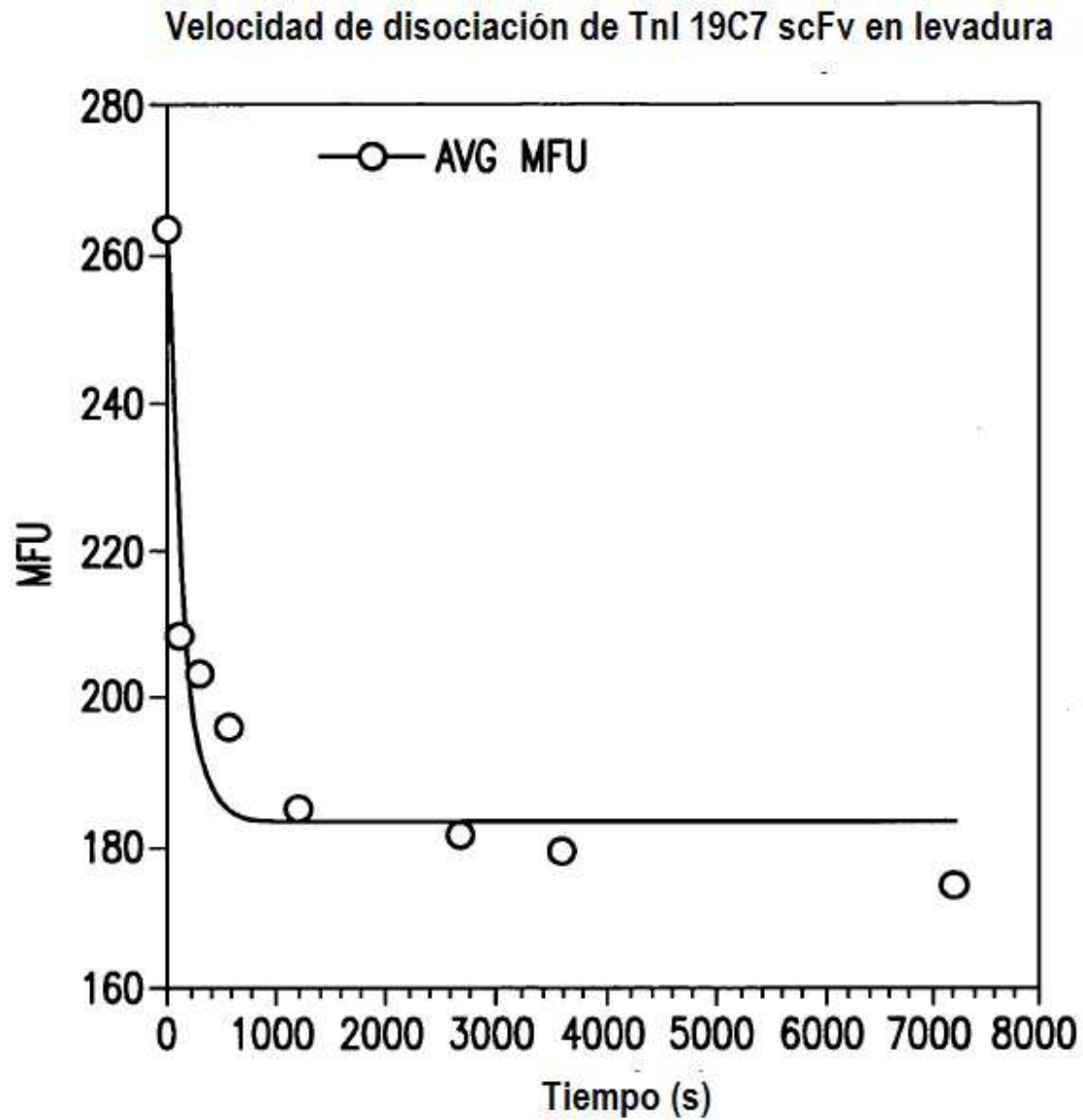


Figura 3B



$y=m1*\exp(-m2*M0)+m3$		
	Value	Error
m1	77.011	9.9361
m2	0.0068528	0.0022053
m3	183.38	4.2374
Chisq	431.53	NA
R	0.96172	NA

Figura 4

Análisis KD de scFv no mutado de Tnl 19C7

Análisis KD de Tnl 19C7 scFv

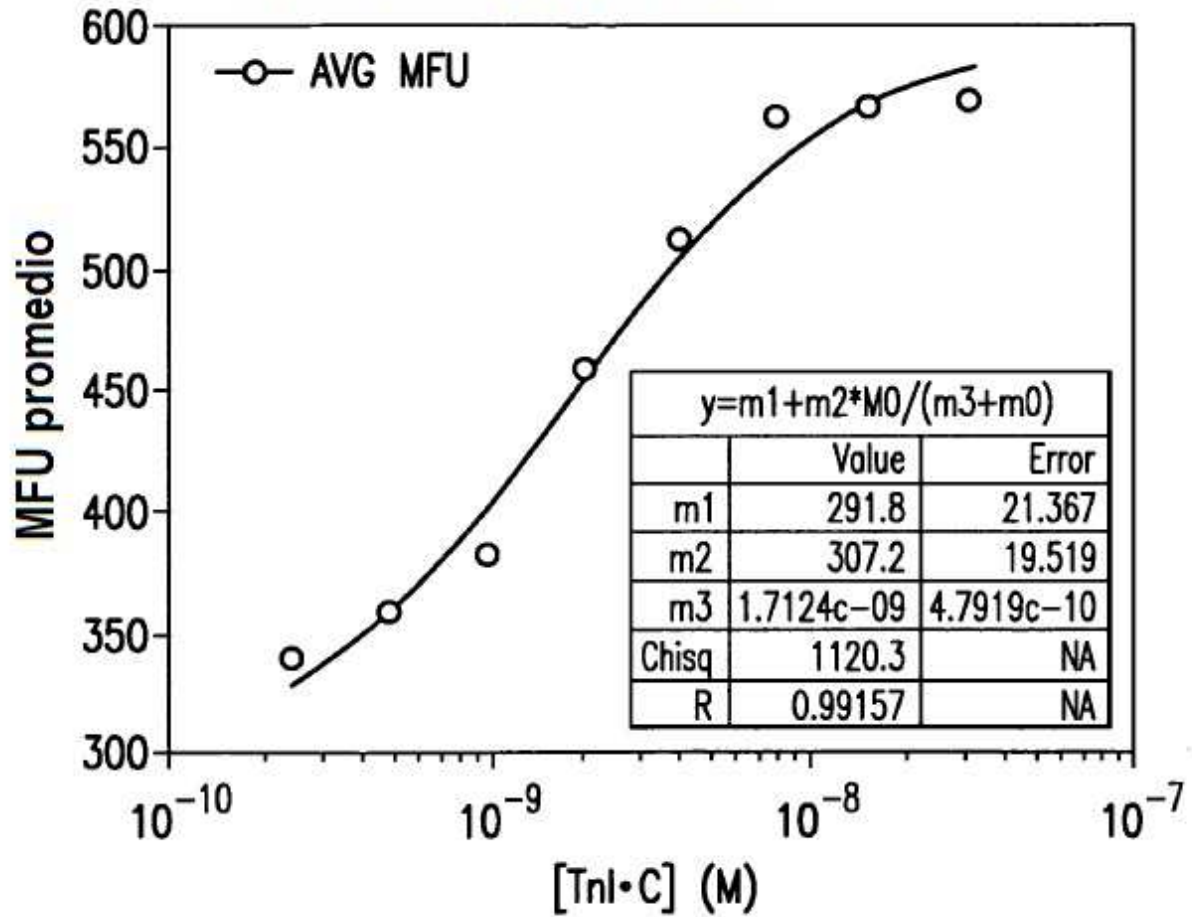


Figura 5

Mutagénesis enriquecida con CDR utilizada para la construcción de bibliotecas

Sp= cebador enriquecido al 70% de nucleótidos de tipo salvaje y 30% de tres otros nucleótidos para toda la longitud del bucle de CDR

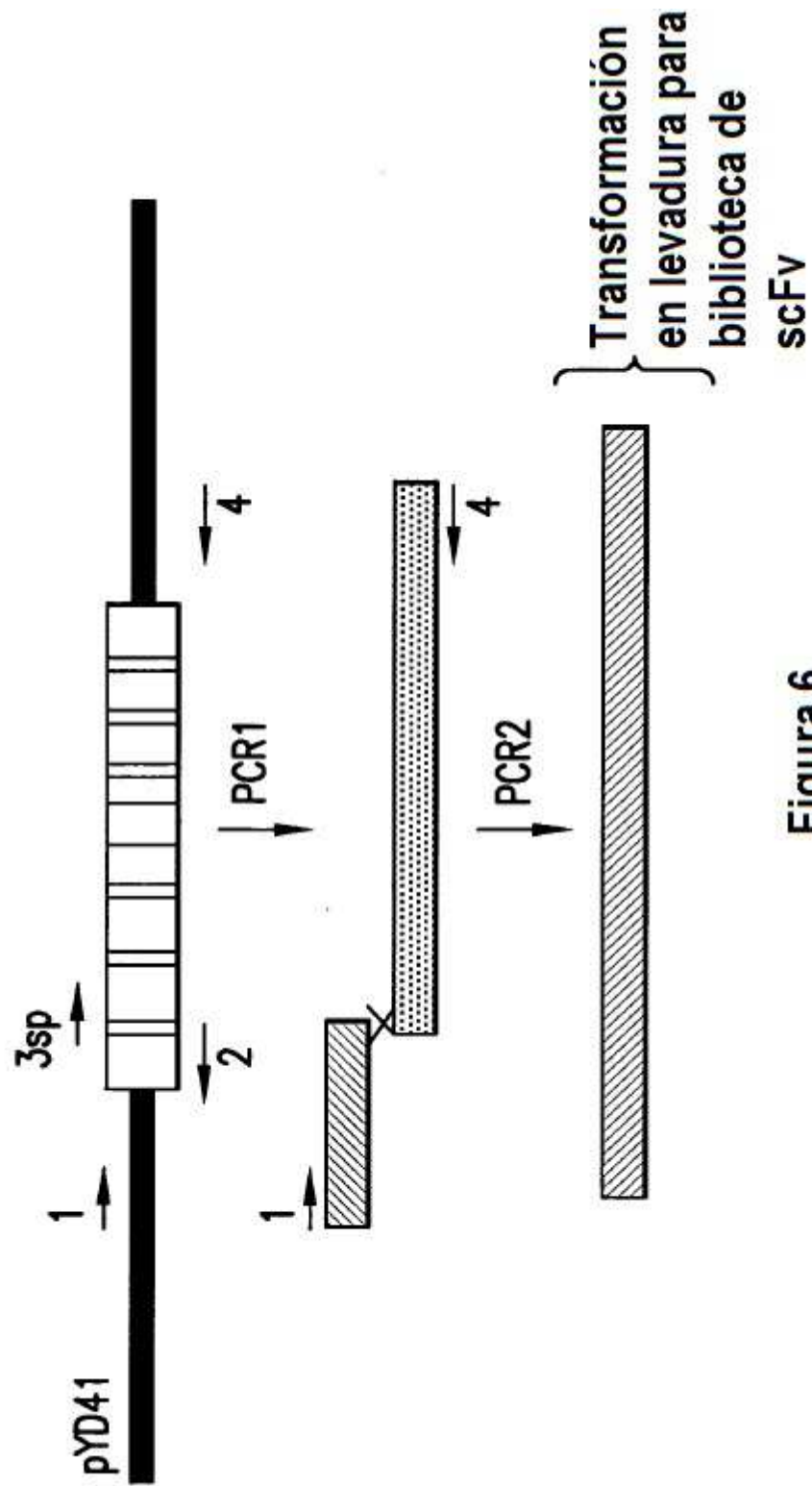


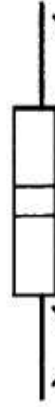
Figura 6

Transformación en levadura para biblioteca de scFV
enriquecida en CDR

Producto PCR enriquecido con CDR
con exceso de vector



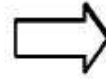
Cepa de levadura: EBY100



GAP



Biblioteca de scFV



Crecer, inducir, clasificar

Figura 7

Cebadores usados para la construcción de bibliotecas

Nombre	Situación	Secuencia	SEQ ID NO: 1
tpVHfor	pYD41 19C7VH5'	gaattcgcgcccgagccgccaatggccggagggtccagcttca gcagtca	SEQ ID NO: 1
tpVHrev	pYD41 19C7 VH3' linker 40	cttcagggggcgctcaactccttggcggggacctgcagagacagtgac	SEQ ID NO: 2
tpVLfor	pYD41 19C7L5' linker 40	ttgacgccccctgaaggaggcggaagggtctctgacatcttgcaga ct	SEQ ID NO: 3
tpVLrev	pYD41 19C7ML3' rev	gaaggggccctctagactcagaggcgggcgccgctttttatttcc ag	SEQ ID NO: 4
19H1spfor	pYD41 19C7 CDRH1	gaacctggggcctcagtgaggatctctgcaggcttctg gatcacattcaactgactacaacatacactgggt gaacacagagccatgga	SEQ ID NO: 5
19HF1rev	pYD41 19C7 VH FR1	agaagccttgacaggatatacctcaactgagggc	SEQ ID NO: 6
pYD1AGAfor	pYD41 AGA2 for	agtaacgtttgtc 1	SEQ ID NO: 7
			SEQ ID NO: 8
		caggctctttccatggct	SEQ ID NO: 9
19H3spfor	pYD41 19C7 CDRH3	catctgaggactctgcagtcctatctttgtgctagagacgcttca tgattacgactgggtggcttactgtgggccaaggagact ctgtcactgtc	SEQ ID NO: 10

Figura 8A

19HF3rev	pYD41 19C7 VH FR3	tctagcacaataatgactgcaggctctc	SEQ ID NO: 11
19L1spfor	pYD41 19C7 CDRL1	ctgtgagtcaggaggaagtcagtttctctcaggggc cagtcagagcattggcacaacatatattggtatc agcaagagacaatggtct	SEQ ID NO: 12
19LF1rev	pYD41 19C7 VL FR1	gcaggagaactgactcttctctctggact	SEQ ID NO: 13
19L2spfor	pYD41 19C7 CDRL2	aaagaacaaatgggtctccaggcttctcataaag tatgctt ctgagtcctatctctgggacccctccaggtttagtggcagt	SEQ ID NO: 14
19LF2rev	pYD41 19C7 VL FR2	ctttatgagaagccttgaggaaccatt	SEQ ID NO: 15
19L3spfor	pYD41 19C7 CDRL3	gtgtggagctcgagatattgctgattattactgt caacaaa gtaataactggccatacacg ttcggaggggggacc aagctggaata	SEQ ID NO: 16
19LF3rev	pYD41 19C7 VL FR3	acagtaataatcagcaatatcttcaga	SEQ ID NO: 17
pYD41rev2	pYD41 post poly HIS	atagaaaggaatattacatgggaaac	SEQ ID NO: 18
19FRH2 for	pYD41 19C7 FR H2	tgggtgaacagagccatggaagagcctt	SEQ ID NO: 19
19FRH3 for	pYD41 19C7 FR H2	aaggccacattgactgttagacagtt	SEQ ID NO: 20
19FRL2 for	pYD41 19C7 FR L2	tggtatcagcaagaaca	SEQ ID NO: 21
19FRL3 for	pYD41 19C7 FR L3	gggacccctccaggtttagtggc	SEQ ID NO: 22

Figura 8B

Constante de disociación (KD) de equilibrio
medida en la levadura que expresa scFv

Nombre clon	scFv KD (nM)
Tn I 19C7 WT	1.7
TnI 19C7 AM1	0.36
TnI 19C7 AM2	0.38
TnI 19C7 AM3	0.42
TnI 19C7 AM4	0.36

Figura 9

**Clasificación de la medición de anticuerpos
quiméricos de ratón en ensayo EIA**

Nombre clon	Ab50	Ag50
Tn I 19C7 WT	25ng/mL	0.73
Tnl 19C7 AM1	25ng/mL	0.39
Tnl 19C7 AM2	25ng/mL	1.15
Tnl 19C7 AM3	25ng/mL	0.78
Tnl 19C7 AM4	8ng/mL	1.58

Figura 10

Resultados Architect comparando Tnl 19C7 de tipo salvaje con Tnl 19C7 AM1

Tn I 19C7 WT	RLU promedio	X/A
CalA	1132	1
CalB	11321	10
CalC	21656	19
CalD	63838	56
CalE	383234	339
CalF	1463399	1293

Tn I 19C7 AM1	RLU promedio	X/A
CalA	1241	1
CalB	16282	14
CalC	29986	26
CalD	90633	80
CalE	540658	478
CalF	1974094	1744

Figura 11

Secuencia de VH de Troponina I 19C7 AM1

SEQ ID NO: 25		GluValGln	LeuGlnGln	SerGlyPro	AspLeuVal	LysProGly	AlaSerVal
SEQ ID NO: 23	1	GAGGTCCAG	CTTCAGCAG	TCAGGACCT	GACCTGGTG	AAACCTGGG	GCCTCAGTG
SEQ ID NO: 24		CTCCAGGTC	GAAGTCGTC	AGTCCTGGA	CTGGACCAC	TTTGGACCC	CGGAGTCAC

CDR H1

		ArgIleSer	CysLysAla	SerGlyTyr	ThrPheThr	AspTyrAsn	LeuHisTrp
55		AGGATATCC	TGCAAGGCT	TCTGGATAC	ACATTCACG	GACTATAAC	TTACACTGG
		TCCTATAGG	ACGTTCCGA	AGACCTATG	TGTAAGTGC	CTGATATTG	AATGTGACC

CDR H2

		ValLysGln	SerHisGly	LysSerLeu	GluTrpIle	GlyTyrIle	TyrProTyr
109		GTGAAACAG	AGCCATGGA	AAGAGCCTT	GAGTGGATT	GGATATATT	TATCCTTAC
		CACTTTGTC	TCGGTACCT	TTCTCGGAA	CTCACCTAA	CCTATATAA	ATAGGAATG

CDR H2

		AsnGlyIle	ThrGlyTyr	AsnGlnLys	PheLysSer	LysAlaThr	LeuThrVal
163		AATGGTATT	ACTGGCTAC	AACCAGAAA	TTCAAGAGC	AAGGCCACA	TTGACTGTA
		TTACCATAA	TGACCGATG	TTGGTCTTT	AAGTTCTCG	TTCCGGTGT	AACTGACAT

		AspSerSer	SerAsnThr	AlaTyrMet	AspLeuArg	SerLeuThr	SerGluAsp
217		GACAGTTCC	TCCAATACA	GCCTACATG	GACCTCCGC	AGCCTGACA	TCTGAGGAC
		CTGTCAAGG	AGGTTATGT	CGGATGTAC	CTGGAGGCG	TGGGACTGT	AGACTCCTG

CDR H3

		SerAlaVal	TyrPheCys	AlaArgAsp	AlaTyrAsp	TyrAspTyr	LeuThrAsp
271		TCTGCAGTC	TATTTTGT	GCTAGAGAC	GCTTATGAT	TACGACTAT	CTGACGGAC
		AGACGTCAG	ATAAAAACA	CGATCTCTG	CGAATACTA	ATGCTGATA	GACTGCCTG

		TrpGlyGln	GlyThrLeu	ValThrVal	SerAla
325		TGGGGCCAA	GGGACTCTG	GTCAGTCTG	AGCGCT
		ACCCCGGTT	CCCTGAGAC	CAGTGACAG	TCGCGA

Figura 12A

Secuencia de VL de troponina I 19C7 AM1

SEQ ID NO: 28		AspIleLeu	LeuThrGln	SerProVal	IleLeuSer	ValSerPro	GlyGluArg
SEQ ID NO: 26	1	GACATCTTG	CTGACTCAG	TCTCCAGTC	ATCCTGTCT	GTGAGTCCA	GGAGAAAGA
SEQ ID NO: 27		CTGTAGAAC	GACTGAGTC	AGAGGTCAG	TAGGACAGA	CACTCAGGT	CCTCTTTCT

CDR L1

		ValSerPhe	SerCysArg	ThrSerLys	AsnValGly	ThrAsnIle	HisTrpTyr
55		GTCAGTTTC	TCCTGCAGG	ACCAGTAAG	AACGTTGGC	ACAAACATT	CATTGGTAT
		CAGTCAAAG	AGGACGTCC	TGGTCATTC	TTGCAACCG	TGTTTGTA	GTAACCATA

CDR L2

		GlnGlnArg	ThrAsnGly	SerProArg	LeuLeuIle	LysTyrAla	SerGluArg
109		CAGCAAAGA	ACAAATGGT	TCTCCAAGG	CTTCTCATA	AAGTATGCT	TCAGAGCGT
		GTCGTTTCT	TGTTTACCA	AGAGGTTCC	GAAGAGTAT	TTCATACGA	AGTCTCGCA

CDR L2

		LeuProGly	IleProSer	ArgPheSer	GlySerGly	SerGlyThr	AspPheThr
163		TTACCTGGG	ATCCCTTCC	AGGTTTAGT	GGCAGTGGG	TCAGGGACA	GATTTTACT
		AATGGACCC	TAGGGAAGG	TCCAAATCA	CCGTCACCC	AGTCCCTGT	CTAAATGA

CDR L3

		LeuSerIle	AsnSerVal	GluSerGlu	AspIleAla	AspTyrTyr	CysGlnGln
217		CTTAGCATC	AACAGTGTG	GAGTCTGAA	GATATTGCT	GATTATTAC	TGTCAACAA
		GAATCGTAG	TTGTCACAC	CTCAGACTT	CTATAACGA	CTAATAATG	ACAGTTGTT

CDR L3

		SerAsnAsn	TrpProTyr	ThrPheGly	GlyGlyThr	LysLeuGlu	IleLysArg
271		AGTAATAAC	TGGCCATAC	ACGTTCCGA	GGGGGGACC	AAGCTGGAA	ATAAAACGG
		TCATTATTG	ACCGGTATG	TGCAAGCCT	CCCCCCTGG	TTGACCTT	TATTTTGCC

Figura 12B

Listado de secuencia de CDR para anticuerpo de Tnl 19C7 AM1-AM4

	CDR H1	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
SEQ ID NO: 30	19C7 WT	G	Y	T	F	T	D	Y	N	I	H
SEQ ID NO: 31	19C7 AM1	-	-	-	-	-	-	-	-	L	-
SEQ ID NO: 32	19C7 AM2	-	-	-	-	-	-	-	-	L	-
SEQ ID NO: 33	19C7 AM3	-	-	S	-	-	-	-	-	L	-
SEQ ID NO: 34	19C7 AM4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

	CDR H1	95	96	97	98	99	100	100?	100?	101	102
SEQ ID NO: 35	19C7 WT	D	A	Y	D	Y	D	W	L	A	Y
SEQ ID NO: 36	19C7 AM1	-	-	-	-	-	-	Y	-	T	D
SEQ ID NO: 37	19C7 AM2	-	-	-	-	-	-	Y	-	T	D
SEQ ID NO: 38	19C7 AM3	-	-	-	-	-	-	Y	-	T	D
SEQ ID NO: 39	19C7 AM4	-	F	-	-	S	-	A	-	-	D

	CDR L1	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
SEQ ID NO: 40	19C7 WT	R	A	S	Q	S	I	G	T	N	I	Y
SEQ ID NO: 41	19C7 AM1	-	T	-	K	N	V	-	-	-	-	H
SEQ ID NO: 42	19C7 AM2	-	T	-	K	N	V	-	-	-	-	H
SEQ ID NO: 43	19C7 AM3	-	T	-	K	N	V	-	-	-	-	H
SEQ ID NO: 44	19C7 AM4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

	CDR L2	50	51	52	53	54	55	56
SEQ ID NO: 45	19C7 WT	Y	A	S	E	S	I	S
SEQ ID NO: 46	19C7 AM1	-	-	-	-	R	L	P
SEQ ID NO: 47	19C7 AM2	-	G	T	-	R	V	F
SEQ ID NO: 48	19C7 AM3	-	-	-	-	-	-	-
SEQ ID NO: 49	19C7 AM4	-	-	-	-	-	-	-

Figura 13