

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 531 561**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/24** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61P 29/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.08.2010 E 10812667 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.12.2014 EP 2470671**

54 Título: **Anticuerpos de antiquina que se enlazan a múltiples quimioquinas CC**

30 Prioridad:

**28.08.2009 US 238015 P**

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

**17.03.2015**

73 Titular/es:

**REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.  
(100.0%)  
777 Old Saw Mill River Road  
Tarrytown, NY 10591, US**

72 Inventor/es:

**ALLISON, DAN y  
RAPORT, CAROL**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

ES 2 531 561 T3

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

**DESCRIPCIÓN**

Anticuerpos de antiquina que se enlazan a múltiples quimioquinas CC

Antecedentes de la invención

Campo de la invención

5 La invención abarca anticuerpos de antiquina, o anticuerpos que se enlazan a dos, tres, cuatro, cinco, o más quimioquinas CC (las quimioquinas CC también se conocen como  $\beta$ -quimioquinas), en particular aquellos anticuerpos que se enlazan a al menos tres quimioquinas en donde al menos una quimioquina CC es seleccionada del grupo que consiste de RANTES/CCL5, MIP-1 $\alpha$ /CCL3 y MIP-1 $\beta$ /CCl4. A diferencia de los anticuerpos que se enlazan solamente a una quimioquina CC individual, los anticuerpos de antiquina direccionan prácticamente el problema de la redundancia funcional entre las quimioquinas CC mediante el enlazamiento a, detectando, y/o neutralizando más de una quimioquina CC a la vez. Otros aspectos de la invención incluyen usos de diagnósticos y terapéuticos de anticuerpos de antiquina incluyendo el tratamiento de condiciones, trastornos o enfermedades mediadas por quimioquinas CC; líneas celulares de hibridoma que producen anticuerpos de antiquina y métodos para producir hibridomas mediante la inmunización secuencial; métodos para humanizar anticuerpos de antiquina; y métodos para mejorar anticuerpos de antiquina por maduración de afinidad.

Descripción de la técnica relacionada

Las quimioquinas son mediadores clave de la inflamación y están implicadas en el desarrollo de enfermedades autoinmunes; Viola & Luster, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 48: 171-197 (2008). Se producen en sitios de inflamación o infección e inducen la migración de los leucocitos de la circulación en el tejido. Durante mucho tiempo se han buscado maneras simples y efectivas para modular los procesos de inflamación o inmunológicos mediados por quimioquinas. Estos esfuerzos se ven complicados por la redundancia y la superposición de las funciones de numerosas quimioquinas diferentes y sus receptores. Por ejemplo, los inhibidores de quimioquinas se han utilizado para tratar condiciones autoinmunes en modelos animales preclínicos, pero aún tienen que tener éxito en lo clínico para el tratamiento de indicaciones autoinmunes. Se ha propuesto que esta falta de eficacia puede ser debida a la redundancia en las funciones de quimioquinas. Se han identificado más de 50 diferentes quimioquinas y cada una tiene diferentes propiedades estructurales y funcionales. La especificidad de algunas quimioquinas se superpone, es decir, que se enlazan al mismo tipo de receptor o actúan en tipos similares de células; Vergunst, et al., *Arthritis Rheum.* 58: 1931-1939 (2008). Una quimioquina particular puede enlazarse a más de un tipo de receptor de quimioquina y un receptor de quimioquina dado puede estar enlazado por más de un tipo de quimioquina. Por lo tanto, es altamente deseable el desarrollo de un agente individual capaz de enlazarse a, bloquear el enlazamiento a quimioquina a un receptor, o de otro modo neutralizar la actividad de más de una quimioquina.

Las quimioquinas que toman su nombre de citoquinas quimiotácticas, son pequeños polipéptidos secretados que regulan el movimiento de las células inmunes en los tejidos; Baggiolini, et al., *Adv. Immunol.* 55:97-179 (1994); Oppenheim et al., *Ann. Rev. Immunol.* 9:617-648 (1991).

35 Todas las quimioquinas comparten una estructura clave griega que se estabiliza por enlaces disulfuro entre los residuos de cisteína conservados. Sin embargo, las quimioquinas se asignan adicionalmente a cuatro familias diferentes con base en el número y posición de estos residuos de cisteína conservados. Las  $\alpha$ - y  $\beta$ -quimioquinas contienen cada una cuatro residuos de cisteína conservados. Las primeras dos cisteínas de una  $\alpha$ -quimioquina están separadas por un aminoácido individual, formando así un motivo característico de aminoácidos CXC. Las dos primeras cisteínas conservadas de una  $\beta$ -quimioquina son adyacentes. Así, los  $\beta$ -quimioquinas también se conocen como quimioquinas CC. En contraste, la linfotactina es el único miembro de una tercera clase de quimioquinas XC y contiene solamente el segundo y cuarto residuos de cisteína conservados. Una cuarta clase de quimioquinas, de las cuales la fractalquina es el único miembro, es la clase CXXXC o CX<sub>3</sub>C que tiene 3 aminoácidos que separan las dos primeras cisteínas conservadas. En los humanos, las  $\alpha$ -quimioquinas son codificadas principalmente por genes agrupados en el cromosoma 4 y las  $\beta$ -quimioquinas son codificadas principalmente por los genes en el cromosoma 17. La Linfotactina está codificada en el cromosoma 1 y la fractalquina en el cromosoma 16.

Las quimioquinas forman gradientes que sirven como quimioatrayentes y señales de proliferación potencial de las células inmunes y otras tales como monocitos, macrófagos, basófilos, eosinófilos, linfocitos T y fibroblastos. Las quimioquinas CC exhiben propiedades quimioatrayentes mediante la formación de gradientes de concentración reconocidos por las células quimiotácticas; las quimioquinas CC también señalan tipos de células particulares para proliferar, incluyendo fibroblastos y células inmunes tales como monocitos, macrófagos, linfocitos T, basófilos y eosinófilos. Los receptores objetivo y las células de quimioquinas, incluyendo las quimioquinas CC son descritas por Viola, et al., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 48:171-197 (2008), véase por ejemplo, la Figura 1, cuyo documento se relaciona con las funciones quimioatrayentes y de señalización de la quimioquina CC

55 Las quimioquinas comparten características estructurales asociadas con funciones particulares de quimioquinas, tales como con el enlazamiento a un receptor de quimioquina. Las estructuras comunes incluyen un segmento

alargado de terminal N (dominio de terminal N) que precede al primer residuo de cisteína, bucle N, hélice 3<sub>10</sub>, hebras beta β<sub>1</sub>, β<sub>2</sub>, y β<sub>3</sub>, los bucles 30, 40 y 50; ubicación de enlaces disulfuro, y el segmento α-helicoidal del terminal C.

- Estas y otras estructuras de quimioquinas CC, incluidos los residuos de aminoácidos conservados u homólogos entre las diferentes quimioquinas CC, así como los residuos de aminoácidos accesibles al solvente, parcialmente accesibles al solvente, y enterrados de quimioquinas CC se divulgan en Fernandez, et al., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 42:469-99 (2002), véase por ejemplo las Figuras 1 y 2. Es poco probable que residuos de aminoácidos enterrados de quimioquinas, no desnaturalizadas intactas formen epítopos o determinantes antigénicos contactados por anticuerpos a una quimioquina. En contraste, los residuos de quimioquinas CC expuestos a solventes o a la superficie son más accesibles al enlazamiento al anticuerpo.
- 5 Los residuos de quimioquina CC asociados con el enlazamiento al receptor de quimioquina de CCL3/MIP-1α incluyen residuos 11-15 (CCFSY), residuos 17-24 (SRQIPQNF), residuos 34-35 (QC), y residuos 57-67 (EWWQKYVSDLE) de SEQ ID NO: 71;
- residuos asociados con el enlazante al receptor de quimioquina CCL4/MIP-1β incluyen residuos 11-15 (CCFSY), residuos 17-24 (ARKLPHNF), residuos 34-35 (LC), o residuos 57-67 (SWVQEYVYDLE) de SEQ ID NO: 72;
- 15 residuos asociados con el enlazante a CCL5/RANTES incluyen residuos 10-14 (CCFAY), residuos 16-23 (ARPLPRAH), residuos 33-34 (KC), o residuos 56-66 (KVVREYINSLE) de SEQ ID NO: 73;
- residuos asociados con el enlazante a CCL23/MPIF-1 incluyen residuos 9-13 (CCISY), residuos 15-22 (PRSIPCSL), residuos 32-33 (EC), o residuos 55-65 (KQVQVCMRMLK) de SEQ ID NO: 81;
- y residuos asociados con CCL15/HCC-2 incluyen residuos 8-12 (CCTSY), residuos 14-21 (SQSIPCSL), residuos 31-32 (EC), o residuos 54-64 (PGVQDCMKLLK) de SEQ ID NO: 79. Residuos de aminoácidos correspondientes de otras quimioquinas CC están representados, por ejemplo, en la Figura 1 de Fernandez, et al., *id.* (2002).
- Dominios conservados para quimioquinas CC se divulgan en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Estos datos estructurales se relacionan con la información de bases de datos de proteínas y de dominio conservado en el sitio web arriba mencionado teniendo como último acceso el 24 de agosto, 2010.
- 25 Quimioquinas en la clase de quimioquinas CC interactúan siete receptores transmembrana acopladas a proteína G denominadas receptores de quimioquinas CC o CCRs, Rossi & Zlotnik, *Ann. Rev. Immunol.* 18:217-242 (2002). La interacción de la quimioquina con su receptor regula la activación de moléculas de adhesión y afecta la diapédesis y la extravasación de las células inmunes de la circulación en los tejidos.
- Las quimioquinas han estado implicadas en el desarrollo y mantenimiento de numerosas condiciones inflamatorias e inmunológicas, trastornos y enfermedades. Estas incluyen artritis reumatoide, esclerosis múltiple, aterosclerosis, psoriasis, enfermedad inflamatoria del intestino (incluyendo la enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad celíaca), restenosis vascular, nefritis lupus, glomerulonefritis, rechazo de trasplantes, esclerodermia, enfermedad fibrótica, asma (y otras condiciones inflamatorias del pulmón). Por ejemplo, los niveles de quimioquinas CC son elevados en los tejidos afectados de los pacientes con artritis reumatoide, esclerosis múltiple (MS), aterosclerosis y otras. Modelos animales preclínicos de estas enfermedades muestran que la inhibición de quimioquinas individuales puede al menos mejorar parcialmente los síntomas de la enfermedad. Por ejemplo, Kasama, et al., *J. Clin. Invest.* 95: 2868-2876 (1995) demostraron que la administración de un anticuerpo que inhibe MIP-1α/CCL3 podría reducir las puntuaciones clínicas de la artritis en aproximadamente un 50% en un modelo de roedor de la artritis reumatoide. De la misma forma, Ogata, et al., *J. Pathol.* 182: 106-114 (1997) demostraron que un anticuerpo anti-MCP-1/CCL2 podría disminuir la hinchazón de las articulaciones en aproximadamente un 30%. Los receptores para MIP-1α/CCL3 (incluyendo CCR1 y CCR5) y MCP-1/CCL2 (CCR2) se expresan en un patrón de superposición en los leucocitos, y así es posible que un inhibidor de tanto MIP-1α/CCL3 y MCP-1/CCL2 podría ser más eficaz que los inhibidores individuales de cada quimioquina sola. Viola, et al., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 48:171-197 (2008), divulga clases o tipos específicos de enfermedades y trastornos asociados con o mediados por tales quimioquinas CC, véase, por ejemplo, la Tabla 1.
- 30
- 35
- 40
- 45
- Son conocidos inhibidores naturales de la actividad de quimioquinas y se han desarrollado agentes específicos, tales como anticuerpos o inhibidores de moléculas pequeñas que se enlazan a o interfieren con la actividad de las quimioquinas particulares, véase Fernandez, et al., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 42: 469-99 (2002), en el que se divulgan dichos inhibidores y agentes, véase por ejemplo las páginas 482-488. Vacunas y virus de la viruela relacionados producen una proteína soluble de 35 kD denominada vCCI (SEQ ID NO: 117) que se enlaza e inhibe múltiples quimioquinas CC dentro de la clase de las quimioquinas. Vacunas y virus de la viruela relacionados producen una proteína soluble de 35 kD denominada vCCI (SEQ ID NO: 117) la cual se enlaza e inhibe múltiples quimioquinas dentro de la clase CC de las quimioquinas. La clase CC de quimioquinas actúa generalmente en los leucocitos incluyendo las células T y monocitos; Smith et al., *Virology* 236: 316-327 (1997), Burns et al., *J. Biol. Chem.* 277: 2785-2789 (2002). La vCCI recombinante ha demostrado ser efectiva en la reducción de la infiltración de leucocitos en varios modelos de enfermedad inflamatoria crónica, incluyendo la encefalitis autoinmune experimental
- 50
- 55

Jones et al., Cytokine 43: 220-228 (2008) and asthma; Dabbagh, et al., J. Immunol. 165: 3418-3422 (2000). Sin embargo, el uso de sustancias naturales tales como las proteínas virales similares a vCCI extrañas al sistema inmune del sujeto genera cuestiones de seguridad. La administración de sustancias, tales como vCCI puede inducir respuestas fisiológicas o inmunes no deseadas y tales sustancias pueden ser neutralizadas, eliminadas o destruidas como extrañas por la limpieza del anfitrión o mecanismos de defensa. Las solicitud internacional WO 2004/050836 divulga anticuerpos monoclonales que se enlazan a al menos tres quimioquinas CC diferentes seleccionadas de CCL2/MCP-1, CCL7/MCP-3, CCL8/MCP-2 y CCL12/MCP-5.

Con esto en mente, los inventores se enfocaron en el desarrollo de un método para la producción de anticuerpos, especialmente anticuerpos humanizados, que pueden enlazarse específicamente a neutralizar y más de una quimioquina, pero que no presentan los riesgos asociados con moléculas similares a vCCI. Inhibidores de quimioquinas de la técnica anterior, tales como anticuerpos que se enlazan a una quimioquina CC individual sufren del problema de la redundancia de los receptores de quimioquinas CC. Por ejemplo, CCL3/MIP-1 $\alpha$  y CCL5/RANTES se enlazan cada una a los receptores de quimioquinas 1 (CCR1) y 5 (CCR5), véase Figura 1 de Viola, *id.* (2008). Un anticuerpo que solamente inhibe el enlazamiento de CCL3 a estos receptores de quimioquinas no prevendría la activación del receptor por el enlazamiento de otras quimioquinas CC, tales como CCL5.

Los inventores inicialmente direccionaron las quimioquinas CC MIP-1 $\alpha$ /CCL3, MIP-1 $\beta$ /CCL4 y RANTES/CCL5, que constituyen los ligandos primarios para los receptores de quimioquinas CCR1 y CCR5. LA CCL2/MCP-1 también fue direccionada como un ligando para CCR2. Como se muestra en la Figura 1 de Viola, et al., *id.* (2008), estos receptores se expresan ampliamente en monocitos y células T, así como en otros subconjuntos de leucocitos. Ellos están implicados en numerosos estados de enfermedad inflamatoria, tanto en modelos animales preclínicos de la enfermedad y en la enfermedad humana.

Breve descripción de la invención

Un aspecto de la invención es un anticuerpo de antiquina o fragmento enlazante a antígeno del mismo que se puede enlazar a al menos, tres, cuatro, cinco, seis o siete o más quimioquinas CC diferentes tal como se define en las reivindicaciones 1-26. Un ejemplo de un anticuerpo de antiquina es uno que puede enlazarse a tres o más quimioquinas CC, incluyendo al menos una quimioquina CC que interactúa con los receptores de quimioquinas CCR1, o CCR5. Otros ejemplos de un anticuerpo de antiquina o fragmento enlazante a antígeno de un anticuerpo de antiquina incluyen aquellos que se enlazan a al menos tres quimioquinas CC diferentes seleccionadas del grupo que consiste de CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ , CCL5/RANTES, CCL14/HCC-1, CCL15/HCC-2, CCL18/PARC, y CCL23/MPIF-1.

El enlazamiento se presenta a través del contacto entre el anticuerpo de antiquina y al menos un determinante de la quimioquina CC. Por ejemplo, el enlazamiento puede presentarse entre el anticuerpo y un determinante de CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP 1 $\beta$ , CCL5/RANTES, CCL14/HCC-1, CCL15/HCC-2, CCL18/PARC o CCL23/MPIF-1 que se ubica entre los residuos de CC de la quimioquina CC y el último residuo C de la quimioquina CC. La ubicación de los residuos CC adyacentes (cisteína- cisteína) y el último residuo de cisteína en quimioquinas CC son bien conocidos en la técnica y pueden ser fácilmente identificados en las secuencias de quimioquinas CC que se muestran en el listado de secuencias.

Anticuerpos de antiquina y sus fragmentos enlazantes a antígeno también se pueden enlazar a al menos un determinante de una quimioquina CC, incluyendo CCL2/MCP-1, CCL3/MMIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ , CCL5/RANTES, CCL14/HCC-1, CCL15/HCC-2, CCL18/PARC, y CCL23/MPIF-1, que está localizado en el bucle N, bucles 30, o bucles 40 de dicha quimioquina CC.

Un anticuerpo de antiquina también puede caracterizarse por su capacidad para enlazarse a algunas quimioquinas CC, pero no a otros. Por ejemplo, un anticuerpo de antiquina puede enlazarse a CCL3/MIP-1 $\alpha$  y CCL4/MIP-1 $\beta$ , pero no se enlaza a CCL5/RANTES, CCL2/MCP-1, CCL8/MCP-2 o CCL7/MCP-3. Otros no se enlazarán a algunas o todas de las quimioquinas y otras moléculas biológicamente activas nombradas en las figuras, incluyendo MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES, MPIF-1, HCC-1, HCC-2, HCC-4, Parc, MCP- 2, MCP-3, MCP-4, Eotaxin, MDC, ELC, I-309, IL-8, SDF o Fractalquina, así como a otras quimioquinas. Por ejemplo, antiquinas que no se enlazan a al menos uno de MCP-1, MCP-2 o MCP-3 se ejemplifican aquí.

Un antiquina también puede estar caracterizado por una capacidad de enlazarse a dos o más quimioquinas CC de una especie, pero no a una quimioquina CC correspondiente de otra especie. Por ejemplo, un antiquina puede enlazarse a CCL3 humano, pero no se enlaza sustancialmente a CCL3 murino. Ejemplos específicos de especificidad de enlazamiento de los anticuerpos de antiquina aparecen en las Figs. 8-12.

Algunos anticuerpos de antiquina y sus fragmentos enlazantes a antígeno también pueden inhibir la interacción de una quimioquina CC con un receptor correspondiente. Tal inhibición puede tener efectos funcionales, tales como la inhibición de la quimiotaxis u otros efectos activados por la quimioquina que se enlaza a un receptor de.

El anticuerpo de antiquina puede enlazarse a al menos un determinante dentro del receptor CC que enlaza residuos de una quimioquina CC. En la técnica están documentados residuos de aminoácidos y segmentos de quimioquinas CC de los que se cree o se conoce que están asociados con el enlazamiento del receptor de quimioquinas CC.

5 Se cree que el terminal N, el bucle N, los bucles 30 y residuos junto a los disulfuros y en la hélice alfa están involucradas en el enlazamiento del receptor para la familia de las quimioquinas CC en general. La descripción de determinadas características estructurales de quimioquinas que se correlacionan con sus diversas funciones se divulgan en las siguientes dos publicaciones. Baysal, et al., *Proteins* 43(2):150-60 (2001) and Kuloglu, et al., *Biochemistry*, 40(42):12486-96 (2001). Véase NCBI Conserved Domain Database CDD 29111 para los dominios funcionales propuestos de las quimioquinas CC.

10 Los inventores han producido e identificado anticuerpos monoclonales antiquina específicos 3C12F, 7D1G, 7D12A, 18V4F y 18P7E. Estas antiquinas pueden utilizarse para identificar otros anticuerpos o sustancias que competitivamente bloquean el enlazamiento de estos anticuerpos monoclonales antiquina a una o más de las quimioquinas CC que reconocieron usando ensayos de inhibición competitiva conocidos en la técnica. Los  
15 inhibidores competitivos, tales como anticuerpos que inhiben el enlazamiento de anticuerpos de antiquina también están abarcados por la invención, así como métodos de detección de tales inhibidores competitivos utilizando anticuerpos monoclonales antiquina 3C12F, 7D1G, 7D12A, 18V4F y 18P7E.

Los anticuerpos de antiquina pueden ser anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos humano-murino, murino o de otros vertebrados, anticuerpos aviares o de mamíferos, o sus fragmentos enlazantes a antígeno.

20 Un tipo de anticuerpo de antiquina de la invención tiene especificidades de enlazamiento idénticas o similares a las del anticuerpo monoclonal 3C12F y se puede enlazar a al menos dos, tres, cuatro o cinco quimioquinas CC seleccionadas del grupo que consiste de CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ , CCL5/RANTES, CCL15/HCC-2, y CCL23/MPIF-1. Estos pueden exhibir ninguno o sustancialmente ningún enlazamiento a otras quimioquinas, incluyendo otras quimioquinas que se muestran en la Figura 8, tales como HCC-1, PARC, o MCP 1, 2 o 3. Los  
25 anticuerpos de este tipo pueden enlazarse a dominios que pueden ser importantes en el enlazamiento a receptores de quimioquinas, incluyendo:

un determinante en el bucle N, bucles 30, o bucles 40 de una quimioquina CC;

al menos un determinante antigénico de CCL3/MIP-1 $\alpha$  localizado dentro de los residuos 11-15 (CCFSY), residuos 17-24 (SRQIPQNF), residuos 34-35 (QC), o residuos 57-67 (EWWQKYVSDLE) de SEQ ID NO: 71;

30 al menos un determinante antigénico de CCL4/MIP-1 $\beta$  localizado dentro de los residuos 11-15 (CCFSY), residuos 17-24 (ARKLPHNF), residuos 34-35 (LC), o residuos 57-67 (SWVQEYVYDLE) de SEQ ID NO: 72;

al menos un determinante antigénico de CCL5/RANTES localizado dentro de los residuos 10-14 (CCFAY), residuos 16-23 (ARPLPRAH), residuos 33-34 (KC), o residuos 56-66 (KWVREYINSLE) de SEQ ID NO: 73;

35 al menos un determinante antigénico de CCL23/MPIF-1 localizado dentro de los residuos 9-13 (CCISY), residuos 15-22 (PRSIPCSL), residuos 32-33 (EC), o residuos 55-65 (KQVQVCMRMLK) de SEQ ID NO: 81; o

al menos un determinante antigénico de CCL15/HCC-2 localizado dentro de los residuos 8-12 (CCTS Y), residuos 14-21 (SQSIPCSL), residuos 31-32 (EC), o residuos 54-64 (PGVQDCMKKLLK) de SEQ ID NO: 79.

40 Este tipo de anticuerpo puede comprender al menos una región determinante de complementariedad (CDR) de MAb 3C12F seleccionada del grupo consistente de SEQ ID NOS: 3, 4, 5, 8, 9 o 10, o SEQ ID NOS: 53, 54, 55, 58, 59 o 60 o al menos una CDR de un anticuerpo que inhibe competitivamente o bloquea el enlazamiento de MAb 3C12F a las quimioquinas CC que se enlaza o bloquea el enlazamiento de RANTES a vCCI (véase Figura 2). Un anticuerpo de antiquina de este tipo puede contener 1, 2, 3, 4, 5 o 6 CDR de MAb 3C12F o CDRs en el que 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más residuos de aminoácidos de SEQ ID NOS: 3, 4, 5, 8, 9 y/o 10, o SEQ ID NOS: 53, 54, 55, 58, 59 y/o 60 se han eliminado, insertado o sustituido. Así, las secuencias de CDR pueden ser idénticas a aquellas de un anticuerpo  
45 producido por la línea celular de hibridoma 3C12F o por un subcultivo del mismo; pueden corresponder a las de un análogo de anticuerpo de antiquina de 3C12F, o corresponder a aquellos de un anticuerpo monoclonal antiquina que bloquea o inhibe competitivamente el enlazamiento de MAb 3C12F a dos o más de las quimioquinas CC a las que se enlaza. Tales anticuerpos pueden ser en forma de un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano-murino quimérico, anticuerpo murínico, aviar o de otros vertebrados; o un fragmento de unión a  
50 antígeno del mismo.

Un segundo tipo de anticuerpos tiene una especificidad de unión que es similar o idéntica a 7D1G, y se enlaza a al menos dos, tres, cuatro, cinco o seis quimioquinas CC seleccionadas del grupo que consiste de CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ , CCL5/RANTES, CCL14/HCC-1, CCL23/MPIF-1, y CCL18/PARC. Este tipo de anticuerpo puede

## ES 2 531 561 T3

exhibir ninguno o sustancialmente ningún enlazamiento a otras quimioquinas, tales como las otras quimioquinas que se muestran en la Figura 10, tales como HCC-2, eotaxina, o MCP 1, 2, 3 o 4.

Los anticuerpos de este segundo tipo se pueden enlazar a los determinantes estructurales de una quimioquina o quimioquina CC,

5 incluyendo a un determinante en el bucle N o los bucles 40 de al menos una de las quimioquinas CC unidas por MAb 7D1G;

al menos un determinante antigénico de CCL3/MIP-1 $\alpha$  localizado dentro de los residuos 11-15 (CCFSY), residuos 17-24 (SRQIPQNF), residuos 34-35 (QC), o residuos 57-67 (EWWQKYVSDLE) de SEQ ID NO: 71;

10 al menos un determinante antigénico de CCL4/MIP-1 $\beta$  localizado dentro de los residuos 11-15 (CCFSY), residuos 17-24 (ARKLPHNF), residuos 34-35 (LC), o residuos 57-67 (SWVQEYVYDLE) de SEQ ID NO: 72;

al menos un determinante antigénico de CCL5/RANTES localizado dentro de los residuos 10-14 (CCFAY), residuos 16-23 (ARPLPRAH), residuos 33-34 (KC), o residuos 56-66 (KWVREYINSLE) de SEQ ID NO: 73;

al menos un determinante antigénico de CCL23/MPIF-1 localizado dentro de los residuos 9-13 (CCISY), residuos 15-22 (PRSIPCSL), residuos 32-33 (EC), o residuos 55-65 (KQVQVCMRMLK) de SEQ ID NO: 81;

15 al menos un determinante antigénico de CCL14/HCC-1 residuos 8-12 (CCFTY), residuos 14-21 (TYKIPRQR), residuos 31-32 (QC), o residuos 54-64 (KWVQDYIKDMK) de SEQ ID NO: 78; o

al menos un determinante antigénico de CCL18/PARC residuos 10-14 (CCLVY), residuos 16-23 (SWQIPQKF), residuos 33-34 (QC), o residuos 56-66 (KWVQKYISDLK) de SEQ ID NO: 82.

20 Estructuralmente, estos anticuerpos pueden comprender una o más CDR de MAb 7D1G, seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 23, 24, 25, 28, 29 o 30, o una CDR de un anticuerpo que inhibe competitivamente o bloquea el enlazamiento de MAb 7D1G a las quimioquinas CC que se enlaza. Una clase de un anticuerpo de antiquina de este tipo contendrá 1, 2, 3, 4, 5 o 6 CDR de MAb 7D1G o CDR en el que 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más residuos de aminoácidos de las SEC ID NOS: 23, 24, 25, 28, 29 y/o 30 se han eliminado, insertado o sustituido. Así, las secuencias de CDR pueden ser idénticas a aquellas de un anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma 25 7D1G o por un subcultivo del mismo; pueden corresponder a aquellas de un análogo de anticuerpo de antiquina de 7D1G, o corresponder a aquellas de un anticuerpo monoclonal antiquina que bloquea o inhibe competitivamente el enlazamiento de MAb 7D1G a dos o más de las quimioquinas CC a las que se enlaza. Tales anticuerpos pueden ser en la forma de un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano-murino quimérico, anticuerpo murínico, aviar o de otros vertebrados; o un fragmento de enlazamiento a antígeno del mismo.

30 Un tercer tipo de anticuerpos de antiquina tiene una especificidad de unión similar o idéntica a 7D12A y se enlaza a al menos dos, tres o cuatro quimioquinas CC seleccionadas del grupo que consiste de CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ , CCL5/RANTES, y CCL23/MPIF-1. Estos pueden exhibir ninguno o sustancialmente ningún enlazamiento a otras quimioquinas, incluyendo otras quimioquinas que se muestran en la Figura 9, tal como CCL2 / MCP-1.

35 Tal producto de anticuerpo puede enlazarse a un determinante en el bucle N o bucle 40 de al menos una de dichas quimioquinas CC; se puede enlazar a al menos un determinante antigénico de CCL3/MIP-1 $\alpha$  localizado dentro de los residuos 11-15 (CCFSY), residuos 17-24 (SRQIPQNF), residuos 34-35 (QC), o residuos 57-67 (EWWQKYVSDLE) de SEQ ID NO: 71;

al menos un determinante antigénico de CCL4/MIP-1 $\beta$  localizado dentro de los residuos 11-15 (CCFSY), residuos 17-24 (ARKLPHNF), residuos 34-35 (LC), o residuos 57-67 (SWVQEYVYDLE) de SEQ ID NO: 72;

40 al menos un determinante antigénico de CCL5/RANTES localizado dentro de los residuos 10-14 (CCFAY), residuos 16-23 (ARPLPRAH), residuos 33-34 (KC), o residuos 56-66 (KWVREYINSLE) de SEQ ID NO: 73; o

al menos un determinante antigénico de CCL23/MPIF-1 residuos 9-13 (CCISY), residuos 15-22 (PRSIPCSL), residuos 32-33 (EC), o residuos 55-65 (KQVQVCMRMLK) de SEQ ID NO: 81.

45 Estructuralmente estos anticuerpos de tercer tipo pueden comprender al menos una CDR de MAb 7D12A seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 13, 14, 15, 18, 19 o 20, o al menos una CDR de un anticuerpo que inhibe competitivamente el enlazamiento de MAb 7D12A a quimioquinas CC a las que se enlaza. Un anticuerpo de este tipo puede contener 1, 2, 3, 4, 5 o 6 CDRs de MAb 7D12A o CDRs en las cuales 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más residuos de aminoácidos de SEQ ID NOS: 13, 14, 15, 18, 19 y/o 20, se han eliminando, insertado o sustituido. Así, las secuencias de CDR pueden ser idénticas a aquellas de un anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma 50 7D12A o por un subcultivo del mismo; pueden corresponder a aquellas de un análogo de anticuerpo de antiquina de 7D 12A, o corresponden a aquellas de un anticuerpo monoclonal antiquina que bloquea o inhibe competitivamente el

enlazamiento de MAb 7D12A a dos o más de las quimioquinas CC a la que se enlaza. Tales anticuerpos pueden ser en la forma de un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano-murino quimérico, murínico, anticuerpo aviar o de otros vertebrados; o un fragmento de enlazamiento a antígeno del mismo.

5 Un cuarto tipo de anticuerpos de antiquina tiene una especificidad de unión similar o idéntica a 18V4F y se enlaza a al menos dos o tres quimioquinas CC seleccionadas del grupo que consiste de CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ , y CCL5/RANTES. Estos pueden exhibir ninguno o sustancialmente ningún enlazamiento a otras quimioquinas, incluyendo otras quimioquinas que se muestran en la Figura 11, tales como CCL2/MCP-1. Tal producto de anticuerpo puede enlazarse a un determinante en el bucle N o los bucles 40 de al menos una de dichas quimioquinas CC; se puede enlazar a al menos un determinante antigénico de CCL3/MIP-1 $\alpha$  localizado dentro de los  
10 residuos 11-15 (CCFSY), residuos 17-24 (SRQIPQNF), residuos 34-35 (QC), o residuos 57-67 (EWVQKYVSDLE) de SEQ ID NO: 71; al menos un determinante antigénico de CCL4/MIP-1 $\beta$  localizado dentro de los residuos 11-15 (CCFSY), residuos 17-24 (ARKLPHNF), residuos 34-35 (LC), o residuos 57-67 (SWVQEYVYDLE) de SEQ ID NO: 72;

15 al menos un determinante antigénico de CCL5/RANTES localizado dentro de los residuos 10-14 (CCFAY), residuos 16-23 (ARPLPRAH), residuos 33-34 (KC), o residuos 56-66 (KWVREYINSLE) de SEQ ID NO: 73.

Estructuralmente este cuarto tipo de anticuerpos puede comprender al menos una CDR de MAb 18V4F seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOS: 33, 34, 35, 38, 39, o 40 o SEQ ID NOS: 63, 64, 65, 68, 69 o 70, o al menos una CDR de un anticuerpo que inhibe competitivamente el enlazamiento de MAb 18V4F a quimioquinas CC a las que se enlaza. U anticuerpo de este tipo puede contener 1, 2, 3, 4, 5 o 6 CDR de MAb 18V4F  
20 o CDR en las cuales 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más residuos de aminoácidos 33, 34, 35, 38, 39 y/o 40; o SEQ ID NOS: 63, 64, 65, 68, 69 y/o 70 se han eliminando, insertado o sustituido con otros residuos de aminoácidos. Así, las secuencias de CDR pueden ser idénticas a aquellas de un anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma 18V4F o por un subcultivo del mismo; pueden corresponder a aquellas de un análogo de anticuerpo de antiquina 18V4F, o corresponder a aquellas de un anticuerpo monoclonal antiquina que bloquea o inhibe competitivamente el  
25 enlazamiento de MAb 18V4F a dos o más de las quimioquinas CC a la que se enlaza. Tales anticuerpos pueden ser en la forma de un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano-murino quimérico, anticuerpo murínico, aviar o de otros vertebrados; o un fragmento de enlazamiento a antígeno de los mismos.

30 Un quinto tipo de anticuerpo de antiquina tiene una especificidad de unión similar o idéntica a 18P7E y se enlaza a al menos dos, o tres quimioquinas CC seleccionadas del grupo que consiste de CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ , y CCL5/RANTES. Estos pueden exhibir ninguno o sustancialmente ningún enlazamiento a otras quimioquinas, incluyendo otras quimioquinas que se muestran en la Figura 12, tal como CCL2/MCP-1. Tal producto de anticuerpo puede enlazarse a un determinante en el bucle N o los bucles 40 de al menos una de las tres quimioquinas CC mencionadas anteriormente.

35 Tal producto de anticuerpo puede enlazarse a un determinante en el bucle N o los bucles 40 de al menos una de dichas quimioquinas CC; se puede enlazar a

al menos un determinante antigénico de CCL3/MIP-1 $\alpha$  localizado dentro de los residuos 11-15 (CCFSY), residuos 17-24 (SRQIPQNF), residuos 34-35 (QC), o residuos 57-67 (EWVQKYVSDLE) de SEQ ID NO: 71;

al menos un determinante antigénico de CCL4/MIP-1 $\beta$  localizado dentro de los residuos 11-15 (CCFSY), residuos 17-24 (ARKLPHNF), residuos 34-35 (LC), o residuos 57-67 (SWVQEYVYDLE) de SEQ ID NO: 72;

40 al menos un determinante antigénico de CCL5/RANTES localizado dentro de los residuos 10-14 (CCFAY), residuos 16-23 (ARPLPRAH), residuos 33-34 (KC), o residuos 56-66 (KWVREYINSLE) de SEQ ID NO: 73.

Estructuralmente este quinto tipo de anticuerpos puede comprender al menos una CDR de MAb 18P7E seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOS: 43, 44, 45, 48, 49 o 50, o al menos una CDR de un anticuerpo que inhibe competitivamente el enlazamiento de MAb 18P7E a quimioquinas CC a las que se enlaza. U anticuerpo  
45 de antiquina de este tipo puede contener 1, 2, 3, 4, 5 o 6 CDR de MAb 18P7E o CDRs en las cuales 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más residuos de aminoácidos de SEQ ID NOS: 43, 44, 45, 48, 49 y/o 50 se han eliminado, insertado o sustituido con otros aminoácidos. Así, las secuencias de CDR pueden ser idénticas a aquellas de un anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma 18P7E o por un subcultivo del mismo; pueden corresponder a aquellas de un análogo de anticuerpo de antiquina 18P7E, o corresponder a aquellas de un anticuerpo monoclonal antiquina que bloquea o inhibe competitivamente el enlazamiento de MAb 18P7E a dos, tres o más de las quimioquinas CC a  
50 la que enlaza. Tales anticuerpos pueden ser en la forma de un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano-murino quimérico, anticuerpo murínico, aviar o de otros vertebrados; o un fragmento de enlazamiento a antígeno de los mismos.

55 Las secuencias de los dominios variables ligeros y pesados, incluyendo aquellos de cada CDR, de 3C12F, 7D1G, 7D12A, 18V4F, 18P7E y sus análogos, u otros anticuerpos de antiquina se pueden emplear como una estructura de núcleo para el diseño de fármacos de miméticos de anticuerpos, como inhibidores competitivos que interfieren con el

- enlazamiento del receptor de quimioquina CC, como ligandos para aislar o identificar quimioquinas o anticuerpos anti-idiotípicos para los anticuerpos de quimioquinas CC, o como inmunógenos para inducir anticuerpos anti-idiotipo contra los anticuerpos para las quimioquinas CC. Tales péptidos incluyen péptidos modificados o estabilizados o péptidos conformacionalmente restringidos, tales como un péptido circular o en bucle que comprende las CDR de un anticuerpo de antiquina. Métodos de diseño péptido que utilizan la CDR de anticuerpos son conocidos en la técnica y se divulgan en Takahashi, et al., Chem. Eur. J. 6(17):3196-3203 o Feng, et al., Cell. Host. Microb. 98(2): 311-316. Estas CDR incluyen las de SEQ ID NOS: 3-5, 8-10, 13-15, 18-20, 23-25, 28-30, 33-35, 38-40, 43-45, 48-50, 53-55, 58-60, 63-65 y 68-70 así como análogos de estas secuencias de péptidos producidos por maduración de afinidad. Las combinaciones de diferentes CDR, bien sea como combinaciones de péptidos separados que comprenden diferentes CDR, o como un conjugado, híbrido, o fusión de dos o más secuencias de péptidos de CDR para formar un producto peptídico unitario, pueden ser usadas para modular o inhibir el enlazamiento a la quimioquina CC o la actividad, inhibir la dímero o multimerización de quimioquinas, o inducir respuestas fisiológicas o inmunológicas útiles.
- Los anticuerpos de antiquina de la invención se pueden formular como una composición que comprende el anticuerpo de antiquina o sus fragmentos de enlazamiento al antígeno con un vehículo, excipiente o regulador como se describe en más detalle a continuación.
- Los métodos para producir líneas celulares de hibridoma que producen anticuerpos de antiquina incluyen secuencialmente la inmunización de un mamífero, tal como un ratón, con una quimioquina CC en particular, seguido por el refuerzo con uno o más quimioquinas CC diferentes, y luego producir una línea celular de hibridoma de dicho mamífero, por ejemplo por fusión de sus células de bazo con un mieloma o línea de células B inmortalizada, y aislar una línea celular de hibridoma que produce un anticuerpo de antiquina enlazando a dos o más quimioquinas o quimioquinas CC.
- Métodos para el tratamiento de una enfermedad, trastorno o condición mediada por uno o más quimioquinas CC, especialmente aquellas mediadas por al menos dos o tres quimioquinas CC reconocidas por un anticuerpo de antiquina comprenden administrar a un sujeto en necesidad del mismo el anticuerpo de antiquina o un fragmento enlazante a antígeno del mismo. La enfermedad, trastorno o condición pueden ser caracterizados por inflamación o por autoinmunidad.
- Otros aspectos de la invención serán evidentes a partir de los dibujos y la descripción detallada de las realizaciones que siguen.
- Breve descripción de los dibujos
- La Figura 1 representa enlazamiento de 3C12F purificado a quimioquinas por ELISA.
- La figura 2 muestra que vCCI de bloques de 3C12F se enlazan a RANTES/CCL5.
- La Figura 3 muestra la titulación de la actividad inhibidora de 3C12F purificado en ensayos de quimiotaxis.
- La Figura 4 muestra la titulación de la actividad inhibidora de 7D12A purificado en ensayos de quimiotaxis.
- La Figura 5 muestra la titulación de la actividad inhibidora de 7D1G purificado en ensayos de quimiotaxis.
- La Figura 6 muestra la titulación de la actividad inhibidora de 18V4F purificado en ensayos de quimiotaxis.
- La Figura 7 muestra la titulación de la actividad inhibidora de 18P7E purificado en ensayos de quimiotaxis.
- La Figura 8 representa la especificidad de enlazamiento a quimioquinas de 3C 12F utilizando la plataforma de MSD.
- La Figura 9 representa la especificidad de enlazamiento a quimioquinas de 7D12A utilizando la plataforma de MSD.
- La Figura 10 representa la especificidad de enlazamiento a quimioquinas de 7D1G utilizando la plataforma de MSD.
- La Figura 11 representa la especificidad de enlazamiento a quimioquinas de 18V4F utilizando la plataforma de MSD.
- La Figura 12 representa la especificidad de enlazamiento a quimioquinas de 18P7E utilizando la plataforma de MSD.
- Las Figuras 13a, b, c, y d muestran alineaciones de las secuencias de quimioquinas reconocidos por los cinco anticuerpos de antiquina.
- Descripción detallada de la invención

5 El término "anticuerpo" debe considerarse ampliamente por describir los anticuerpos monoclonales individuales, composiciones de anticuerpos con especificidad poliepitópica, así como fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, scFv y Fv), siempre y cuando muestren la deseada actividad biológica, tal como una capacidad de enlazarse a un antígeno particular, epítipo, o determinante antigénico. Este término incluye anticuerpos intactos, de longitud completa o anticuerpos no truncados, así como fragmentos de anticuerpos, y derivados, variantes y análogos de anticuerpos.

10 Los anticuerpos, incluyendo anticuerpos de antiquina descritos a continuación, pueden tener diferentes isotipos por ejemplo, IgA, IgD, IgE, IgG, IgM, e IgY-- así como diversas subclases de isotipo, tales como las subclases de IgG humanas 1, 2, 3 y 4 o subclases IgA 1 y 2. Anticuerpos multivalentes pueden caracterizarse por su avidéz por un antígeno multivalente. La avidéz fortalece el enlazamiento a antígenos con la repetición de epítipos idénticos, y algunas quimioquinas se han caracterizado por estructuras diméricas o tetraméricas. Cuantos más sitios enlazantes a antígeno tiene una molécula de anticuerpo individual, mayor es su avidéz por los antígenos. Los anticuerpos pueden ser obtenidos o derivados de diversos vertebrados, incluyendo los de mamíferos y aves.

15 El término "anticuerpo monoclonal" tal como se utiliza aquí, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, esto es, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un sitio antigénico individual. Adicionalmente, en contraste con preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales) que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítipos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un determinante individual en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos en que se sintetizan mediante el cultivo de hibridoma, no contaminado por otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como el obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos y no debe interpretarse que se requiere la producción del anticuerpo mediante cualquier método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a ser usados de acuerdo con la presente invención se pueden hacer mediante el primer método del hibridoma descrito por Köhler & Milstein, Nature, 256:495 (1975), o se puede hacer mediante métodos de ADN recombinante, véase, por ejemplo Cabilly, et al., Patente de los Estados Unidos No. 4,816,567.

30 Un "anticuerpo quimérico" se refiere a anticuerpos que contienen secuencias de aminoácidos de dos fuentes diferentes, por ejemplo, uno que contiene segmentos de anticuerpos humanos conservados empalmados a los segmentos variables de un anticuerpo murínico conocido para enlazar a un epítipo o antígeno particular. Una porción de cada una de las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera es idéntica u homóloga a las secuencias en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase particular, mientras que el segmento restante de las cadenas es homólogo o idéntico a las secuencias de otras especies. En una realización, la invención provee un anticuerpo quimérico o fragmento enlazante al antígeno, en el que las regiones variables de ambas cadenas ligera y pesada imitan las regiones variables de anticuerpos derivados de una especie de mamíferos, mientras que las porciones constantes son homólogas a las secuencias en anticuerpos derivados de otras especies. En una realización de la invención, los anticuerpos quiméricos son hechos mediante el injerto de CDRs de un anticuerpo de ratón en las regiones marco de un anticuerpo humano. Así, los anticuerpos monoclonales de la invención incluyen anticuerpos "quiméricos" en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica con, u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular correspondiente o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la cadena(s) es idéntica con, u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos que retienen una capacidad para enlazarse a una quimioquina CC. Las características de los anticuerpos quiméricos y los métodos para su preparación se describen en Cabilly, et al., Patente de los Estados Unidos No. 4,816,567; y Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU, 81:6851-6855 (1984).

50 Una "región determinante de complementariedad (CDR)" forma parte de una región variable de una cadena ligera o pesada de una molécula de inmunoglobulina. Estas secciones de una cadena de anticuerpo forman una porción de la región que determina la especificidad de un anticuerpo para un epítipo particular sobre un antígeno y forma porciones de la molécula de anticuerpo que puede enlazarse directamente al epítipo. CDR3 muestra la mayor variabilidad entre las diferentes CDR que forman un anticuerpo. Las CDR median el contacto entre un anticuerpo y el epítipo que reconocen. Los péptidos aislados que comprenden o análogas a las secuencias de CDR pueden exhibir actividades funcionales adicionales: Polonelli, et al., PLoS One 3:e2371 (2008).

55 "Anticuerpos humanizados" se refieren a anticuerpos los cuales comprenden al menos una cadena que comprende sustancialmente residuos de marco de la región variable de una cadena de anticuerpo humano (denominadas como la inmunoglobulina o anticuerpo aceptor) y al menos sustancialmente una región determinante de complementariedad (CDR) de un anticuerpo no humano (por ejemplo, ratón). Además del injerto de las CDR, los anticuerpos humanizados típicamente se someten a alteraciones adicionales con el fin de mejorar la afinidad y/o disminuir la inmunogenicidad. Un "anticuerpo humanizado" abarca anticuerpos no completamente humanos que son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que residuos de la

región hipervariable del receptor son reemplazados por residuos de la región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseada. En algunos casos, los residuos de la Región Marco (FR) de la inmunoglobulina humana son reemplazados por los correspondientes residuos no humanos. Adicionalmente, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones son hechas para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones hipervariables corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las de las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana que se enlaza inmunoespecíficamente a dos o más quimioquinas CC que han sido alteradas por la introducción de sustituciones, deleciones o adiciones de residuos de aminoácidos (esto es, mutaciones). En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado es un derivado. Tal anticuerpo humanizado comprende sustituciones, deleciones o adiciones de residuos de aminoácidos en una o más CDR no humanas. El derivado de anticuerpo humanizado puede tener sustancialmente el mismo enlazamiento, el mejor enlazamiento o peor enlazamiento cuando se compara con un anticuerpo humanizado no derivado. En realizaciones específicas, uno, dos, tres, cuatro, o cinco residuos de aminoácidos de la CDR se han sustituido, eliminado o agregado (esto es, mutado). Métodos para producir anticuerpos humanizados se divulgan en la las Patentes Europeas Nos. EP 239,400, EP 592,106, y EP 519,596; Publicación Internacional Nos. WO 91/09967 y WO 93/17105; Patente de los Estados Unidos Nos. 5,225,539, 5,530,101, 5,565,332, 5,585,089, 5,766,886, y 6,407,213; y Padlan, *Molecular Immunology* 28(4/5):489-498 (1991); Studnicka, et al., *Protein Engineering* 7(6):805-814 (1994); Roguska, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:969-973 (1994); Tan, et al., *J. Immunol.* 169:1119-25 (2002); Caldas, et al., *Protein Eng.* 13:353-60 (2000); Morea, et al., *Methods* 20:267-79 (2000); Baca, et al., *J. Biol. Chem.* 272:10678-84 (1997); Roguska, et al., *Protein Eng.* 9:895-904 (1996); Couto, et al., *Cancer Res.* 55 (23 Supp):5973s-5977s (1995); Couto, et al., *Cancer Res.* 55:1717-22 (1995); Sandhu, *Gene* 150:409-10 (1994); Pedersen, et al., *J. Mol. Biol.* 235:959-73 (1994); Jones, et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Reichmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992).

Una "variante" o anticuerpo "análogo", se refiere aquí a una molécula que difiere en la secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos del anticuerpo "original" en virtud de la adición, deleción y/o sustitución de uno o más residuos de aminoácidos en la secuencia del anticuerpo original. En una realización, la variante comprende la sustitución de uno o más aminoácidos en una o más regiones hipervariables del anticuerpo original. Por ejemplo, la variante puede comprender al menos uno, por ejemplo, de aproximadamente uno a aproximadamente diez, y preferiblemente de aproximadamente dos a aproximadamente cinco, sustituciones en una o más regiones hipervariables del anticuerpo original. Ordinariamente, la variante tendrá una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75% de identidad en secuencia de aminoácidos con las secuencias de dominio variable de cadena pesada o ligera del anticuerpo original, más preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90 %, y lo más preferiblemente al menos 95%. La identidad u homología con respecto a esta secuencia se define aquí como el porcentaje de residuos de aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos con los residuos del anticuerpo original, después de alinear las secuencias e introducir brechas, si es necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad en secuencia. Ninguno del terminal N, terminal C, o las extensiones internas, deleciones, o inserciones en la secuencia del anticuerpo deberá interpretarse como que afecta la identidad u homología en secuencia. La variante retiene la capacidad de enlazarse al receptor y preferentemente tiene propiedades que son superiores a las del anticuerpo original. Por ejemplo, la variante puede tener una afinidad enlazante más fuerte, una capacidad potenciada para activar el receptor, etc. Para analizar tales propiedades, se debe comparar una forma Fab de la variante a una forma Fab del anticuerpo original o una forma de longitud completa de la variante a una forma de longitud completa del anticuerpo original, por ejemplo, puesto que se ha encontrado que la formato del anticuerpo impacta su actividad en los ensayos de actividad biológica descritos aquí. El anticuerpo variante de interés particular aquí es uno que muestra al menos aproximadamente 10 veces, preferiblemente al menos aproximadamente 20 veces, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 50 veces, el potenciamiento en la actividad biológica cuando se compara con el anticuerpo original.

El anticuerpo "original" aquí, es uno que está codificado por una secuencia de aminoácidos utilizada para la preparación de la variante. Preferiblemente, el anticuerpo original tiene una región marco humana y tiene regiones constantes de anticuerpo humanos. Por ejemplo, el anticuerpo original puede ser un anticuerpo humano en las que son embebidas las CDR de un anticuerpo donante (murino).

Un anticuerpo "aislado" es uno que ha sido identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían con los usos diagnósticos o terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteicos o no proteicos. En algunas realizaciones, el anticuerpo será purificado (1) hasta más del 95% en peso de anticuerpo según se determina por el método de Lowry, y más preferiblemente más de 99% en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de secuencia de aminoácidos del terminal N o interno mediante el uso de un secuenciador de copa giratoria, o (3) hasta la homogeneidad mediante SDS-PAGE bajo condiciones reductoras o no reductoras utilizando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción de plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes ya que al menos un componente del entorno natural del

anticuerpo no estará presente. Normalmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

La expresión "sustancialmente libre de material celular" incluye preparaciones de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo en la que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se separa de los componentes celulares de las células de las que es aislada o producida recombinantemente. Así, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que está sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de anticuerpo o fragmento de anticuerpo que tiene menos de aproximadamente 30%, 20%, 10%, o 5% (en peso seco) de proteína heteróloga (también denominado aquí como una "proteína contaminante"). Cuando se produce recombinantemente el anticuerpo o fragmento de anticuerpo, también es preferiblemente sustancialmente libre de medio de cultivo, esto es, medio de cultivo representa menos de aproximadamente 20%, 10%, o 5% del volumen de la preparación de proteína. Cuando el anticuerpo de antiquina o su fragmento de anticuerpo se produce por síntesis química, preferiblemente se produce libre de precursores químicos u otros productos químicos, esto es, está separada de precursores químicos u otros productos químicos que están involucrados en la síntesis de la proteína. Por consiguiente, dichas preparaciones de anticuerpo o fragmento de anticuerpo tienen menos de aproximadamente 30%, 20%, 10%, 5% (en peso seco) de precursores químicos u otros compuestos diferentes al anticuerpo o fragmento de anticuerpo de interés. En una realización, los anticuerpos de la invención o fragmentos de los mismos son aislados o purificados.

El término "anticuerpo de antiquina " se refiere a un anticuerpo como se definió anteriormente que enlaza a dos o más quimioquinas, preferiblemente el anticuerpo de antiquina enlazará a tres o más quimioquinas CC humanas. Un anticuerpo de antiquina puede ser un anticuerpo monoclonal o policlonal, y preferiblemente será un anticuerpo monoespecífico o monoclonal aislado o purificado. Un anticuerpo de antiquina puede ser un anticuerpo de mamífero, tal como un anticuerpo humano o murino, o un anticuerpo quimérico o humanizado. Anticuerpos completamente humanos se pueden obtener de los humanos o de animales transgénicos o plataformas de despliegue de fagos, véase Lonberg, Curr. Opin. Immunol. 20(4):450-9 (2008) en el que se divulgan los procedimientos de obtención de anticuerpos humanos a partir de animales transgénicos. Los anticuerpos de antiquina pueden ser anticuerpos sintéticos, anticuerpos de dominio único, tales como nanocuerpos (V<sub>H</sub>H) o anticuerpos camelizados, Fvs de cadena sencilla (scFv), anticuerpos de cadena sencilla, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), Fvs enlazado a disulfuro, intracuerpos, y anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) (incluyendo anticuerpos anti-idiotipo y anti-anti-idiotipo frente a los anticuerpos de antiquina de la invención, tales como 3C 12F, etc.), biespecíficos, y fragmentos de cualquiera de los anteriores que se enlazan a determinantes o epítomos de una quimioquina CC. Diversas formas estructurales de anticuerpos de ingeniería se divulgan en *Antibody Engineering: A Practical Approach*, edited by McCafferty, et al., Oxford University Press (1996). El término "anticuerpo de antiquina " abarca moléculas de inmunoglobulina y fragmentos inmunológicamente activos de moléculas de inmunoglobulina que contienen al menos un sitio de enlazamiento a antígeno (ABS). Estos pueden ser de cualquier isotipo, incluyendo IgA, IgD, IgE, IgG, IgM, e IgY y pueden ser derivados de vertebrados, tales como mamíferos y aves, que producen anticuerpos. Preferiblemente, los anticuerpos de antiquina serán humanos o humanizados, aunque los anticuerpos de antiquina pueden ser adecuados para la administración a animales, tales como animales domésticos o criados para la venta, o animales salvajes o animales criados en cautividad. Estos incluyen animales de compañía, tales como perros y gatos; animales de granja, tales como bovinos, equinos, búfalo, búfalo de agua, cerdos, cabras, ovejas, camellos, llamas, etc.; y aves de corral, como pollos, pavos, gansos, halcones, etc. Los expertos en la técnica entenderían cómo producir y adaptar anticuerpos de antiquina para usos no humanos, por ejemplo, mediante la inducción de anticuerpos a quimioquinas CC expresadas por un tipo particular de animal y/o mediante un proceso de manipulación de anticuerpos análogo a la humanización.

Anticuerpos o fragmentos de los mismos Antiquina se enlazarán a las quimioquinas CC específicas y se enlazan no de forma no específica a otras quimioquinas o polipéptidos. Los anticuerpos de antiquina o sus fragmentos que se enlazan inmuno-específicamente a una quimioquina CC o un fragmento de una quimioquina CC pueden reaccionar de forma cruzada con otros antígenos. Sin embargo, los anticuerpos o fragmentos de antiquina que se enlazan inmuno-específicamente a una quimioquina CC o fragmento del mismo pueden ser seleccionados de que no reaccionen de forma cruzada con otros antígenos. Anticuerpos de antiquina o sus fragmentos que se enlazan inmuno-específicamente a quimioquinas CC específicas pueden ser identificadas, por ejemplo, mediante inmunoensayos u otras técnicas conocidas por los expertos en la técnica.

Un "fragmento" describe una porción de una molécula de polipéptido intacto, tal como una quimioquina CC o una inmunoglobulina antiquina. Un "fragmento" puede abarcar un péptido o polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 75, 80, 90, 100, 120, 130, 150, 175 200, o 250 residuos de aminoácidos contiguos de una secuencia de aminoácidos, tales como la secuencia de una quimioquina CC madura intacta o de una cadena ligera o pesada de polipéptido de anticuerpo. Para una quimioquina CC, un fragmento será una porción de la molécula que es más corta que la longitud de la quimioquina madura, tal como un fragmento de quimioquina CC que comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 5 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 10 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 15 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 20 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 25 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 40 residuos contiguos de aminoácidos, al menos 50 residuos de aminoácidos contiguos, o cualquier valor intermedio hasta, pero no incluyendo la secuencia de aminoácidos completa de la quimioquina CC madura. Para un anticuerpo de antiquina , un fragmento incluye un péptido o polipéptido que comprende un aminoácido de al menos

5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, o 50 residuos de aminoácidos contiguos, o hasta, pero no incluyendo toda la longitud de una porción  $V_H$  y/o  $V_L$  de un anticuerpo que se enlaza específicamente a una quimioquina CC, y que se enlaza a al menos dos o tres quimioquinas CC unidas por el anticuerpo de antiquina intacto. Un fragmento de anticuerpo de antiquina puede ser un fragmento de cadena sencilla, por ejemplo, una cadena ligera o pesada o una porción de una cadena ligera o pesada, sino que también incluye fragmentos con múltiples cadenas, tales como fragmentos Fab o  $F(ab')_2$  fragmentos.

"Anticuerpos madurados por afinidad" son anticuerpos que han tenido su afinidad de enlazamiento y/o actividad biológica incrementada alterando el tipo o la localización de uno o más residuos en la región variable. Un ejemplo de alteración es una mutación que puede estar en cualquiera de una CDR o de una región marco. Un anticuerpo madurado por afinidad tendrá típicamente su afinidad de enlazamiento incrementada por encima de la del anticuerpo o fragmento aislado o natural del mismo por 2 a 500 veces. Anticuerpos madurados por afinidad pueden tener afinidades nanomolares o incluso picomolares al antígeno del receptor. Anticuerpos madurados por afinidad se producen mediante procedimientos conocidos en la técnica. Marks, J. D. et al., *Bio/Technology* 10:779-783 (1992) describe la maduración por afinidad mediante combinación aleatoria del dominio de  $V_H$  y  $V_L$ . La mutagénesis aleatoria de CDR y/o residuos marco se divulgan en Barbas, C. F. et al. *Proc Nat. Acad. Sci, USA* 91:3809-3813 (1994), Schier, R. et al. *Gene* 169:147-155 (1995), Yelton, D. E. et al. *J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995), Jackson, J. R. et al. *J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995), and Hawkins, R. E. et al., *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992).

Un "derivado de anticuerpo de antiquina" se refiere a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo de antiquina o un fragmento de anticuerpo enlazante de quimioquinas CC que se enlaza específicamente a al menos dos, tres, cuatro o más quimioquinas CC, que ha sido alteradas por la introducción de sustituciones de residuos de aminoácidos, deleciones o adiciones. El término "derivado", tal como se usa aquí también se refiere a un anticuerpo de antiquina o un fragmento de un anticuerpo de antiquina que ha sido modificado covalentemente, por ejemplo, por glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivación por conocidos grupos protectores/bloqueadores, escisión proteolítica, enlazamiento a un ligando celular u otra proteína, etc. Tal derivado de anticuerpo de antiquina puede ser producido por modificaciones químicas usando técnicas conocidas por los expertos en la técnica, incluyendo, pero no limitado a la escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Un derivado de anticuerpo de antiquina retendrá la capacidad para enlazarse específicamente a dos o más quimioquinas CC.

Un "análogo de anticuerpo de antiquina" se refiere a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos sustancialmente similar tal como un anticuerpo de antiquina conocido y que conserva la capacidad del anticuerpo de antiquina conocido para enlazar dos a dos más quimioquinas CC. Un análogo también puede contener 1, 2, 3, 5 o 10 o más aminoácidos no clásicos. Un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos similar a un polipéptido de anticuerpo de antiquina puede ser descrito por referencia a la identidad con otra proteína o por referencia con una secuencia de polinucleótidos codificadora incluida como:

Un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos similar a un polipéptido de anticuerpo de antiquina puede ser descrito por referencia a la identidad con otra proteína o por referencia con una codificación de secuencia de polinucleótido incluido como:

(i) un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85 %, al menos 90%, al menos 95% o al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de al menos una cadena ligera o pesada, o al menos una CDR de un anticuerpo de antiquina conocido;

(ii) un polipéptido codificado por una secuencia de polinucleótido que hibrida bajo condiciones rigurosas con una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo de antiquina, o fragmento de anticuerpo de antiquina descrito aquí, cuyo polipéptido comprende al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 90, 100, 125, o al menos 150 residuos de aminoácidos. Las condiciones de temperatura y fuerza iónica determinan la "rigurosidad" de la hibridación. Condiciones de hibridación de baja rigurosidad, que corresponden a una  $T_m$  de 55°C, incluyen, por ejemplo, 5x SSC, 0.1% SDS, 0.25% leche, y sin formamida; o 30% de formamida, 5x SSC, 0.5% SDS. Condiciones de hibridación de rigurosidad moderada corresponden a una  $T_m$  superior, por ejemplo, 40% de formamida, con 5x o 6x SSC y condiciones de hibridación de alta rigurosidad corresponden a la  $T_m$  más alta, por ejemplo, 50% de formamida, 0.1x SSC; y

(iii) un polipéptido codificado por una secuencia de nucleótidos que es al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o al menos 99% idéntica a la secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo de antiquina conocido, o fragmento de anticuerpo de antiquina. Un polipéptido con estructura similar a un anticuerpo de antiquina, o fragmento de anticuerpo de antiquina descrito aquí se refiere a un polipéptido que tiene una estructura secundaria, terciaria o cuaternaria similar a la de anticuerpos de antiquina conocida de su fragmento. La estructura del polipéptido y de la proteína pueden determinarse mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo pero no limitados a, cristalografía de rayos X, resonancia magnética nuclear y microscopía electrónica cristalográfica.

El término "región hipervariable" se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables por el enlazamiento a antígeno. La región hipervariable comprende los residuos de aminoácidos de una "región determinante de Complementariedad" o "CDR" en los dominios de cadena variables de cadena ligera y pesada; Kabat, et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991) y/o los residuos de un "bucle hipervariable" en los dominios variables de la cadena pesada y la cadena ligera; Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987). Los residuos de la "Región marco" o "FR" son aquellos residuos del dominio variable diferentes de los residuos de la región hipervariable tal como se definen aquí. Características estructurales de anticuerpos y métodos para la determinación o el análisis de la estructura del anticuerpo son bien conocidos por los expertos en la técnica, se divulgan en Kabat, *id.*, Chothia, et al., *id.*; Déret, et al., *Comput. Appl. Biosci.* 11(4):435-9 (1995); Martin, *Protein* 25(1):130-3 (1996) y Abhinandan, et al., *Mol. Immunol.* 45(14):3832-9 (2008); y Abhinandan, et al., *J. Mol. Biol.* 369(3):852-62 (2007).

Una "quimioquina CC" se refiere a un polipéptido de la familia de citoquinas quimiotácticas que contienen cuatro residuos de cisteína conservados, los dos primeros de los cuales son adyacentes como se describe por ejemplo, por Van Coillie, et al., *Cytokine & Growth Factor Rev.* 10:61-86 (1999). Las quimioquinas CC también se conocen como  $\beta$ -quimioquinas. Sobre la base de estos residuos de cisteína-cisteína adyacente (cys-cys, o CC) las  $\beta$ -quimioquinas son conocidas como quimioquinas "CC", donde "CC" denota los residuos de cisteína adyacentes. Ejemplos de quimioquinas CC son aquellas que enlazan a CCR1 y CCR5, incluyendo CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$  y CCL5/RANTES. Existen quimioquinas CC en mamíferos y aves. Los términos utilizados para la versión humana o murínica de una quimioquina particular, por ejemplo, CCL3/MIP-1 $\alpha$  humana se pueden usar para identificar la molécula correspondiente en otras especies, por ejemplo, "MIP-1 $\alpha$  murino" o "MIP-1 $\alpha$  bovina" y que debe entenderse que se refiere a la molécula análoga, estructuralmente similar en las especies a las que se hace referencia. Las quimioquinas análogas entre las especies de mamíferos y aves pueden tener al menos 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 99%, o cualquier valor intermedio dentro de este rango, identidad en secuencia y exhibirán la misma o similares actividades inmunológicas funcionales.

Secuencias para quimioquinas CC de vertebrados, incluidos los de los mamíferos y las aves, se divulgan en la base de datos NCBI con referencia específica a aquellas secuencias identificadas por los últimos números de acceso actualizados en la base de datos (último acceso el 9 de agosto de 2010) y a Fernández y Lolis, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 42: 469 (2002)

Los números de acceso específicos para las secuencias de polinucleótidos y polipéptidos de quimioquinas humanas CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ , CCL5/RANTES, CCL14/HCC-1, CCL15/HCC-2, CCL18/PARC, y CCL23/MPIF-1 y otras se proveen en la Tabla 4. Cada uno es divulgado específicamente en los números de acceso de catálogo, proveedor, o NCBI descritos en la Tabla 4. Estas quimioquinas están disponibles comercialmente de los proveedores descritos en la Tabla 4.

El término "determinante de quimioquinas CC" tal como se utiliza aquí se refiere a porciones de unas quimioquinas CC que están en contacto por los residuos de un anticuerpo enlazantes a antígeno. Este término abarca tanto los epítopos lineales convencionales reconocidos por un anticuerpo de antiquina en una quimioquina CC, así como epítopos conformacionales, incluyendo epítopos no lineales. La una o más porciones de una quimioquina CC enlazadas por un anticuerpo de antiquina o directamente en contacto con sus residuos de aminoácido que enlazan al antígeno son sus determinantes. La eliminación, sustitución, interrupción o la desnaturalización de un determinante antigénico de una quimioquina CC puede reducir o eliminar la capacidad de un anticuerpo de antiquina para enlazar a la quimioquina CC. Son bien conocidos en la técnica métodos para determinar epítopos de enlazamiento al anticuerpo son bien conocidos en la técnica como se muestra por Ladner, *Biotechnol. Genet. Ing. Rev.* 24: 1-30 (2007). Determinantes de quimioquinas CC incluyen segmentos o dominios involucrados en el enlazamiento a un receptor de quimioquinas (por ejemplo, CCR1 o CCR5), tales como sus bucles N, hebras  $\beta$ -1, 2 y 3, los bucles 30, 40 y 50 y su segmento helicoidal de terminal C, estos determinantes se divulgan en Fernández y Lolis, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 42: 469 (2002), Viola, et al, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 48: 171, y Pakianathan, et al., *Biochem.* 36 (32): 9642 (1997).

Determinantes de quimioquinas CC también se definen por el enlazamiento de proteínas a partir de patógenos, tales como los determinantes de quimioquinas CC enlazados por vCCI de virus de las vacunas, estos determinantes se divulgan en Zhang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103 (38): 13985-13990 (2006).

Los términos "enlace" o "enlazamiento" se refieren a un contacto o interacción química o física entre dos sustancias diferentes. Esto incluye una asociación entre un anticuerpo de antiquina y un determinante correspondiente, tal como un epítipo en una molécula de quimioquinas CC. Tal contacto o interacción puede ser por uno o más de enlaces de hidrógeno iónico, no iónico, enlace de Van der Waals, enlace hidrófono, u otros tipos conocidos de enlace intermolecular. El enlazamiento puede involucrar el contacto directo entre dos moléculas, tales como entre un ligando y su receptor correspondiente, o indirecto a través de una unidad estructural de intervención, tales como un enlazamiento covalente o no covalente a través de un enlazante o unidad estructural bi o polivalente.

"La afinidad de enlazamiento" se describe por la constante de afinidad  $K_a$ , que es la relación entre las constantes de las ratas para enlazamiento y disociación del anticuerpo y el antígeno. Afinidades típicas para anticuerpos IgG son

- 10<sup>-5</sup>-10<sup>-9</sup> mol/L. La afinidad del anticuerpo se mide por muchas técnicas diferentes conocidas en el arte, incluyendo: diálisis de equilibrio, resonancia de plasmón superficial (BIAcore®), y el ensayo de exclusión cinética (KinExA®). La relación entre el antígeno enlazado y libre y la afinidad del anticuerpo se expresa por la ecuación de Scatchard,  $r/c = Kn - Kr$ , donde  $r$  = la relación de [antígeno enlazado] a [anticuerpo total],  $c$  = [antígeno libre],  $K$  = afinidad, y  $n$  = número de sitios de enlazamiento por molécula de anticuerpo (valencia). Si todos los anticuerpos tienen la misma afinidad para el antígeno (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal), un gráfico de  $r/c$  versus  $r$  dará lugar a una línea recta con una pendiente de  $-K$  y un intercepto  $r$  que se aproxima a  $n$ . Si el anticuerpo es heterogéneo (por ejemplo, policlonal), el gráfico de  $r/c$  versus  $r$  producirá una línea curva; la afinidad promedio puede ser determinada por la pendiente de la curva cuando la mitad de los sitios de enlazamiento están llenos ( $r = 1$ ).
- 5 La expresión "específicamente se enlaza a quimioquina CC" describe una interacción según los antecedentes citados más arriba del anticuerpo o un fragmento de anticuerpo con una quimioquina CC particular o conjunto de quimioquinas CC, pero no con otras quimioquinas. Las quimioquinas CC incluyen, pero no se limitan a, CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ , and CCL5/RANTES, y ejemplos de segmentos de quimioquinas CC o dominios incluyen sus residuos de enlazamiento del receptor de quimioquinas, su bucle N, hebras de  $\beta$ -1, 2 y 3, los bucles 30, 40 y 50 y su segmento helicoidal de terminal C. Un anticuerpo que se enlaza específicamente a una quimioquina CC o uno de sus dominios o segmentos puede enlazarse a otros antígenos con menor afinidad según se determina mediante, por ejemplo, inmunoensayos, resonancia de plasmón superficial (BIAcore®), u otros ensayos conocidos en la técnica. Por ejemplo, un anticuerpo de antiquina que tiene una capacidad de cuatro veces o mayor para enlazarse a una quimioquina CC particular con respecto a otro, o anticuerpo de control cuando se compara a la misma concentración y bajo las mismas condiciones sería considerado para enlazarse específicamente a la quimioquina CC. Sin embargo, otros criterios comparativos de enlazamiento se pueden usar, que establecen una diferencia significativa en la cantidad o la afinidad del enlazamiento, estos incluirían un 2, 3,4, 5, 10, 20, 50 100 o 1000 veces mayor cantidad de enlazamiento para el anticuerpo de antiquina o una afinidad de enlazamiento 2, 5, 10, 15, 20, 100, o al menos 1,000 veces mayor.
- 10 Los anticuerpos o fragmentos que se enlazan específicamente a, tres, cuatro, cinco, o más quimioquinas no necesitan reacción cruzada con otros antígenos que no son quimioquinas o no son quimioquinas CC. Anticuerpos de antiquina o fragmentos que se enlazan específicamente a las quimioquinas CC o sus fragmentos pueden ser identificados por inmunoensayos, BIAcore, u otras técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Un anticuerpo o un fragmento del mismo se enlaza específicamente a un antígeno de quimioquinas CC o fragmento del mismo con mayor afinidad que a cualquier antígeno de reacción cruzada como se determina utilizando técnicas experimentales, tales como transferencia Western, radioinmunoensayos (RIA) y ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA). Véase; por ejemplo, Paul, ed, Fundamental Immunology, Second Edition, Raven Press, Nueva York (1989) en las páginas 332 a 336 para una discusión con respecto a la especificidad del anticuerpo.
- 15 El término "concentración inhibitoria" se refiere a una concentración de anticuerpo, tal como un anticuerpo de antiquina o sus fragmentos de enlazamiento a quimioquinas CC, que en comparación con un control reduce una actividad de quimioquinas CC, por ejemplo, 5%, 10%, 20%, 30%, 50%, 80%, 90%, 95%, 99% o hasta 100%. La actividad de quimioquinas CC puede determinarse *in vivo* o *in vitro* e incluye ensayos de actividades de quimioquinas CC, tales como la quimiotaxis. Tales ensayos incluyen el flujo de calcio o activación de la integrina. Los efectos moduladores de un anticuerpo de antiquina o sus fragmentos enlazantes a quimioquinas CC, así como anticuerpos de control, tales como aquellos que no se enlazan a quimioquinas CC o aquellos que se enlazan a una quimioquina sencilla, también pueden determinarse en modelos animales *in vivo*, incluyendo los que miden la activación de quimioquinas CC de los fenómenos inmunes, tales como la inflamación y la autoinmunidad. La inhibición de la actividad de una quimioquina se refiere a que causa una disminución relativa en al menos una actividad de una quimioquina en presencia de un agente inhibidor en comparación con la actividad en ausencia del agente. La inhibición puede implicar antagonismo o neutralización de la actividad de quimioquinas, por ejemplo, mediante el enlazamiento del anticuerpo a un sitio activo en la quimioquina, o mediante el enlazamiento que conduce a la eliminación efectiva, inmovilización, o inactividad de la quimioquina. El término "inhibición de la quimiotaxis" se refiere a una disminución en la cantidad relativa de la actividad quimiotáctica de las células en presencia del anticuerpo o fragmento del enlazante a antígeno del mismo en comparación con la actividad quimiotáctica observada en ausencia del anticuerpo o fragmento enlazante a antígeno del mismo. Métodos bien conocidos para medir la inhibición quimiotáctica de determinados tipos de células, incluyendo diferentes tipos de células de leucocitos, están disponibles y se divulgan en Chemokine Protocols, Meth. in Mol. Biol. 138 (2000), Humana Press, Eds. AEI Proudfoot, TNC Wells, and CA Power.
- 20 Un producto o componente "aislado" o "purificado" está sustancialmente libre de material celular u otras proteínas contaminantes de la fuente de célula o tejido del que se deriva el producto o componente, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. Un componente aislado o purificado, molécula u otra sustancia (incluyendo un péptido, polipéptido, anticuerpo, quimioquinas, ácido polinucleico, o célula) es uno que ha sido retirado de, o sintetizado por separado de, su entorno ordinario o natural o nativo. Un producto o componente aislado o purificado también puede ser física o químicamente eliminado o separado de la mezcla o ingredientes con los cuales está asociado, incluyendo contaminantes biológicos no deseados, o, si es sintetizado, por sustratos o subproductos asociados con su síntesis. La purificación se puede extender a cualquier grado incluyendo la eliminación de 1, 5, 10, 50, 75, 90, 95 o 100% de los otros componentes.

En el caso de un anticuerpo, el aislamiento puede constituir la eliminación de la sangre o suero, o para un anticuerpo monoclonal, del fluido ascítico o de cultivo de tejidos.

Los términos "ácidos nucleicos" y "secuencias de nucleótidos" incluyen moléculas de ADN (por ejemplo, ADNc o ADN genómico), moléculas de ARN (por ejemplo, ARNm), combinaciones de moléculas de ADN y ARN o moléculas híbridas ADN/RN, y análogos de moléculas de ADN o ARN. Las secuencias de ácidos nucleicos de la invención pueden codificar porciones de un análogo o variante de anticuerpo de antiquina. Tales análogos se pueden generar usando, por ejemplo, análogos de nucleótidos, que incluyen, pero no se limitan a, inosina o bases tritiladas. Dichos análogos también pueden comprender moléculas de ADN o ARN que comprenden esqueletos modificadas que prestan atributos beneficiosos para las moléculas tales como, por ejemplo, resistencia a las nucleasas o una mayor capacidad para atravesar las membranas celulares. Los ácidos nucleicos o secuencias de nucleótidos pueden ser de cadena sencilla, de doble cadena, pueden contener tanto porciones de cadena sencilla como de doble cadena, y pueden contener porciones de triple cadena, pero preferiblemente es ADN de doble cadena. Una molécula de ácido nucleico "aislada" es una que está separada de otras moléculas de ácido nucleico que están presentes en la fuente natural de la molécula de ácido nucleico. Una molécula de ácido nucleico "aislada", tal como una molécula de ADNc, puede estar sustancialmente libre de otro material celular, o medio de cultivo cuando se produce por técnicas recombinantes, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. En una realización, las moléculas de ácido nucleico que codifican anticuerpos de la invención o fragmentos de los mismos están aisladas o purificadas.

El término "célula anfitriona" tal como se usa aquí, se refiere a la célula sujeto particular transfectada con una molécula de ácido nucleico y la progenie o progenie potencial de tal célula. La progenie de dicha célula puede no ser idéntica a la célula original transfectada con la molécula de ácido nucleico debido a mutaciones o influencias ambientales que pueden ocurrir en generaciones sucesivas o integración de la molécula de ácido nucleico en el genoma de la célula anfitriona. Una célula anfitriona puede usarse para expresar recombinantemente un anticuerpo de antiquina o uno de sus componentes, por ejemplo, una cadena ligera o pesada o fragmento de la misma.

Para determinar el "porcentaje de identidad" de dos secuencias de ácidos nucleicos o de aminoácidos, primero se alinean las secuencias para propósitos de comparación óptima (por ejemplo, pueden introducirse brechas en la secuencia de una primera secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico para la alineación óptima con una segunda secuencia de aminoácidos o ácido nucleico). Se comparan entonces los residuos de aminoácidos o nucleótidos en las posiciones de aminoácidos o posiciones de nucleótidos correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (esto es, % de identidad = número de posiciones idénticas superpuestas/número total de posiciones multiplicado por 100%). En una realización, las dos secuencias tienen la misma longitud. La determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias también se puede lograr utilizando un algoritmo matemático. Un ejemplo preferido no limitativo de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 87: 2264-2268 (1990), modificado como en Karlin y Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 5873-5877 (1993). Tal algoritmo se incorpora en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403 (1990). Las búsquedas de nucleótidos BLAST se pueden realizar con los parámetros establecidos del programa de nucleótidos NBLAST, por ejemplo, para marcación = 100, longitud de palabra = 12 para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a una molécula de ácido nucleico de la presente invención. Las búsquedas de proteínas BLAST se pueden realizar con los parámetros establecidos del programa XBLAST, por ejemplo, para marcación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a una molécula de proteína de la presente invención. Para obtener alineaciones con brechas para propósitos de comparación, puede utilizarse Gapped BLAST como se describe en Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402 (1997). Alternativamente, puede utilizarse PSI-BLAST para realizar una búsqueda iterada que detecta relaciones distantes entre moléculas (Id.). Cuando se utilizan los programas BLAST, Gapped BLAST, y PSI-BLAST, se pueden utilizar los parámetros por defecto de los respectivos programas (por ejemplo, de XBLAST y NBLAST). Otro ejemplo no limitante preferido de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo de Myers y Miller, CABIOS 4: 11-17 (1988). Tal algoritmo está incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0) que es parte del paquete de software de alineación de secuencias GCG. Cuando se utiliza el programa ALIGN para comparar secuencias de aminoácidos, se puede utilizar una tabla de residuos de peso PAM 120, una penalidad de longitud de brecha de 12, y una penalidad de brecha de 4. El porcentaje de identidad entre dos secuencias puede ser determinado usando técnicas similares a las descritas anteriormente, permitiendo o sin permitir brechas. Al calcular el porcentaje de identidad, típicamente se cuentan solamente coincidencias exactas.

Un "cambio conservador" se refiere a las alteraciones que son conformacionalmente de forma sustancia o antigénicamente neutrales; que producen mínimos en la estructura terciaria de una variante de péptido o polipéptido, o que producen cambios mínimos en los determinantes antigénicos de las variantes o análogos de péptidos o polipéptidos, en comparación con el péptido o polipéptido original o nativo. En el contexto de quimioquinas, cambios conservadores incluyen sustituciones de aminoácidos que no afectan sustancialmente a la especificidad y/o afinidad de la variante o análoga de quimioquina resultante, por ejemplo, tal como se determina por su capacidad para exhibir al menos una función de la quimioquina original incluyendo funciones tales como la inducción de la

quimiotaxis, la participación en redes de citoquinas o de otra manera la inducción de la producción de enzima o citoquinas, o el enlazamiento al receptor para la quimioquina original o nativa. Tal como se aplica a las variantes o análogos de los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, incluyendo los segmentos de CDR, un cambio conservador se refiere a una sustitución de aminoácido que produce un producto anticuerpo que es capaz de enlazar al mismo epítipo o antígeno tal como el producto anticuerpo no modificado correspondiente. La predicción de cuales sustituciones de aminoácidos mantienen la neutralidad conformacional y antigénica de una molécula está dentro de la experiencia de la técnica como se describe por Berzofsky, Science 229: 932-940 (1985) y Bowie, et al, Science 247:1306-1310 (1990). La orientación en cuanto a cuales sustituciones mantendrán más probablemente la neutralidad conformacional y antigénica incluye (a) es menos probable que la sustitución de aminoácidos hidrófobos afecte la antigenicidad puesto que es más probable que los residuos hidrófobos se encuentren en el interior de una proteína, (b) es menos probable que sustitución de aminoácidos fisicoquímicamente afecte la conformación debido a que el aminoácido sustituido estructuralmente imita el aminoácido nativo; y (c) es probable que la alteración de las secuencias conservadas evolutivamente afecte de forma adversa la conformación puesto que tal conservación sugiere que las secuencias de aminoácidos pueden tener importancia funcional.

Una "composición" o "composición farmacéutica o terapéutica" se refiere a una combinación de vehículo, excipiente, o solución que contiene un anticuerpo de anti-quimioquina o sus fragmentos de enlazamiento a quimioquinas CC, o sus otros fragmentos, que directa o indirectamente reducen la severidad de o tratan una condición, trastorno o enfermedad mediados por una quimioquina CC, o al menos un síntoma de los mismos. El término "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los vehículos y excipientes tales como diluyentes, solventes, agentes dispersantes, emulsiones, bicapas lipídicas, liposomas, recubrimientos, conservantes incluyendo agentes antibacterianos o antifúngicos, agentes isotónicos, reguladores de pH, y agentes moduladores de la absorción, y similares, compatible con las moléculas de la presente invención y adecuados para la administración farmacéutica. El uso de vehículos tales, desintegrantes, excipientes y agentes para la administración de sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica, véase el Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3ª edición, Am. Pharm. Assoc. (2000). Las composiciones farmacéuticas de la invención se formulan generalmente para la compatibilidad con una ruta de administración pretendida, tal como para la administración parenteral, oral o tópica.

Las composiciones terapéuticas de la invención incluyen al menos un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" será de al menos un componente convencionalmente mezclado con, y utilizado para, la administración de un ingrediente activo, producto biológico, o fármaco. Un vehículo puede contener cualquier excipiente farmacéutico utilizado en la técnica y cualquier forma de vehículo para la administración. Las composiciones pueden ser, por ejemplo, soluciones inyectables, suspensiones o soluciones acuosas, suspensiones o soluciones no acuosas, aerosoles, formulaciones, formulaciones orales sólidas o líquidas, bálsamos, geles, ungüentos, parches intradérmicos, cremas, lociones, tabletas, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida, y similares. Excipientes adicionales pueden incluir, por ejemplo, colorantes, agentes de enmascaramiento del sabor, ayudas de solubilidad, agentes de suspensión, agentes de compresión, recubrimientos entéricos, ayudas de liberación sostenida, y similares. Una forma de dosificación adecuada puede ser seleccionada por un experto en la técnica a partir de formas, tales como las descritas por la FDA CDER Data Standards Manual C-DRG-00201 de los Estados Unidos; o aquellas listadas en el sitio web de la FDA <http://www.fda.gov/ForIndustry/DataStandards/StructuredProductLabeling/ucm162038.htm> (último acceso 9 de agosto de 2010).

Las composiciones administradas oralmente pueden incluir un vehículo sólido o excipiente o se pueden formular como preparaciones líquidas o en gel y pueden incluir un vehículo comestible o inerte y pueden estar encerrados en cápsulas, comprimidas en tabletas, o formuladas como una pastilla. Las composiciones administradas oralmente pueden ser preparadas en una forma que se libera con el tiempo o encapsulada para evitar la degradación en el estómago y optimizar la absorción de una molécula.

Las composiciones inyectables se pueden formular por métodos bien conocidos en la técnica y pueden abarcar soluciones o dispersiones estériles de moléculas terapéuticas. Tal incluirá generalmente un diluyente estéril, tal como agua, solución salina normal, u otro regulador compatible con las moléculas de la invención. Las composiciones inyectables pueden ser preparadas en dosificaciones unitarias o en contenedores de dosis unitarias, tales como viales, ampollas, o jeringas.

Se pueden utilizar reguladores convencionales y agentes isotónicos y se puede ajustar el pH usando agentes bien conocidos, tales como HCl o NaOH o reguladores. Pueden estar presentes agentes antimicrobianos o bacteriostáticos, agentes quelantes, tales como EDTA o EGTA, y antioxidantes y conservantes.

Las composiciones terapéuticas de la invención pueden ser administradas por cualquier ruta de administración aceptable incluyendo por vía tópica, a una membrana mucosa, por vía oral o entérica o parenteral. Estas rutas incluyen, pero no limitan a tópica, transmucosa, por vía oral (incluyendo bucal, sublingual), por vía mucosa (conjuntiva, nasal, sinusal, uretral, vaginal, intestinal, rectal), entérica, transdérmica, intradérmica, subcutánea (s.c.), intramuscular, intraperitoneal, intravenosa (i.v.), intracardiaca, en una articulación o hueso, en un órgano (cerebro, médula espinal, ojo, oído, hígado, bazo, riñón, vesícula biliar, vejiga), en el hueso, cartílago o tejido de la

articulación, por inhalación (por ejemplo, intranasal, intratraqueal, intrapulmonar, o intrabroncial), oral, sub bucal. Las rutas pueden ser seleccionados por los expertos en la técnica a partir de las listadas en el FDA, CDER, Data Standards Manual "Routes of Administration", CDRG-00301 de los Estados Unidos, Versión 004; o de la Tabla 2 disponible en <http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/DrugRegistrationandListing/ucm084039.htm> (último acceso 9 de Agosto de 2010).

5

Una "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a aquella cantidad del agente terapéutico suficiente para reducir la gravedad de o tratar una condición, trastorno o enfermedad mediada por quimioquinas CC, para potenciar la eficacia terapéutica de otra terapia de la condición, trastorno o enfermedad, o para prevenir la recurrencia o un incremento en la severidad de la condición, trastorno o enfermedad, o al menos uno de sus síntomas. Una cantidad terapéuticamente efectiva puede referirse a la cantidad de agente terapéutico suficiente para retardar o minimizar la aparición de la enfermedad. Una cantidad terapéuticamente efectiva también puede referirse a la cantidad del agente terapéutico que provee un beneficio terapéutico en el tratamiento o manejo de una enfermedad. Adicionalmente, una cantidad terapéuticamente efectiva con respecto a un agente terapéutico de la invención significa la cantidad de agente terapéutico solo, o en combinación con otras terapias, que provee un beneficio terapéutico en el tratamiento o manejo de una enfermedad, por ejemplo, suficiente para potenciar la eficacia terapéutica de un anticuerpo terapéutico suficiente para tratar o manejar una enfermedad. Usado en conexión con una cantidad de un anticuerpo de la invención, el término puede abarcar una cantidad que mejore la terapia global, reduzca o evite los efectos no deseados, o potencie aditivamente la eficacia terapéutica de, o la sinergia con, otro agente terapéutico.

10

15

20

El término "sujeto" o "paciente", como se usa aquí, se refiere a un vertebrado que expresa quimioquinas CC, incluyendo aviar y mamíferos (por ejemplo, bovinos, equinos, cerdos, cabras, ovejas, caninos, o felinos) y preferiblemente un humano. Un sujeto o paciente puede ser uno en necesidad de tratamiento con una cantidad efectiva de un anticuerpo de anti-quina que modula la actividad de quimioquinas CC de las quimioquinas CC que reconoce.

25

Una "condición inflamatoria, trastorno o enfermedad" se refiere a un fenómeno fisiológico evidente o cuantificables, incluyendo, pero no limitado a edema, fiebre, quimiotaxis o migración de leucocitos, la proliferación de los vasos sanguíneos, la proliferación de tejido conectivo, enrojecimiento, calor localizado, exudación, y otros signos como los descritos en Robbins, The Pathological Basis of Disease, 6th edition, Cotran, et al. (eds.), W.B. Saunders, Co. (1999), especialmente Capítulos 3, 7 y 15. En el contexto de anticuerpos de anti-quina a quimioquinas CC, este término se referiría a fenómenos asociados con, o directa o indirectamente mediados por, una CC-quimioquinas, tales como MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES, MCP-1, u otras quimioquinas.

30

Una "resina de inmovilización" se refiere a un sustrato sólido al que está enlazado al menos un ligando o receptor inmunológico. Por ejemplo, un anticuerpo de anti-quina puede estar enlazado a una resina a través de una región distinta de su sitio de combinación de antígeno, permitiendo de ese modo que el anticuerpo enlace determinantes antigénicos en las quimioquinas CC. De la misma forma, una quimioquina CC puede estar enlazada operativamente a una resina que le permite enlazar a un anticuerpo de anti-quina. Muchas resinas útiles para la inmovilización de ligandos o receptores inmunológicos son conocidas en la técnica y se usan rutinariamente para formar resinas de inmovilización. Tales resinas son útiles en el análisis de los componentes enlazados por un ligando o receptor particular, en ensayos inmunológicos o en procedimientos de purificación. Cualquier resina puede ser utilizada para formar las resinas de inmovilización de la invención.

35

40

Los inventores persiguieron medios para resolver los problemas de la técnica anterior asociados con la administración de anticuerpos múltiples a quimioquinas CC. Sorprendentemente, descubrieron anticuerpos que pueden enlazarse a más de un tipo de quimioquinas CC: anticuerpos de anti-quina. Estos anticuerpos de anti-quina proveen mejoras sobre la inhibición de una quimioquina individual o un receptor de quimioquinas individual en un entorno de enfermedad inflamatoria ya que sólo se necesita un anticuerpo individual para bloquear las funciones de quimioquinas múltiples. Los anticuerpos de anti-quina de la invención también evitan las desventajas de la administración de dos o más anticuerpos que tienen diferentes propiedades farmacocinéticas, tales como el uso de inconvenientes regímenes de dosificación separados para cada anticuerpo. Las anti-quinas evitan las desventajas de los anticuerpos biespecíficos los cuales son menos efectivos en el enlazamiento a un antígeno específico de quimioquinas y forman complejos que enlazan más fácilmente a los receptores Fc y así son tomados por la célula y degradados en lisosomas.

45

50

Como se demuestra aquí, los inventores proveen varios anticuerpos de anti-quina que pueden simplificar el tratamiento de las condiciones humanas inflamatorias e inmunológicas, trastornos y enfermedades mediadas por quimioquinas múltiples. Estos anticuerpos de anti-quina servirán como prototipos estructurales y funcionales para la producción de incluso anticuerpos de anti-quina más efectivos y seguros por procesos tales como la maduración de la afinidad y la humanización de anticuerpos.

55

Los anticuerpos de anti-quina se enlazan a e inhiben las actividades de dos o más quimioquinas CC. Al dirigir las quimioquinas CC, incluyendo MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES y MCP-1, los inventores identificaron anticuerpos útiles para

la modulación de quimioquinas que activan los mismos o diferentes receptores de quimioquinas (incluyendo CCR1, CCR2, CCR3, y CCR5). Por ejemplo, ya que cada una de MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  y RANTES se enlazan al receptor de quimioquinas CCR5, un anticuerpo de antiquina que reconoce estas tres quimioquinas CC puede modular más comprensivamente la actividad de CCR5 que una a una quimioquina CC individual. La activación de CCR5 apunta a células dendríticas inmaduras mieloides, monocitos, Th 1, T<sub>reg</sub>, NK y células dendríticas plasmacitoides. Del mismo modo, cada una de MIP-1 $\alpha$ , RANTES, MPIF-1 y HCC-1 se enlazan a CCR1, cuya activación apunta a monocitos, células T y células NK de memoria. Un anticuerpo de antiquina que enlaza a dos o más de estas quimioquinas enlazantes de CCR1 modula más ampliamente la activación del receptor. Un anticuerpo que puede enlazar e inhibir tanto MIP-1 $\alpha$  como RANTES entonces bloquearía de manera efectiva dos de los ligandos primarios tanto de CCR como de CCR5. Así, los inventores han identificado anticuerpos de antiquina que inhiben los ligandos primarios para diferentes receptores de quimioquinas expresadas en los leucocitos incluyendo monocitos y células T implicadas en enfermedades inflamatorias. Los inhibidores de cualquiera de estas combinaciones de quimioquinas provee mejoras sobre la inhibición de una quimioquina individual (o anticuerpos que bloquean el enlazamiento a un receptor de quimioquinas individual) en un entorno de enfermedad inflamatoria ya que solamente se necesita un anticuerpo individual para bloquear las funciones de quimioquinas múltiples en un receptor individual o actividad de quimioquinas en receptores múltiples.

El enlazamiento de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo enlazante a antígeno a una quimioquina se produce por el contacto entre los residuos de aminoácidos en los sitios de enlazamiento a antígeno (ABS) del anticuerpo y los determinantes antigénicos o epítomos de la quimioquina. Es bien conocido que los epítomos pueden ser secuencias de péptidos lineales o epítomos de conformación que comprenden múltiples determinantes antigénicos, incluso aminoácidos individuales o grupos laterales de los aminoácidos que no forman parte de una secuencia de aminoácidos contigua linealmente. Por ejemplo, los residuos que yacen sobre una cara de una  $\alpha$ -hélice pueden ser contactados por los ABS de un anticuerpo, mientras que en no lo son la cara opuesta.

Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo enlazantes a antígeno de la invención pueden enlazarse a la mitad del terminal N o terminal C de una quimioquina CC madura que no contiene un péptido de señalización. Por ejemplo, la forma madura de RANTES humana carece de los residuos del péptido de señalización 1-23. Así, su porción de terminal N estaría en el rango de entre 1-35 residuos y su terminal C estaría en el rango de 36-68 (SEQ ID NO: 73).

Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos enlazantes a antígeno de la invención pueden bloquear el enlazamiento de quimioquinas CC mediante el enlazamiento a los residuos de quimioquinas CC asociadas con el enlazamiento de la quimioquina a su receptor. Véase NCBI Conserved Domain Database CDD 29111 [uid] para dominios funcionales propuestos de quimioquinas CC; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez> (último acceso Agosto 9 de 2010). A continuación se indican para cada una de los quimioquinas CC, residuos del sitio enlazante en prospectiva:

CCL3/MIP-1 $\alpha$  residuos 11-15 (CCFSY), residuos 17-24 (SRQIPQNF), residuos 34-35 (QC), o residuos 57-67 (EWVQKYVSDLE) de SEQ ID NO: 71;

CCL4/MIP-1 $\beta$  residuos 11-15 (CCFSY), residuos 17-24 (ARKLPHNF), residuos 34-35 (LC), o residuos 57-67 (SWVQEYVYDLE) de SEQ ID NO: 72;

CCL5/RANTES residuos 10-14 (CCFAY), residuos 16-23 (ARPLPRAH), residuos 33-34 (KC), o residuos 56-66 (KWVREYINSLE) de SEQ ID NO: 73.

CCL14/HCC-1 residuos 8-12 (CCFTY), residuos 14-21 (TYKIPRQR), residuos 31-32 (QC), o residuos 54-64 (KWVQDYIKDMK) de SEQ ID NO: 78.

CCL15/HCC-2 residuos 8-12 (CCTSY), residuos 14-21 (SQSIPCSL), residuos 31-32 (EC), o residuos 54-64 (PGVQDCMKKLLK) de SEQ ID NO: 79.

CCL23/MPIF-1 residuos 9-13 (CCISY), residuos 15-22 (PRSHIPCSL), residuos 32-33 (EC), o residuos 55-65 (KQVQVCMRMLK) de SEQ ID NO: 81.

CCL18/PARC residuos 10-14 (CCLVY), residuos 16-23 (SWQIPQKF), residuos 33-34 (QC), o residuos 56-66 (KWVQKYISDLK) de SEQ ID NO: 82.

Tal anticuerpo o fragmento de enlazamiento a antígeno se pueden enlazar a segmentos de al menos dos de MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  y RANTES, así como otras quimioquinas CC relacionados, involucradas en el enlazamiento de dicha quimioquina a su receptor. Las Antiquinas, tales como 3C12F, pueden enlazarse a los mismos determinantes como proteínas virales enlazantes a quimioquinas, tales como vCCI, o pueden inhibir el enlazamiento de dichas proteínas virales para quimioquinas.

Los anticuerpos monoclonales 3C12F, 7D1G, 7D12A, 18V4F y 18P7E que enlazan las quimioquinas CC RANTES, MIP-1 $\alpha$  y/o MIP-1 $\beta$  han sido producidos y caracterizados por los inventores. Estos anticuerpos proveen la

información necesaria, incluyendo la información estructural de las regiones hipervariables y las CDR de cadena ligera y pesada, para el desarrollo de anticuerpos humanizados que pueden modular simultáneamente la actividad de múltiples quimioquinas CC y para el tratamiento de enfermedades inflamatorias mediadas por quimioquinas CC

5 Las secuencias hipervariables y de CDR de los tres anteriores MAb, son representados por SEQ ID NOS: 2-5 y 7-10 para 3C12F; SEQ ID NOS: 52-55 y 57-60 para 3C12F humanizado; SEQ ID NOS: 12-15 y 17-20 para 7D12A; SEQ ID NOS: 22-25 y 27-30 para 7D1G SEQ ID NOS: 32-35 y 37-40 para 18V4F, SEQ ID NOS: 62-65 y 67-70 para 18V4F humanizado; y SEQ ID NOS: 42-45 y 47-50 para 18P7E.

10 Se divulgan cinco tipos específicos de anticuerpos de antiquina caracterizados por los anticuerpos de antiquina específicos 3C12F, 7D1G, 7D12A, 18V4F y 18P7E. Además, son divulgadas las versiones humanizadas de 3C12F y 18V4F.

15 El primer tipo de anticuerpo se caracteriza por la especificidad de enlazamiento de anticuerpos monoclonales hecho por la línea celular de hibridoma 3C12F o un subcultivo del mismo. Un anticuerpo típico de este tipo de anticuerpo monoclonal (MAb) es 3C12F. Así, este tipo incluye MAb 3C12F, así como sus análogos y derivados, incluyendo aquellos anticuerpos producidos por el proceso de maduración de la afinidad o por humanización. Los anticuerpos del tipo 3C12F pueden contener una región variable de cadena pesada representada por la SEQ ID NO: 2 o 52 o una cadena pesada que contiene al menos uno de CDR1 (SEQ ID NO: 3 o 53), CDR2 (SEQ ID NO: 4 o 54) y CDR3 (SEQ ID NO: 5 o 55) de la cadena pesada de 3C12F. Tales anticuerpos pueden contener una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 7 o 57 o que contiene al menos uno de CDR1 de la SEC ID NO: 8 o 58, CDR2 como de la SEC ID NO: 9 o 59, y CDR3 como se establece por la SEQ ID NO: 10 o 60. SEQ ID NOS: 2-5 y 7-10 describen 3C12F no humanizado, mientras que SEQ ID NOS: 52-55 y 57-60 describen 3C12F humanizado. 3C12F humanizado contiene una región variable de cadena pesada representada por la SEQ ID NO: 52 o una cadena pesada que contiene al menos uno de CDR1 (SEQ ID NO: 53), CDR2 (SEQ ID NO: 54) y CDR3 (SEQ ID NO: 55) de la cadena pesada de 3C12F. Tales anticuerpos pueden contener una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 57 o que contiene al menos uno de CDR1 de la SEC ID NO: 58, CDR2 como de la SEQ ID NO: 59, y CDR3 como se establece por la SEQ ID NO: 60.

30 Un segundo tipo de anticuerpo se caracteriza por la especificidad de enlazamiento de anticuerpos monoclonales hechos por la línea celular de hibridoma 7D12A o un subcultivo del mismo. Un anticuerpo típico de este tipo de anticuerpo monoclonal (MAb) es 7D12A. Así, este tipo incluye MAb 7D12A, así como sus análogos y derivados, incluyendo aquellos anticuerpos producidos por el proceso de maduración de la afinidad o por humanización. Los anticuerpos de tipo anticuerpo 7D12A pueden contener una región variable de cadena pesada representada por SEQ ID NO: 12 o una cadena pesada que contiene al menos uno de CDR1 (SEQ ID NO: 13), CDR2 (SEQ ID NO: 14) y CDR3 (SEQ ID NO: 15) de la cadena pesada de 7D12A. También pueden contener una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 17 o que contiene al menos uno de CDR1 de la SEC ID NO: 18, CDR2 como de la SEQ ID NO: 19, y CDR3 como se establece por la SEQ ID NO: 20.

35 Un tercer tipo de anticuerpo se caracteriza por la especificidad de enlazamiento de anticuerpos monoclonales hechos por la línea celular de hibridoma 7D1G o un subcultivo del mismo. Un anticuerpo típico de este tipo de anticuerpo monoclonal (MAb) es 7D1G. Este tipo incluye MAb 7D1G y sus análogos y derivados, incluyendo los anticuerpos producidos por el proceso de maduración de la afinidad o por humanización. El tipo 7D1G de anticuerpo puede contener una región variable de cadena pesada representada por la SEQ ID NO: 22 o una cadena pesada que contiene al menos uno de CDR1 (SEQ ID NO: 23), CDR2 (SEQ ID NO: 24) y CDR3 (SEQ ID NO : 25) de la cadena pesada de 7D1G. También pueden contener una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 27 o que contiene al menos uno de CDR1 de la SEC ID NO: 28, CDR2 como de la SEQ ID NO: 29, y CDR3 como se establece por la SEQ ID NO: 30.

45 Un cuarto tipo de anticuerpo se caracteriza por la especificidad de enlazamiento de anticuerpos monoclonales hechos por la línea celular de hibridoma 18V4F o un subcultivo del mismo. Un anticuerpo típico de este tipo de anticuerpo monoclonal (MAb) es 18V4F. Este tipo incluye MAb 18V4F y sus análogos y derivados, incluyendo aquellos anticuerpos producidos por el proceso de maduración de la afinidad o por humanización. El tipo 18V4F de anticuerpo puede contener una región variable de cadena pesada representado por la SEQ ID NO: 32 o 62 o una cadena pesada que contiene al menos uno de CDR1 (SEQ ID NO: 33 o 63), CDR2 (SEQ ID NO: 34 o 64) y CDR3 (SEQ ID NO: 35 o 65) de la cadena pesada de 18V4F. También pueden contener una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 37 o 67 o que contiene al menos uno de CDR1 de la SEC ID NO: 38 o 68, como CDR2 de la SEC ID NO: 39 o 69, y CDR3 como se establece por SEQ ID NO: 40 o 70. SEQ ID NOS: 32-35 y 37-40 describen 18V4F no humanizado, mientras que SEQ ID NOS: 62-65 y 67-70 describen 18V4F humanizado. 18V4F humanizado contiene una región variable de cadena pesada representada por la SEQ ID NO: 62 o una cadena pesada que contiene al menos uno de CDR1 (SEQ ID NO: 63), CDR2 (SEQ ID NO: 64) y CDR3 (SEQ ID NO: 65) de la cadena pesada de 18V4F. Tales anticuerpos pueden contener una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 67 o que contiene al menos uno de CDR1 de la SEC ID NO: 68, CDR2 como de la SEQ ID NO: 69, y CDR3 como se establece por la SEQ ID NO: 70.

- Un quinto tipo de anticuerpo se caracteriza por la especificidad de enlazamiento de anticuerpos monoclonales hechos por la línea celular de hibridoma 18P7E o un subcultivo del mismo. Un anticuerpo típico de este tipo de anticuerpo monoclonal (MAb) es 18P7E. Este tipo incluye MAb 18P7E y sus análogos y derivados, incluyendo los anticuerpos producidos por el proceso de maduración de la afinidad o por humanización. El tipo 18P7E de anticuerpo puede contener una región variable de cadena pesada representada por la SEQ ID NO: 42 o una cadena pesada que contiene al menos uno de CDR1 (SEQ ID NO: 43), CDR2 (SEQ ID NO: 44) y CDR3 (SEQ ID NO : 45) de la cadena pesada 18P7E. También pueden contener una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 47 o que contiene al menos uno de CDR1 de la SEC ID NO: 48, CDR2 como de la SEQ ID NO: 49, y CDR3 como se establece por la SEQ ID NO: 50.
- Además de los tipos específicos de anticuerpos de antiquina descritos anteriormente, la divulgación abarca anticuerpos de antiquina que se enlazan a tres, cuatro, cinco o más quimioquinas CC, por ejemplo, anticuerpos de antiquina , tales como MAb 3C12F y los otros descritos anteriormente, que se enlazan a MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES y/u otras quimioquinas CC relacionados. Ventajosamente, los anticuerpos de antiquina se pueden producir para todas las quimioquinas CC que se enlazan a un CCR en particular, o pueden estar dirigidos a aquellas quimioquinas CC involucradas en una condición particular, trastorno o enfermedad.
- Un anticuerpo de antiquina tendrá una afinidad de enlazamiento suficiente para permitir que se enlacen a una quimioquina CC. Afinidades de enlazamiento de ejemplo incluyen 1,000, 900, 800, 400, 200, 150, 100, 75, 50, 40, 30, 20, 10, 5, 1, 0.1 nM o menos para que las quimioquinas CC se enlacen. Sin embargo, puede tener afinidad de enlazamiento diferente para diferentes quimioquinas CC como se muestra en las Figuras.
- La selección de un anticuerpo que tiene una afinidad de enlazamiento apropiada está dentro del conocimiento de aquellos en la técnica. Para muchos propósitos terapéuticos un anticuerpo con una alta afinidad es más deseable que uno con una baja afinidad, por ejemplo, se ha demostrado que anticuerpos de alta afinidad administrados pasivamente eliminan de manera más eficiente el antígeno *in vivo* que los anticuerpos de baja afinidad; los anticuerpos de mayor afinidad producen menores niveles de complejos inmunes circulantes y resultaron en menos deterioro de la función glomerular; Steward, *Antibodies: Their Structure and Function*, Taylor and Francis (1984), véase la Tabla 4.5, en la que se divulgan métodos para la determinación de afinidad de anticuerpos, así como las características y funciones de los anticuerpos de baja y alta afinidad. Por otro lado, teniendo en cuenta que el poder neutralizante de un anticuerpo depende no solamente de su afinidad, sino también su concentración, la valencia y la configuración molecular, así como en el sitio en el que se administra, para algunas aplicaciones puede ser deseable una mayor concentración de un anticuerpo de afinidad más baja.
- Los inmunógenos utilizados para producir anticuerpos de antiquina pueden incluir una preparación de quimioquinas CC aisladas, nativas, quimioquinas CC expresadas de forma recombinante o quimioquinas CC sintetizadas químicamente, y opcionalmente, un adyuvante. Diversos adyuvantes usados para incrementar la respuesta inmunológica incluyen, pero no se limitan a, adyuvantes de Freund (completo e incompleto), geles minerales (por ejemplo, hidróxido de aluminio), sustancias activas de superficie (por ejemplo, lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, dinitrofenol, etc.), adyuvantes humanos tales como el bacilo *Calmette-Guerin* y *Corynebacterium parvum*, o agentes inmunoestimuladores similares.
- Las secuencias de MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES, MCP-1 y proteínas y polinucleótidos que codifican tales proteínas son conocidas y pueden encontrarse, por ejemplo, en bases de datos de secuencias disponibles públicamente, tales como GenBank o por referencia a los números de acceso de la Tabla 4. A menos que se especifique lo contrario, las versiones pertinentes de estas secuencias serán aquellas introducidas en estas bases de datos inmediatamente antes de la fecha de presentación de esta solicitud. Además, las secuencias de diversas quimioquinas CC, incluyendo MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES y MCP-1, han sido publicadas, y pueden ser encontradas, por ejemplo, en Furutani, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 159:249-255 (1989)(MCP-1), Obaru, et al., *J. Biochem.* 99:885-894 (1986) (MIP-1 $\alpha$ ), Lipes, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:9704-9708 (1988) (MIP-1 $\beta$ ), Schall, et al., *J. Immunol.* 141:1018-1025 (1988)(RANTES). Es bien sabido que existen variantes alélicas para todas o algunas de estas quimioquinas. SEQ ID NOS: 71-74 representan las secuencias de humanos utilizados para inmunización y selección de anticuerpos de antiquina para MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES y MCP-1.
- Para la producción de anticuerpos policlonales, diversos animales anfitriones adecuados (por ejemplo, conejo, cabra, ratón u otro mamífero) se pueden inmunizar por inyección con la proteína nativa, o una variante sintética de la misma, o un derivado de una quimioquina CC o combinación de más de una quimioquina CC. Por ejemplo, se puede utilizar un cóctel de MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES y MCP-1 como un inmunógeno para inducir una respuesta inmune en contra de estas quimioquinas CC.
- Si se desea, las moléculas de anticuerpo policlonal dirigido contra las quimioquinas CC se pueden aislar del mamífero (por ejemplo, de la sangre) y son purificadas adicionalmente mediante técnicas bien conocidas, tales como cromatografía de proteína A, para obtener la fracción de inmunoglobulina y la purificación por inmunoespecificidad para seleccionar anticuerpos de antiquina que enlazan a dos o más quimioquinas CC.

Para muchas aplicaciones será preferible producir un anticuerpo de antiquina como un anticuerpo monoclonal. Puede ser utilizada cualquier técnica que provea la producción de moléculas de anticuerpos por cultivo de línea celular continua. Tales técnicas incluyen, pero no se limitan a, la técnica del hibridoma - véase Kohler & Milstein, Nature 256:495-497 (1975); la técnica del trioma; la técnica del hibridoma de células B humanas, véase Kozbor, et al., Immunol. Today 4:72 (1983) y la técnica de hibridoma EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos, véase Cole et al., In: Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96 (1985). Los anticuerpos monoclonales humanos se pueden utilizar en la práctica de la presente invención y pueden producirse usando hibridomas humanos como se describe por Cote, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 2026-2030 (1983) o transformando células B humanas con virus de Epstein Barr *in vitro*, véase Cole, et al. In: Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96 (1985).

Más allá de estas formas convencionales para producir anticuerpos monoclonales, los inventores han descubierto que, los métodos de inmunización secuencial sorprendentemente, en vista del problema del pecado original antigénico (el Efecto Hoskins), producen anticuerpos de antiquina que reconocen más de una quimioquina CC. Se encontró que la secuencia de inmunización influencia la especificidad de los anticuerpos resultantes. Se encontró que estos métodos generan anticuerpos que se enlazan a quimioquinas CC particulares y algunos que bloquean el enlazamiento de la proteína vCCI del virus de vacunas a quimioquinas CC (RANTES/CCL5).

La inmunización secuencial o un vertebrado, preferiblemente un ratón, con diferentes quimioquinas procede por, por ejemplo, inmunizando el animal con una primera quimioquina en un adyuvante apropiado, impulsando varias semanas más tarde con una segunda quimioquina, y finalmente impulsando una segunda vez con una tercera quimioquina. Sin embargo, los anticuerpos de antiquina pueden ser producidos por métodos que involucran múltiples inmunizaciones e impulsos, por ejemplo, usando 2, 3, 4 o más quimioquinas diferentes en combinaciones diferentes. Se pueden ejecutar tanto las inmunizaciones de quimioquina basadas en ADN como en proteína. La inmunización con ADN es bien conocida en la técnica y se describen en Antibodies: A Laboratory Manual (Eds. E. Harlow & D. Lane, 1988). Las secuencias de polinucleótidos de quimioquinas son bien conocidas en la técnica y también se divulgan en Yoshie, et al., Adv. Immunol. 78: 57-110 (2001). Las inmunizaciones pueden realizarse usando adyuvantes o conjugados de quimioquinas y proteínas portadoras tales como las descritas por Antibodies: A Laboratory Manual, Eds. E. Harlow y D. Lane (1988). Preferiblemente, se administran aproximadamente 500 µg/kg de peso corporal o aproximadamente 10 µg de una quimioquina por ratón y los adyuvantes preferidos son los adyuvantes de Freund completos para las inmunizaciones iniciales y los adyuvantes de Freund incompletos para impulsos posteriores. Las quimioquinas CC de ejemplo para uso como inmunógenos incluyen al menos dos de CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1α, CCL4/MIP-1β y CCL5/RANTES.

En una realización de la inmunización secuencial, un ratón es inmunizado primero con MIP-1α y subsecuentemente potenciado con RANTES y/o MCP-1, o cualquier otra secuencia de las quimioquinas CC RANTES, MIP-1α, MIP-1β y/o MCP-1. El suero de ratón se prueba para la reactividad con RANTES, MIP-1α, MIP-1β y MCP-1 por ELISA. Un bazo de un ratón con respuestas apropiadas del suero es utilizado entonces para continuar con la producción de hibridoma.

Los anticuerpos producidos por las líneas celulares de hibridoma pueden ser probados por su capacidad para reconocer las quimioquinas CC por ELISA y para bloquear la actividad tanto en ensayos de quimiotaxis *in vitro* o en ensayos de enlazamiento a vCCI/quimioquinas. Utilizando esta estrategia fueron identificados varios anticuerpos monoclonales únicos que enlazan e inhiben quimioquinas CC. Estos anticuerpos fueron designados "antiquinas". Los anticuerpos producidos de hibridoma también pueden ser probados en otros ensayos funcionales. Líneas celulares de hibridoma que producen los anticuerpos con reactividades de quimioquinas CC múltiple son entonces clonadas y expandidas para la producción y purificación de anticuerpos. Los ensayos de selección para determinar la especificidad de enlazamiento a anticuerpos son bien conocidos y practicados rutinariamente en la técnica. Para una discusión amplia de tales ensayos, véase Harlow, et al. (Eds.), Antibodies: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory; Cold Spring Harbor, N.Y., Chapter 6 (1988). Después de su identificación inicial, un anticuerpo de antiquina puede someterse a potenciar la afinidad, por ejemplo, mediante un proceso de maduración de la afinidad o por manipulación de su CDR o secuencias marco; o puede ser humanizado. Para su uso en terapia con humanos, preferiblemente, un anticuerpo de antiquina será totalmente humano o humanizado y reconocer dos, tres, cuatro o más quimioquinas CC.

En una realización, los métodos para la selección de anticuerpos que poseen la especificidad deseada incluyen, pero no se limitan a, ensayo de inmunosorbente enlazado a enzima (ELISA) y otras técnicas mediadas inmunológicamente conocidas en el arte. En una realización específica, la selección de anticuerpos que son específicos para un dominio particular de quimioquinas CC se facilita mediante la generación de hibridomas que enlazan al fragmento de quimioquinas CC que poseen tal dominio. También se proveen aquí anticuerpos que son específicos para uno o más dominios dentro de quimioquinas CC, por ejemplo, dominios conservados de proteínas de la familia quimioquinas CC, o derivados, fragmentos, análogos u homólogos de los mismos.

Los anticuerpos de antiquina y fragmentos de los mismos de la invención pueden ensayarse para el enlazamiento específico a las quimioquinas CC, particularmente MIP-1α, MIP-1β, RANTES, MCP-1 y/u otras quimioquinas, en inmunoensayos de enlazamiento competitivos y no competitivos. Procedimientos bien conocidos para

inmunoensayos son divulgados por la presente en Stites and Terr (Eds.) Basic and Clinical Immunology, 7th ed., (1991); Maggio (Ed.) Enzyme Immunoassay, CRC Press, Boca Raton, Fla. (1980); Tijan, Practice and Theory of Enzyme Immunoassays, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam (1985); Harlow and Lane (Eds.) Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, N.Y. (1988); Chan (Ed.), Immunoassay: A Practice Guide, Academic Press, Orlando, Fla. (1987); Price and Newman (Eds.) Principles and Practice of Immunoassays, Stockton Press, N.Y. (1991); y Ngo (Ed.) (1988) Nonisotopic Immunoassays, Plenum Press, N.Y. (1988).

5 Los inmunoensayos para medir el enlazamiento a anticuerpos pueden ser bien sea competitivos o no competitivos. En general, en el contexto de anticuerpo, un ensayo competitivo involucra competición para el enlazamiento de un ligando entre dos anticuerpos. Por ejemplo, un MCP-1 marcado se puede usar para evaluar si un anticuerpo puede competir con otro anticuerpo marcado para el enlazamiento del MCP-1. El ensayo se puede basar en tales ensayos estándar tales como, por ejemplo, el ensayo de inmunosorbente enlazado a enzima (ELISA) o radioinmunoensayo (RIA).

15 Alternativamente, los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de la invención pueden ser probados en ensayos no competitivos para enlazamiento a sustratos. Por ejemplo, un ELISA estándar puede usarse en el que el ligando (por ejemplo, MCP-1) se inmoviliza sobre una placa de ELISA. Un anticuerpo de prueba es incubado con el ligando y se deja en enlazamiento. La placa se lava y a partir de entonces, un anticuerpo secundario conjugado con enzima (por ejemplo, un anticuerpo Fc antihumano de ratón) se enlaza al anticuerpo de prueba si el anticuerpo de prueba se enlaza al ligando. Después del lavado, se adiciona un sustrato para la enzima y se deja reaccionar con la enzima. En general, un cambio de color indica la presencia de un anticuerpo que reacciona con el ligando. El ELISA se puede repetir para diferentes quimioquinas CC para determinar qué quimioquinas son reconocidas por el anticuerpo de prueba.

25 Frecuentemente los inmunoensayos utilizan componentes de ensayo marcados. La etiqueta puede estar en una variedad de formas y puede ser acoplada directamente o indirectamente al componente deseado del ensayo de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. Etiquetas comunes para los componentes del ensayo incluyen isótopos radiactivos, incluyendo  $^3\text{H}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{14}\text{C}$ , y  $^{32}\text{P}$ , fluoróforos, agentes quimioluminiscentes, y enzimas. La elección de una etiqueta en particular dependerá de la sensibilidad requerida, la facilidad de conjugación con el compuesto, los requisitos de estabilidad, y la instrumentación disponible, y será determinada fácilmente por una persona de experiencia normal en la técnica.

30 Los ensayos para evaluar si los anticuerpos de la invención inhiben la actividad de quimioquinas CC, particularmente MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES, MCP-1 y/u otras quimioquinas, pueden realizarse fácilmente utilizando ensayos conocidos para la quimiotaxis, incremento de calcio intracelular, y similares. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los ensayos de quimiotaxis de quimioquinas pueden realizarse en cámaras de plástico de 96 pozos. Los pozos son separados mediante un filtro en dos compartimentos. El filtro permite el paso de las células de un compartimento al siguiente en respuesta a gradientes químicos. Las células de ensayo son colocadas en un compartimento de la cámara en un medio de cultivo y por ejemplo, una quimioquina CC, se coloca en medio de cultivo en el otro compartimento. Las células que atraviesan el filtro son contadas. En otros pozos, la quimioquinas CC se mezcla con el anticuerpo de prueba para determinar si el anticuerpo es capaz de bloquear la migración celular.

40 Para manipulación adicional de anticuerpos de los monoclonales de antiquina identificados por los procedimientos de selección anteriores, las secuencias de ADN de los anticuerpos se determinaron tal como se reporta en el Ejemplo 7.

45 La afinidad de los anticuerpos de antiquina de la invención puede mejorarse adicionalmente usando métodos conocidos en la técnica, tales como los descritos por Raipal, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 102:8466-8471 (2005); Lippow, et al." Nat. Biotechnol. 25:1171-1176 (2007); Wu, et al., J. Mol. Biol. 368: 652-665 (2007); Yang, et al., J. Mol. Biol. 254: 392-403 (1995); y Huse, et al., J. Immunol. 149:3903-3913 (1992), que divulgan métodos para la maduración de la afinidad o potenciamiento de los anticuerpos. Los anticuerpos de antiquina de la invención puede tener afinidades de. menos de 200, 100 nM (por ejemplo, el anticuerpo murínico aislado originalmente 3C12F tiene una afinidad de 49 nM para MIP-1 $\alpha$ ) y puede ser potenciado para tener menos de 40, 30, 20, 10, 5, 1, 0,5 o 0,1 nM durante los procedimientos de maduración de afinidad. Los procedimientos útiles para la maduración de la afinidad de los anticuerpos monoclonales son bien conocidos en la técnica y se divulgan en Antibody Engineering (Humana Press, 2004) and Phage Display, T. Clackson and H. B. Lowman, editors (Oxford University Press, 2004). Tales procedimientos pueden comenzar con la forma de un anticuerpo quimérico, de tal anticuerpo de antiquina, que puede ser humanizado bien sea por separado o simultáneamente con la maduración de la afinidad. Las regiones variables del anticuerpo pueden expresarse como un fragmento Fab en la superficie del fago filamentoso. Se puede emplear una estrategia de mutagénesis para cambiar cada residuo dentro de los seis CDR para hacer una biblioteca combinatoria de fragmentos Fab expresados en fagos. Estos pueden ser seleccionados mediante enlazamiento a antígenos de quimioquinas y se analizaron para mejoras en afinidad. Subsecuentemente sustituciones de aminoácidos preferidas se pueden combinar para incluso mayores mejoras en la afinidad. Al mismo tiempo, la

mutaciones dentro de las regiones marco de los dominios variables se pueden analizar para encontrar secuencias con propiedades mejoradas.

5 Un anticuerpo "variante" o "análogo", tal como se describió anteriormente difiere en la secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos de anticuerpo original en virtud de la adición, la delección y/o sustitución de uno o más residuos de aminoácidos en la secuencia de anticuerpo original. En una realización, el variante comprende una o más sustituciones en una o más regiones hipervariables del anticuerpo original.

10 Un análogo de anticuerpo puede ser manipulado mediante la sustitución de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más residuos de aminoácidos en una CDR, hipervariable o región marco de una secuencia de cadena pesada o ligera de 3C12F, 7D1G, 7D12A, 18V4F, o 18P7E. Del mismo modo, los isotipos de tal anticuerpo pueden ser cambiados mediante técnicas de conmutación de isotipo conocidas en el arte o mediante procedimientos de ingeniería genética, tales como el injerto de CDR, la formación de anticuerpos quiméricos, o humanización.

15 Los análogos pueden ser producidos por un proceso de maduración de la afinidad de anticuerpos monoclonales de tipo 3C12F, 7D1G, 7D12A, 18V4F o 18P7E. Análogos generalmente seleccionados para una mayor afinidad de enlazamiento o un perfil más amplio de enlazamiento a quimioquinas que pueden ser adquiridos al mismo tiempo. Los análogos pueden ser fácilmente identificados determinando si se enlazan a las mismas quimioquinas a las que se enlazan los anticuerpos originales, por ejemplo, mediante ELISA u otros ensayos bien conocidos. Un análogo incluye aquellas variantes en las que las cadenas pesadas y ligeras comparten aproximadamente el 90, 95, 99 o 100% de identidad en secuencia con las correspondientes secuencias de cadena pesada y ligera de 3C12F, 7D1G, 7D12A, 18V4F, o 18P7E. Las variantes de afinidad madurada de los anticuerpos producidos por líneas celulares de hibridoma de 3C12F, 7D1G, 7D12A, 18V4F o 18P7E o subcultivos de los mismos pueden ser seleccionados para tener afinidades de enlazamiento de 1,000, 800, 400, 200, 100, 75, 50, 40, 30, 20, 10, 5, 1 o 0.1 nM o menos. Algunos análogos o variantes tendrán uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, diez, o hasta veinte modificaciones de secuencia de aminoácidos, tales como delecciones, inserciones o sustituciones, un análogo puede tener aproximadamente de 2 a 10 sustituciones de aminoácidos en una o más regiones hipervariables o CDR de los anticuerpos 3C12F, 7D1 G, 7D12A, 18V4F o 18P7E.

25

Un análogo puede constituir un anticuerpo, o fragmento de enlazamiento al antígeno del mismo, que enlaza dos o más de MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES, MCP-1, que comprende al menos una de las siguientes combinaciones de CDR: CDR1 y CDR2; CDR1 y CDR3; CDR2 y CDR3; y CDR1, CDR2, y CDR3, de las regiones variables de cadena pesada y/o ligera de 3C12F, 7D1G, 7D12A, 18V4F o 18P7E.

30 Anticuerpos quiméricos en los que un dominio animal variable de enlazamiento a antígeno se acopla a un dominio humano constante son bien conocidos en la técnica y los métodos para su preparación se divulgan en Cabilly et al., Patente de los Estados Unidos No. 4,816,567; Morrison, S. L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 81:6851-6855 (1984); Boulianne, G. L. et al., Nature 312:643-646 (1984); y Neuberger, M. S. et al., Nature 314:268-270 (1985). El isotipo del dominio humano constante puede seleccionarse para ajustar el anticuerpo quimérico para la participación en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) y la citotoxicidad dependiente del complemento (véase por ejemplo, Bruggemann, M. et al., J. Exp. Med. 166:1351-1361 (1987); Riechmann, L. et al., Nature 332:323-327 (1988); Love et al., Methods in Enzymology 178:515-527 (1989); Bindon, et al., J. Exp. Med. 168:127-142 (1988). Anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados pueden producirse por técnicas de ADN recombinante conocidas en el arte, por ejemplo usando métodos descritos en la Solicitud Internacional PCT No. PCT/US86/02269; Solicitud de Patente Europea No. 184,187; Solicitud de Patente Europea No. 171,496; Solicitud de Patente Europea No. 173,494; Publicación Internacional PCT No. WO 86/01533; Patente de Estados Unidos No. 4,816,567; Solicitud de Patente Europea No. 125,023; Better et al, Science 240.: 1041-1043 (1988).

35

40

45 Los anticuerpos de antiquina de la invención pueden ser humanizados mediante procedimientos conocidos, incluyendo los divulgados por Carter, Patente de los Estados Unidos No. 6,719,971, Almagro, et al., Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008); Pini, et al., Comb. Chem. High Throughput Screen. 5:503-510 (2002); y Wu, et al., J. Mol. Biol. 294:151-162 (1999) que son incorporados como referencia. La humanización produce una molécula de inmunoglobulina con la especificidad del anticuerpo del anticuerpo animal donante (murino), pero con inmunogenicidad reducida y mejores funciones efectoras en los humanos. Este proceso involucra la integración de secuencias conocidas de CDR de antiquina en las secuencias marco de la región variable de la cadena ligera y pesada de un anticuerpo humano. En general, los anticuerpos humanizados son producidos mediante la sustitución de las CDR de ratón en un marco de dominio variable humano que es más probable que resulte en la retención de la orientación espacial correcta de las CDR si el marco de dominio variable humano adopta la misma o similar conformación a la del marco variable de ratón a partir del cual se originaron los CDR. Esto se consigue mediante la obtención de los dominios variables humanos de anticuerpos humanos cuyas secuencias marco presentan un alto grado de identidad en secuencia con los dominios marco variables murínicos de los que proceden las CDR. Las regiones marco variables de cadena pesada y ligera pueden ser derivadas de las mismas o de diferentes secuencias de anticuerpo humano. Las secuencias de anticuerpos humanos pueden ser las secuencias de anticuerpos humanos de origen natural o pueden ser secuencias en consenso de varios anticuerpos humanos. Véase Kettleborough, et al., Protein Engineering 4:773-783 (1991); Kolbinger, et al., Protein Engineering 6:971-980 (1993) y Carter, et al., WO 92/22653.

50

55

60

Habiendo identificado las regiones determinantes de la complementariedad de la inmunoglobulina donante murínica y las inmunoglobulinas aceptoras humanas apropiadas, la siguiente etapa es determinar cuáles, si los hay, de estos componentes deben ser sustituidos para optimizar las propiedades del anticuerpo humanizado resultante. En general, la sustitución de residuos de aminoácidos humanos con murinos debe ser minimizada, puesto la introducción de residuos murinos incrementa el riesgo de que el anticuerpo provoque una respuesta anticuerpo anti-ratón humano (HAMA) en humanos.

Ciertos aminoácidos de los residuos de marco de la región variable humana son seleccionados para la sustitución basándose en su posible influencia sobre la conformación de CDR y/o el enlazamiento a antígeno. La yuxtaposición no natural de regiones CDR murínicas con la región marco variable humana puede dar como resultado restricciones conformacionales no naturales, que, a menos que se corrija por sustitución de determinados residuos de aminoácidos, conducen a la pérdida de afinidad del enlazamiento.

La selección de residuos de aminoácidos para la sustitución se determina, en parte, por modelado por ordenador. En general, los modelos moleculares se producen a partir de estructuras resueltas para cadenas de inmunoglobulina o dominios de los mismos. Las cadenas a ser modeladas son comparadas para la similitud de secuencia de aminoácidos con cadenas o dominios de estructuras tridimensionales resueltas, y las cadenas o dominios que muestran la mayor similitud de secuencia es/son seleccionados como puntos de partida para la construcción del modelo molecular. Cadenas o dominios que comparten al menos 50% de identidad en secuencia son seleccionados para el modelado, y preferiblemente aquellos que comparten al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o más de identidad en secuencia se seleccionan para el modelado. Las estructuras de partida resueltas se modifican para permitir diferencias entre los aminoácidos reales en las cadenas o dominios de inmunoglobulina que se están modelando, y los de la estructura de partida. Las estructuras modificadas son entonces ensambladas en una inmunoglobulina compuesta. Finalmente, el modelo se refina por minimización de energía y verificando que todos los átomos estén dentro de las distancias apropiadas entre sí y que las longitudes y ángulos de enlace estén dentro de límites químicamente aceptables.

La selección de residuos de aminoácidos para la sustitución también puede determinarse, en parte, por el examen de las características de los aminoácidos en localizaciones particulares, o la observación empírica de los efectos de la sustitución o mutagénesis de aminoácidos particulares. Por ejemplo, cuando un aminoácido difiere entre un residuo de marco de región variable murina y un residuo de marco de región variable humana seleccionado, el aminoácido del marco humano usualmente debería ser sustituido por el aminoácido de marco equivalente del anticuerpo de ratón cuando se espera razonablemente que el aminoácido: se enlace de forma no covalente al antígeno directamente, esté adyacente a una región CDR, interactúe de otro modo con una región CDR (por ejemplo, está dentro de aproximadamente 3-6 Å de una región CDR como se determina por modelado informático), o participa en la interfase VL-VH .

Los residuos que "de forma no covalente enlazan directamente al antígeno" incluyen aminoácidos en posiciones en regiones marco que tienen una buena probabilidad de interacción directamente con aminoácidos en el antígeno de acuerdo con fuerzas químicas establecidas, por ejemplo, mediante enlaces de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, interacciones hidrófobas , y similares.

Los residuos que están "adyacentes a una región CDR" incluyen residuos de aminoácidos en posiciones inmediatamente adyacentes a una o más de las CDR en la secuencia primaria de la cadena de inmunoglobulina humanizada, por ejemplo, en posiciones inmediatamente adyacentes a una CDR como se define por Kabat--Wu & Kabat, J. Exp. Med. 132:211-250 (1970)-- o una CDR como se define por Chothia--Chothia & Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987). Estos aminoácidos son particularmente propensos a interactuar con los aminoácidos en las CDR y, si se eligen a partir del aceptor, a distorsionar las CDR donantes y reducir la afinidad. Además, los aminoácidos adyacentes pueden interactuar directamente con el antígeno, Amit, et al., Science 233:747-753 (1986) y puede ser deseable la selección de estos aminoácidos del donante para mantener todos los contactos de antígeno que provean afinidad en el anticuerpo original.

Residuos que "de otra manera interactúan con una región CDR" incluyen aquellos que son determinados por análisis estructural secundario para estar en una orientación espacial suficiente para afectar a una región CDR. Residuos que "de otra manera interactúan con una región CDR" pueden ser identificados mediante el análisis de un modelo tridimensional de la inmunoglobulina donante (por ejemplo, un modelo generado por ordenador). Un modelo tridimensional, típicamente del anticuerpo donante original, muestra que ciertos aminoácidos fuera de las CDR están cerca a las CDR y tienen una buena probabilidad de interactuar con aminoácidos en las CDR mediante enlaces de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, interacciones hidrófobas, etc. En esas posiciones de aminoácidos, se puede seleccionar el aminoácido de inmunoglobulina donante en lugar del aminoácido de inmunoglobulina aceptora. De acuerdo con este criterio, los aminoácidos generalmente tendrán un átomo de cadena lateral dentro de aproximadamente 3 Å de algún átomo en las CDR y deben contener un átomo que podría interactuar con los átomos de CDR de acuerdo con fuerzas químicas establecidas, tales como las listadas anteriormente.

Los aminoácidos que son capaces de interactuar con aminoácidos en las CDR pueden identificarse en aún otra forma. El área de superficie accesible al solvente de cada aminoácido marco es calculado de dos maneras: (1) en el

- anticuerpo intacto, y (2) en una molécula hipotética que consiste en el anticuerpo con sus CDR eliminadas. Una diferencia significativa entre estos números de aproximadamente  $10 \text{ \AA}^2$  o más muestra que el acceso del aminoácido marco al solvente es al menos parcialmente bloqueado por las CDR, y por lo tanto que el aminoácido está haciendo contacto con las CDR. El área de superficie accesible al solvente de un aminoácido puede calcularse con base en un modelo tridimensional de un anticuerpo, usando algoritmos conocidos en la técnica; por ejemplo, Connolly, J. Appl. Cryst. 16:548 (1983) y Lee & Richards, J. Mol. Biol. 55:379 (1971). Los aminoácidos marco también pueden ocasionalmente interactuar indirectamente con las CDR, al afectar la conformación de otro aminoácido marco, los cuales, a su vez, contactan las CDR.
- Los residuos que "participan en la interfase VL-VH" o "residuos de embalaje" incluyen los residuos en la interfase entre VL y VH como es definido, por ejemplo, por Novotny and Haber, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU 82:4592-66 (1985) o Chothia & Lesk, *supra*. En general, los residuos de empaque inusuales deben ser retenidos en el anticuerpo humanizado si difieren de los de los marcos humanos.
- En general, uno o más de los aminoácidos que cumplen los criterios anteriores son sustituidos. En algunas realizaciones, todos o la mayoría de los aminoácidos que cumplen los criterios anteriores son sustituidos. Ocasionalmente, hay una cierta ambigüedad sobre si un aminoácido particular cumple con los criterios anteriores, y se producen inmunoglobulinas variantes alternativas, una de las cuales tiene esa sustitución particular, y la otra no. Inmunoglobulinas variantes alternativas producidas de este modo pueden probarse en cualquiera de los ensayos descritos aquí para la actividad deseada, y la inmunoglobulina preferida seleccionada.
- Usualmente, las regiones CDR en anticuerpos humanizados son sustancialmente idénticas, y más usualmente, idénticas a las correspondientes regiones CDR del anticuerpo donante. Aunque no suele ser deseable, a veces es posible hacer una o más sustituciones de aminoácidos conservativas de residuos de CDR sin afectar apreciablemente la afinidad de enlazamiento de la inmunoglobulina humanizada resultante. Por sustituciones conservativas se entiende combinaciones tales como gly, ala; val, ile, leu; asp, glu; asn, gln; ser, thr; lys, arg; y phe, tyr.
- Otros candidatos para la sustitución son aminoácidos aceptores de marco humano que son inusuales o "raros" para una inmunoglobulina humana en esa posición. Estos aminoácidos pueden sustituirse con aminoácidos de la posición equivalente del anticuerpo donante de ratón o de las posiciones equivalentes de inmunoglobulinas humanas más típicas. Por ejemplo, la sustitución puede ser deseable cuando el aminoácido en una región marco humana de la inmunoglobulina aceptora es raro para esa posición y el aminoácido correspondiente en la inmunoglobulina donante es común para esa posición en secuencias de inmunoglobulina humana; o cuando el aminoácido en la inmunoglobulina aceptora es raro para esa posición y el aminoácido correspondiente en la inmunoglobulina donante también es raro, con respecto a otras secuencias humanas. Estos criterios ayudan a asegurar que un aminoácido atípico en el marco humano no interrumpe la estructura del anticuerpo. Por otra parte, mediante la sustitución de un aminoácido aceptor humano inusual con un aminoácido del anticuerpo donante que resulta ser típico para anticuerpos humanos, el anticuerpo humanizado puede hacerse menos inmunogénico.
- El término "raro", tal como se usa aquí, indica un aminoácido que se presenta en esa posición en menos de aproximadamente 20%, pero usualmente menos de aproximadamente el 10% de las secuencias en una muestra representativa de secuencias, y el término "común", tal como se usa aquí, indica un aminoácido que se presenta en más de aproximadamente 25%, pero usualmente más de aproximadamente el 50% de las secuencias en una muestra representativa. Por ejemplo, todas las secuencias de la región variable de cadena ligera y pesada se agrupan respectivamente en "subgrupos" de secuencias que son especialmente homólogas entre sí y tienen los mismos aminoácidos en ciertas posiciones críticas (Wu & Kabat, *supra*). Al decidir si un aminoácido en una secuencia aceptora humana es "raro" o "común" entre secuencias humanas, frecuentemente será preferible considerar solamente aquellas secuencias humanas en el mismo subgrupo que la secuencia aceptora. Candidatos adicionales para la sustitución son aminoácidos aceptores de marco humanos que se identificarían como parte de una región CDR bajo la definición alternativa propuesta por Chothia & Lesk, *supra*.
- Otros candidatos para la sustitución son residuos de marco aceptores que corresponden a un residuo de marco donante raro o inusual. Residuos del marco de donantes raros o inusuales son aquellos que son raros o inusuales (tal como se define aquí) para anticuerpos murinos en esa posición. Para los anticuerpos murinos, el subgrupo puede determinarse de acuerdo con Kabat y las posiciones de residuos identificados que difieren del consenso. Estas diferencias específicas del donante pueden apuntar a mutaciones somáticas en la secuencia murina que potencia la actividad. Residuos inusuales que se predice que afectarán el enlazamiento son retenidos, mientras que los residuos que se predice que no tiene importancia para el enlazamiento, pueden ser sustituidos.
- Más candidatos para la sustitución son residuos de la línea no germinal que se presentan en una región marco aceptora. Por ejemplo, cuando una cadena de anticuerpo aceptor (esto es, una cadena de anticuerpo humano que comparte identidad en secuencia significativa con la cadena de anticuerpo donante) es alineada con una cadena de anticuerpo de la línea germinal (que comparte asimismo identidad en secuencia significativa con la cadena donante), los residuos no coincidentes entre el marco de cadena aceptora y el marco de cadena de la línea germinal de la cadena pueden ser sustituidos con residuos correspondientes de la secuencia de la línea germinal.

Diferente de las sustituciones de aminoácidos específicas discutidas anteriormente, las regiones marco de inmunoglobulinas humanizadas son usualmente idénticas sustancialmente, y más usualmente, idénticas con las regiones marco de los anticuerpos humanos de las que se derivaron. Por supuesto, muchos de los aminoácidos en la región marco hacen poca o ninguna contribución directa a la especificidad o afinidad de un anticuerpo. Así, muchas sustituciones conservadoras individuales de residuos de marco pueden tolerarse sin cambio apreciable de la especificidad o afinidad de la inmunoglobulina humanizada resultante. Así, en una realización, la región marco variable de la inmunoglobulina humanizada comparte al menos 85% de identidad en secuencia con una secuencia de región marco variable humana o consenso en tales secuencias. En otra realización, la región marco variable de los inmunoglobulina humanizada comparte al menos 90%, preferiblemente 95%, más preferiblemente 96%, 97%, 98% o 99% de identidad en secuencia con una secuencia de región marco variable humana o consenso en tales secuencias. En general, sin embargo, tales sustituciones son indeseables.

En algunas realizaciones, los anticuerpos humanizados exhiben preferiblemente una afinidad de enlazamiento específica para antígeno similar a o superior que la del anticuerpo de ratón del que se construyeron. Usualmente, el límite superior de la afinidad de enlazamiento de los anticuerpos humanizados está dentro de un factor de tres, cuatro o cinco del de la inmunoglobulina donante. Frecuentemente, el límite inferior de la afinidad de enlazamiento está también dentro de un factor de tres, cuatro o cinco del de la inmunoglobulina donante. Alternativamente, la afinidad de enlazamiento puede compararse a la de un anticuerpo humanizado que no tiene sustituciones (por ejemplo, un anticuerpo que tiene CDR donantes y las regiones marcoceptoras, pero no sustituciones de región marco). En tales casos, el enlazamiento del anticuerpo (con sustituciones) es preferiblemente al menos de dos a tres veces mayor, o tres a cuatro veces mayor, que la del anticuerpo no sustituido. Para hacer comparaciones, la actividad de los diversos anticuerpos se puede determinar, por ejemplo, mediante BIAcore® (esto es, resonancia de plasmón superficial usando reactivos no marcados) o ensayos de enlazamiento competitivo.

Un anticuerpo manipulado puede diseñarse basándose en las secuencias de los anticuerpos monoclonales divulgados aquí usando técnicas de maduración de la afinidad estándar, tales como los descritos por Wu, et al., J. Mol. Biol. 350: 126-144 (2005) con el fin de incrementar la afinidad del anticuerpo a las quimioquinas identificadas originalmente y/o ampliar la selectividad de quimioquinas a otras quimioquinas CC que también pueden estar involucradas en las enfermedades inflamatorias.

La clase o isotipo o subclase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4) pueden ser seleccionados, en particular para productos de anticuerpos quiméricos, humanizados o manipulados para dirigir o adaptar el anticuerpo a una función particular bien conocida por la clase o subclase seleccionada. Por ejemplo, el IgG2 humano se puede seleccionar para minimizar el paso del producto de anticuerpo a través de la placenta o minimizar la interacción del receptor Fc con otros componentes del sistema inmune de un sujeto, y la subclase IgG4 para minimizar la capacidad del producto de anticuerpo para activar el complemento. El isotipo IgA se puede seleccionar para producir un anticuerpo secretor y un producto de anticuerpo de IgM pentamérico para potenciar el enlazamiento del anticuerpo en comparación con anticuerpos monoméricos. Las funciones de diversas clases y subclases de moléculas de anticuerpo se describen en Kuby, Immunology, WH Freeman (1997).

Fragmentos de anticuerpos "Fv" o "sFv" de cadena sencilla comprenden los dominios  $V_H$  y  $V_L$  de un anticuerpo de antiquina, en donde estos dominios están presentes en una cadena polipeptídica sencilla. Generalmente, el polipéptido Fv comprende adicionalmente un enlazante polipeptídico entre los dominios  $V_H$  y  $V_L$  que permite al sFv formar la estructura deseada para el enlazamiento al antígeno; véase Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994). Anticuerpos específicos de cadena sencilla para las quimioquinas CC se pueden producir por métodos conocidos tales como los descritos en la Patente de los Estados Unidos No. 4,946,778.

"Diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de enlazamiento a antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada ( $V_H$ ) conectado a un dominio variable de cadena ligera ( $V_L$ ) en la misma cadena polipeptídica ( $V_H$  y  $V_L$ ). Mediante el uso de un enlazante que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios son forzados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de enlazamiento a antígeno. Los anticuerpos de antiquina de la invención se pueden formular como diacuerpos que se pueden hacer mediante procedimientos divulgados en EP 404,097; WO 93/11161; y Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU 90:6444-6448 (1993).

"Anticuerpos lineales" se refiere a los anticuerpos descritos en Zapata et al. Protein Eng. 8(10): 1057-1062 (1995). Brevemente, estos anticuerpos comprenden un par de segmentos Fd en tándem ( $V_H$ - $C_H$  1- $V_H$  -  $C_H$ 1) que forman un par de regiones de enlazamiento a antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o monoespecíficos. Los anticuerpos de antiquina de la invención pueden ser producidos de acuerdo con los procedimientos descritos por Zapata, et al.

Las bibliotecas de expresión de Fab se pueden construir por otros métodos convencionales, tales como aquellos divulgados por y divulgados en Huse et al., Science 246:1275-1281 (1989) para permitir la identificación rápida y

efectiva de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada para las quimioquinas CC o derivados, fragmentos, análogas u homólogas de las mismas.

Porciones únicas de los anticuerpos ejemplificados a continuación, tales como sus secuencias de CDR y las secuencias que contienen una porción de una CDR, pueden usarse para producir anticuerpos anti-idiotipo. Estos anticuerpos reconocen uno o más idiotipos en un segmento variable de un anticuerpo de antiquina y se pueden utilizar para identificar o purificar un anticuerpo de antiquina o modular su actividad. Tales anticuerpos anti-idiotipo pueden ser producidos por procedimientos conocidos en la técnica, tales como por conjugación de una secuencia de péptido variable de un anticuerpo a un portador inmunogénico y la inmunización repetida. Tales métodos se divulgan también en Cavanaugh, et al., Pharm. Res. 21:1480-1488 (2004).

5 Un anticuerpo anti-idiotípico es un anticuerpo que reconoce determinantes de otro anticuerpo (un anticuerpo objetivo). En general, el anticuerpo anti-idiotípico reconoce determinantes del sitio de enlace al antígeno del anticuerpo objetivo. Típicamente, el anticuerpo objetivo es un anticuerpo monoclonal. Un anticuerpo anti-idiotípico se prepara generalmente inmunizando un animal (particularmente, ratones) de la misma especie y tipo genético tal como la fuente del anticuerpo monoclonal objetivo, con el anticuerpo monoclonal objetivo. El animal inmunizado  
10 monta una respuesta inmune a los determinantes idiotípicos del anticuerpo monoclonal objetivo y produce anticuerpos contra los determinantes idiotípicos del anticuerpo monoclonal objetivo. Células productoras de anticuerpos, tales como las células esplénicas, del animal inmunizado pueden ser usadas para generar anticuerpos monoclonales anti-idiotípicos. Adicionalmente, un anticuerpo anti-idiotípico también puede ser utilizado para  
15 inmunizar animales para producir anticuerpos anti-anti-idiotípicos. Estos animales inmunizados se pueden utilizar para generar anticuerpos monoclonales anti-anti-idiotípicos utilizando técnicas estándar. Los anticuerpos anti-anti-idiotípicos se pueden enlazar al mismo epítipo como el original, anticuerpo monoclonal objetivo utilizado para preparar el anticuerpo anti-idiotípico. Los anticuerpos anti-anti-idiotípicos representan otros anticuerpos monoclonales con la misma especificidad de antígeno que el anticuerpo monoclonal objetivo original.

Si el enlace del anticuerpo anti-idiotípico con el anticuerpo objetivo es inhibido por el antígeno relevante del anticuerpo objetivo, y si el anticuerpo anti-idiotípico induce una respuesta de anticuerpos con la misma especificidad que el anticuerpo objetivo, imita el antígeno del anticuerpo objetivo. Tal anticuerpo anti-idiotípico es un "anti-idiotipo de imagen interna" y es capaz de inducir una respuesta de anticuerpos como si fuera el antígeno original, véase Bona and Kohler, Anti-idiotypic Antibodies and Internal Image in Monoclonal and Anti-idiotypic Antibodies: Probes for Receptor Structure and Function, Venter J. C., Frasser, C. M., Lindstrom, J. (Eds.), Alan R. Liss, N.Y., pp 141-149  
25 (1984). Se ha demostrado que las vacunas que incorporan anticuerpos anti-idiotipo de imagen interna inducen respuestas protectoras contra virus, bacterias y parásitos; Kennedy, et al. Science 232:220-223 (1986); McNamara, et al., Science 226:1325-1326 (1985). También se ha demostrado que los anticuerpos anti-idiotípicos de imagen interna inducen inmunidad a los antígenos relacionados con tumores; Raychauri, et al., J. Immunol. 137:1743-1749 (1986); Raychauri et al., J. Immunol. 139:3902-3910 (1987); Bhattacharya-Chatterjee et al., J. Immunol. 139:1354-1360 (1987); Bhattacharya-Chatterjee, et al., J. Immunol. 141:1398-1403 (1988).

Los anticuerpos anti-idiotípicos para quimioquinas CC se pueden preparar, por ejemplo, mediante la inmunización de un animal, tal como un ratón, con una cantidad inmunogénica de una composición que comprende quimioquinas CC o porciones inmunogénicas de las mismas, que contiene al menos un epítipo antigénico de quimioquinas CC. La composición también puede contener un adyuvante adecuado, y cualquier vehículo necesario para proveer  
40 inmunogenicidad. Los anticuerpos monoclonales que reconocen quimioquinas CC pueden prepararse a partir de las células del animal inmunizado como se describió anteriormente. Se selecciona entonces un anticuerpo monoclonal que reconoce un epítipo común de quimioquinas CC y se usa para preparar una composición que comprende una cantidad inmunogénica del anticuerpo monoclonal anti-quimioquinas CC. Típicamente, una dosis de 25 a 200 mg de quimioquina CC monoclonal purificado sería suficiente en un adyuvante adecuado. Los animales pueden ser  
45 inmunizados de 2-6 veces en 14 a 30 días de intervalo entre dosis. Típicamente, los animales son inmunizados mediante cualquier ruta adecuada de administración, tal como intraperitoneal, subcutánea, intravenosa o una combinación de éstas. La producción de anticuerpos anti-idiotípicos puede ser monitorizada durante el período de la inmunización con métodos de inmunoensayo estándar. Los animales con títulos adecuados de reactivos de anticuerpos con los anticuerpos monoclonales objetivo pueden ser reinmunizados con el anticuerpo monoclonal usado como inmunógeno tres días antes de la recolección de las células productoras de anticuerpos. Preferiblemente, se utilizan células de bazo, aunque se pueden seleccionar otras células productoras de anticuerpos. Se recolectan las células productoras de anticuerpos y se fusionan con células de mieloma para producir hibridomas, como se describió anteriormente, y se seleccionan las células productoras de anticuerpos anti-idiotípicos adecuados. Los anticuerpos anti-anti-idiotípicos se producen mediante otra ronda de inmunización y  
50 producción de hibridoma utilizando el anticuerpo monoclonal anti-idiotipo como el inmunógeno.

Como se describió anteriormente, los segmentos variables de anticuerpos de antiquina, tales como segmentos de CDR, o fragmentos peptídicos de segmentos variables, incluyendo fragmentos que tienen 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más residuos de aminoácidos contiguos, especialmente aquellos que tienen actividad enlazamiento para quimioquinas, pueden ser utilizados para un número de aplicaciones, además de tratamiento terapéutico de enfermedades autoinmunes, incluyendo como agentes farmacéuticos bases peptídicas, vacunas, producción de anticuerpos anti-idiotipo, o como inmunógenos. Otro aspecto de la presente invención está dirigido a métodos de  
60

inducir una respuesta inmune en un mamífero contra un polipéptido de la invención mediante la administración al mamífero de una cantidad de la preparación de polipéptido suficiente para inducir una respuesta inmune. La cantidad dependerá de la especie animal, el tamaño del animal, y similares pero puede ser determinada por los expertos en la técnica.

5 La invención también incluye anticuerpos o fragmentos de anticuerpos derivados de anticuerpos de antiquina quiméricos o humanizados por el proceso de maduración de afinidad. Se pueden identificar las sustituciones de aminoácidos dentro de las CDR que mejoran significativamente la afinidad del anticuerpo para quimioquinas CC y por lo tanto se incluyen aquí. Los métodos para la maduración de afinidad se describen por ejemplo en Wu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 95:6037-6042 (1998) y por Clackson and Loman, Phage Display, Oxford University Press (2004).

10 Los anticuerpos de antiquina anti-quimioquinas CC se pueden utilizar en métodos conocidos en la técnica relacionados con la localización y/o cuantificación de quimioquinas CC (por ejemplo, para uso en la medición de los niveles de quimioquinas CC dentro de las muestras fisiológicas apropiadas, para su uso en métodos de diagnóstico, para su uso en la formación de imágenes de la proteína, y similares). En una realización dada, los anticuerpos para quimioquinas CC, o derivados, fragmentos, análogos u homólogos de los mismos, que contienen el dominio enlazante derivado de anticuerpo, se utilizan como compuestos farmacológicamente activos, fármacos o compuestos terapéuticos.

15 Un anticuerpo de antiquina anti-quimioquinas CC (por ejemplo, anticuerpo monoclonal) se puede utilizar para aislar quimioquinas CC mediante técnicas estándar, tales como cromatografía de afinidad o inmunoprecipitación. Un anticuerpo anti-quimioquinas CC puede facilitar la purificación de quimioquinas CC naturales de las células y de quimioquinas CC producidas de forma recombinante expresado en células anfitrionas. Además, un pan-anticuerpo anti-quimioquinas CC se puede utilizar para detectar quimioquinas CC (por ejemplo, en un lisado celular o sobrenadante celular) con el fin de evaluar la abundancia y el patrón de expresión de las quimioquinas CC. Los anticuerpos de antiquina anti-quimioquinas CC se pueden utilizar como diagnóstico para monitorizar los niveles de proteína en tejido como parte de un procedimiento de prueba clínico con el fin de, por ejemplo, determinar la eficacia de un régimen de tratamiento dado. La detección puede facilitarse por acoplamiento (es decir, enlazando físicamente) el anticuerpo a una sustancia detectable. Ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes y materiales radiactivos. Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina,  $\beta$ -galactosidasa, o acetilcolinoesterasa; 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; ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina, y aequorina, y ejemplos de material radiactivo adecuado incluyen  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$ , y  $^3\text{H}$ .

20 Además, los anticuerpos de la presente invención pueden ser conjugados a toxinas tales como radioisótopos, toxinas de proteínas y toxinas químicas que se pueden conjugar a los anticuerpos. Tales toxinas incluyen, pero no se limitan a Plomo-212, Bismuto-212, Astato-211, Yodo-131, Escandio-47, Renio-186, Renio-188, Itrio-90, Yodo-123, Yodo-125, Bromo-77, Indio-111, Boro-10, Actínida, ricina, adriamicina, caliqueamicinas, 5-fluorouracilo, auristatinas, y maitansinoides.

25 Los anticuerpos quiméricos, humanizados, y humanos, así como fragmentos que enlazan a antígenos de los mismos se producen típicamente mediante expresión recombinante. Los ácidos nucleicos que codifican regiones variables de cadena ligera y pesada humanizada, opcionalmente enlazadas a regiones constantes, se insertan en vectores de expresión. Las cadenas ligera y pesada pueden clonarse en el mismo o diferentes vectores de expresión. Los segmentos de ADN que codifican cadenas de inmunoglobulina están enlazados operativamente a secuencias de control en los vectores de expresión que aseguran la expresión de polipéptidos de inmunoglobulina. Las secuencias de control de la expresión incluyen, pero no se limitan a, promotores (por ejemplo, asociadas naturalmente o promotores heterólogos), secuencias de señal, elementos potenciadores y secuencias de terminación de la transcripción. Preferiblemente, las secuencias de control de expresión son sistemas promotores eucariotas en vectores capaces de transformar o transfectar células anfitrionas eucariotas. Una vez que el vector se ha incorporado en el anfitrión apropiado, el anfitrión se mantiene bajo condiciones adecuadas para la expresión de alto nivel de las secuencias de nucleótidos, y la colección y purificación de los anticuerpos de reacción cruzada.

30 Estos vectores de expresión son típicamente replicables en los organismos anfitriones bien sea como episomas o como una parte integral del ADN cromosómico del anfitrión. Comúnmente, los vectores de expresión contienen marcadores de selección (por ejemplo, resistencia a ampicilina, resistencia a la higromicina, resistencia a la tetraciclina o resistencia a neomicina) para permitir la detección de aquellas células transformadas con las secuencias de ADN deseadas, véase, por ejemplo, Itakura, et al., Patente de los Estados Unidos No. 4,704,362. El *E. coli* es un anfitrión procaríota particularmente útil para clonar los polinucleótidos (por ejemplo, secuencias de ADN) de la presente invención. Otros anfitriones microbianos adecuados para uso incluyen bacilos, tales como *Bacillus subtilis*, y otras enterobacterias, tales como *Salmonella*, *Serratia*, y diversas especies de *Pseudomonas*. En estos anfitriones procaríotas, también se puede hacer que los vectores de expresión, que típicamente contendrán

secuencias de control de la expresión compatibles con la célula anfitriona (por ejemplo, un origen de replicación). Además, estará presente cualquier número de una variedad de promotores bien conocidos, tal como el sistema promotor de lactosa, un sistema promotor de triptófano (trp), un sistema promotor de beta-lactamasa o un sistema promotor del fago lambda. Los promotores controlarán típicamente la expresión, opcionalmente con una secuencia operadora, y tienen secuencias de sitio de enlazamiento al ribosoma y similares, para iniciar y completar la transcripción y la translación.

Otros microbios, tales como levadura, también son útiles para la expresión. *Saccharomyces* es un anfitrión de levadura preferido, con vectores adecuados que tienen secuencias de control de la expresión (por ejemplo, promotores), un origen de replicación, secuencias de terminación y similares según se desee. Los promotores típicos incluyen 3-fosfoglicerato quinasa y otras enzimas glicolíticas. Promotores de levadura inducibles incluyen, entre otros, promotores del alcohol deshidrogenasa, isocitocromo C, y enzimas responsables por la utilización de maltosa y galactosa.

Además de los microorganismos, también se pueden utilizar cultivos de células de tejidos de mamíferos para expresar y producir los polipéptidos de la presente invención (por ejemplo, polinucleótidos que codifican inmunoglobulinas o fragmentos de los mismos). Véase Winnacker, *From Genes to Clones*, VCH Publishers, N.Y., N.Y. (1987). Las células eucariotas son realmente preferidas, puesto que un número de líneas de células anfitrionas adecuadas capaces de secretar proteínas heterólogas (por ejemplo, inmunoglobulinas intactas) se han desarrollado en la técnica, e incluyen las líneas celulares CHO, diversas líneas celulares Cos, células HeLa, preferiblemente, líneas celulares de mieloma o células B o hibridomas transformados. Preferiblemente, las células son no humanas. Los vectores de expresión para estas células pueden incluir secuencias de control de expresión, tales como un origen de replicación, un promotor, y un potenciador, Queen et al., *Immunol. Rev.* 89:49-68 (1986), y sitios de información de procesamiento necesarios, tales como sitios de enlazamiento al ribosoma, sitios de empalme de ARN, sitios de poliadenilación, y secuencias terminadoras de la transcripción. Secuencias de control de la expresión preferidas son promotores derivados de genes de inmunoglobulina, SV40, adenovirus, virus del papiloma bovino, citomegalovirus y similares. Véase Co, et al., *J. Immunol.* 148: 1149-1154 (1982).

Alternativamente, las secuencias de codificación de anticuerpos pueden incorporarse en transgenes para la introducción en el genoma de un animal transgénico y la expresión subsecuente en la leche del animal transgénico, tal como se describe por ejemplo por Deboer, et al., Patente de los Estados Unidos No. 5,741,957, Rosen, Patente de los Estados Unidos No. 5,304,489, y Meade, et al., Patente de los Estados Unidos No. 5,849,992. Transgenes adecuados incluyen secuencias codificantes para cadenas ligeras o pesadas en enlaces operables con un promotor y potenciador de un gen específico de la glándula mamaria, tal como caseína o beta lactoglobulina.

Los vectores que contienen las secuencias de polinucleótidos de interés (por ejemplo, las secuencias de cadena pesada y ligera que codifican secuencias o fragmentos de los mismos y secuencias de control de la expresión) pueden transferirse a la célula anfitriona mediante métodos bien conocidos, que varían dependiendo del tipo de anfitrión celular. Por ejemplo, la transfección por cloruro de calcio se utiliza comúnmente para células procariontas, mientras que el tratamiento con fosfato de calcio, electroporación, lipofección, transfección biolística o a base de virus puede utilizarse para otros anfitriones celulares. Otros métodos utilizados para transformar células de mamífero incluyen el uso de polibreno, fusión de protoplastos, liposomas, electroporación, y microinyección (véase en general, Sambrook, et al., *supra*). Para la producción de animales transgénicos, los transgenes pueden microinyectarse en oocitos fertilizados o pueden incorporarse en el genoma de células madre embrionarias, y los núcleos de dichas células transferidas a oocitos enucleados. Todos estos métodos se describen en Sambrook, et al, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Press, 2nd ed (1989).

Cuando las cadenas pesadas y ligeras son clonadas en vectores de expresión separados, los vectores son co-transfectados para obtener la expresión y ensamblaje de inmunoglobulinas intactas. Una vez expresados, los anticuerpos enteros, sus dímeros, cadenas ligeras y pesadas individuales, u otras formas de inmunoglobulina pueden ser purificados de acuerdo con procedimientos estándar de la técnica, incluyendo mediante el uso de la precipitación con sulfato de amonio, columnas de afinidad, cromatografía de columna, purificación por HPLC, electroforesis en gel y otros procedimientos similares, incluyendo los divulgados por Scopes, *Protein Purification*, Springer-Verlag, NY (1982). Para uso farmacéutico, es deseable emplear sustancialmente inmunoglobulinas puras que tienen un grado o pureza y/u homogeneidad de al menos 90 a 95%, o incluso 98 a 99%.

Los fragmentos de, o truncados, anticuerpos de antiquina, tales como fragmento Fab, fragmento Fab', un fragmento F(ab')<sub>2</sub>, y un fragmento F<sub>v</sub>, así como cadenas de anticuerpo sencillas que comprenden las CDR de cadena ligera o pesada individuales involucradas en el enlazamiento a quimioquinas, pueden ser utilizados para enlazarse a neutralizar una o más quimioquinas CC.

Anticuerpos de antiquina pueden ser modificados o derivados químicamente para proveer un efecto deseado.

Un conjugado de anticuerpo o anticuerpo conjugado se pueden hacer usando el anticuerpo de antiquina o su fragmento enlazado a través de enlaces peptídicos a una proteína heteróloga. En tales realizaciones, la porción enlazante a antígeno del anticuerpo se enlaza a MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES, MCP-1 y/u otras quimioquinas

- relacionados CC. Los anticuerpos de antiquina también pueden conjugarse con enzimas, toxinas o una citoquina como unidades estructurales efectoras. También pueden contener o ser conjugados adicionalmente o enlazados covalentemente a unidades estructurales de accesorios tales como etiquetas químicas o radiológicas, toxinas, unidades estructurales biológicamente activas o dirigidas, u otras sustancias que incrementan su vida media biológica o disponibilidad biológica, tal como por conjugación con polietilenglicol o albúmina. Un anticuerpo de antiquina de la invención puede contener o estar conjugado a una unidad estructural de accesorios, tales como los divulgados por Carter and Senter, *Cancer J.* 14: 154-169 (2008). Los anticuerpos y productos de anticuerpos de la invención pueden ser inmovilizados a un sustrato sólido o resina de inmuoafinidad tal como los descritos por *Antibodies: A Laboratory Manual*; Eds. E. Harlow & D. Lane, (1988).
- La pegilación de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de la invención se puede llevar a cabo mediante cualquiera de las reacciones de pegilación conocidas en la técnica, como se describe, por ejemplo, en las siguientes referencias: *Focus on Growth Factors* 3:4-10 (1992); EP 0 154 316; and EP 0 401 384. Preferiblemente, la pegilación se lleva a cabo a través de una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula de polietilenglicol reactiva (PEG) (o un polímero soluble en agua reactivo análogo). Un polímero soluble en agua preferido para la pegilación de los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de la invención es PEG. Tal como se usa aquí, el "polietilenglicol" está destinado a abarcar cualquier de las formas de PEG que han sido utilizadas para derivar otras proteínas, tales como mono (Cl-CIO) alcoxi- o ariloxi-polietilenglicol.
- Los métodos para preparar anticuerpos y fragmentos de anticuerpos pegilados de la invención comprenderán generalmente las etapas de (a) hacer reaccionar el anticuerpo o fragmento de anticuerpo con PEG, tal como un éster reactivo o derivado aldehído de PEG, bajo condiciones por las que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se enlaza a uno o más grupos PEG, y (b) obtener los productos de reacción. Será evidente para un experto normal en la técnica seleccionar las condiciones de reacción óptimas o las reacciones de acilación basadas en parámetros conocidos y el resultado deseado.
- Anticuerpos y fragmentos de anticuerpos pegilados generalmente se pueden usar para tratar afecciones que pueden ser aliviadas o moduladas por la administración de los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos descritos aquí. En general, los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos pegilados han incrementado la vida media, en comparación con los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos no pegilado. Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos pegilados se pueden emplear solos, juntos, o en combinación con otras composiciones farmacéuticas.
- En otras realizaciones de la invención, los anticuerpos o fragmentos de enlazamiento a antígeno de los mismos son conjugados a la albúmina usando técnicas reconocidas en el arte.
- En otra realización de la invención, anticuerpos, o fragmentos de los mismos, se modifican para reducir o eliminar los sitios de glicosilación potenciales. Tales anticuerpos modificados se denominan frecuentemente como anticuerpos "aglicosiladas". Con el fin de mejorar la afinidad de enlazamiento de un anticuerpo o fragmento enlazante a antígeno del mismo, se pueden modificar los sitios de glicosilación del anticuerpo, por ejemplo, por mutagénesis (por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio). Los "sitios de glicosilación" se refieren a los residuos de aminoácidos que son reconocidos por una célula eucariota como lugares para la fijación de residuos de azúcar. Los aminoácidos donde está enlazado el carbohidrato, tales como un oligosacárido, son típicamente residuos de asparagina (enlazamiento a N), serina (enlazamiento a O), y treonina (enlazamiento a O). Con el fin de identificar los sitios potenciales de glicosilación dentro de un anticuerpo o fragmento enlazante a antígeno, se examina la secuencia del anticuerpo, por ejemplo, mediante el uso de bases de datos disponibles públicamente, tales como el sitio web provisto por el Center for Biological Sequence Analysis (véase [http:// www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/](http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/) para predecir sitios de glicosilación enlazados a N y [http:// www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/](http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/) para predecir los sitios de glicosilación enlazados a O). Métodos adicionales para alterar los sitios de glicosilación de anticuerpos se describen en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 6,350,861 y 5,714,350.
- En aún otra realización de la invención, los anticuerpos o fragmentos de los mismos pueden ser alterados mediante la modificación de la región constante del anticuerpo para reducir al menos una función efectora biológica mediada por la región constante con respecto a un anticuerpo no modificado. Para modificar un anticuerpo de la invención de tal manera que exhiba enlazamiento reducido al receptor Fc, el segmento de región constante de inmunoglobulina del anticuerpo se puede mutar en las regiones particulares necesarias para interacciones del receptor Fc (FcR), véase, por ejemplo, Canfield, S. M. y S. L. Morrison, *J. Exp. Med.* 173:1483-1491 (1991); y Lund, J. et al., *J. Immunol.* 147:2657-2666 (1991). La reducción en la capacidad enlazante a FcR del anticuerpo también puede reducir otras funciones efectoras que se basan en interacciones de FcR, tales como la opsonización y la fagocitosis y la citotoxicidad celular dependiente de antígeno. Derivados de la región constante para potenciar o reducir las funciones efectoras de anticuerpos y para reducir o extender la persistencia de suero son descritos por Carter, P.J., *Nat. Rev. Immunol.* 6: 343-357 (2006).
- Los anticuerpos de antiquina de la invención se pueden incorporar en composiciones farmacéuticas tales como las descritas anteriormente o en composiciones utilizadas para almacenar, preservar o administrar los anticuerpos a los sujetos en necesidad de tratamiento.

Kits para uso en las aplicaciones terapéuticas o de diagnóstico anteriores, pueden contener uno más anticuerpos de antiquina, anticuerpos de control positivo o negativo, quimioquinas CC enlazadas por anticuerpos de antiquina, quimioquinas de control no enlazadas por el anticuerpo de antiquina, así como otros componentes farmacológicos o de diagnóstico e instrucciones escritas con respecto al uso del kit.

- 5 Los anticuerpos o fragmentos enlazantes a antígeno de la invención son útiles para, por ejemplo, para propósitos terapéuticos (mediante la modulación de la actividad de quimioquinas CC), para propósitos de diagnóstico para detectar o cuantificar quimioquinas CC, y purificación de quimioquinas CC. Por lo tanto, los kits que comprenden un anticuerpo de la invención para cualquiera de los propósitos descritos aquí, también están dentro del alcance de la invención.
- 10 Se ha demostrado que las quimioquinas CC, particularmente MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES, y/o MCP-1 desempeñan un papel en condiciones patológicas asociadas con la inflamación. Se ha demostrado que todas las MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES, y/o MCP-1 tienen actividad potente quimiotáctica para los leucocitos, especialmente los monocitos y linfocitos T. Estas condiciones patológicas incluyen las descritas por Johnson et al., Trends Immunol. 26:268-274 (2005).
- 15 Las MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES y/o MCP-1 son moléculas con potente actividad quimiotáctica para los monocitos y linfocitos T. Se espera que dadas sus actividades que se superponen y la expresión incrementada de todas las cuatro de estas quimioquinas en las enfermedades humanas, el bloqueo de dos, tres o cuatro moléculas de quimioquinas CC tengan un mayor efecto beneficioso que solo la inhibición de una sola quimioquina CC sencilla. De acuerdo con lo anterior, los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de la invención son útiles para modular la actividad de estas quimioquinas y afectar la patología de trastornos asociados con estas quimioquinas. Como tales, estos anticuerpos y fragmentos son útiles en composiciones terapéuticas para el tratamiento de condiciones inflamatorias y condiciones patológicas asociadas con la expresión de moléculas de quimioquinas CC. En estas realizaciones, un paciente se identifica por tener una de las enfermedades a tratar, tales como por exhibir al menos un signo o síntoma de la enfermedad o trastorno. Al menos un anticuerpo o fragmento enlazante a antígeno del mismo de la invención o composiciones que comprenden al menos un anticuerpo o fragmento enlazante a antígeno del mismo de la invención se administra en una cantidad suficiente para aliviar al menos un síntoma de la enfermedad o trastorno, o para reducir la actividad de al menos una de MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES y / o MCP-1.

Trastornos susceptibles para prevención o tratamiento. Tal como se utilizan aquí, los términos "un trastorno en el que la actividad de quimioquinas CC es perjudicial" y "un trastorno asociado a quimioquinas CC" pretenden incluir enfermedades y otros trastornos en los que la presencia de una quimioquina CC, incluyendo MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES, MCP-1 y otras quimioquinas CC, en un sujeto que sufre del trastorno, han demostrado ser o se sospecha de ser bien sea responsables por la fisiopatología del trastorno o un factor que contribuye al trastorno. Por consiguiente, un trastorno en el que la actividad de quimioquinas CC es perjudicial es un trastorno en el que se espera que la inhibición de la actividad de quimioquinas CC prevenga o alivie los síntomas y/o progresión de la enfermedad. Tales trastornos pueden ser evidenciados, por ejemplo, por un incremento en la concentración de quimioquinas CC en un fluido biológico de un sujeto que padece el trastorno, por ejemplo, un incremento en la concentración de RANTES en el suero, plasma, fluido sinovial, orina, etc., del sujeto, que puede detectarse, por ejemplo, utilizando un anticuerpo anti-RANTES. Hay numerosos ejemplos de trastornos en los que la actividad de quimioquinas CC es perjudicial. Se discute más adelante el uso de los anticuerpos y porciones de anticuerpo de la invención en la prevención o el tratamiento de trastornos específicos.

La artritis reumatoide (RA) se caracteriza por una afluencia de leucocitos, incluyendo linfocitos T y B, macrófagos y neutrófilos, en el revestimiento sinovial de las articulaciones; véase la revisión de Koch, Arthritis Rheum. 52: 710-721 (2005). La MIP-1 $\alpha$  se encuentra en altos niveles en el líquido sinovial de pacientes con RA y los niveles incrementados se correlacionan con la gravedad de la enfermedad. Del mismo modo se encuentran en las articulaciones artríticas en modelos murinos de roedores de altos niveles de RA de MIP-1 $\alpha$  murino. Los anticuerpos neutralizantes disminuyen las marcaciones artríticas en un modelo de artritis inducida por colágeno en aproximadamente un 50%; Kasama, et al., J. Clin. Invest. 95: 2868-2876 (1995).

Los niveles de RANTES también se incrementan en las articulaciones en un modelo de roedor inducido por adyuvante de la artritis. Los anticuerpos de RANTES reducen los síntomas en este modelo; Barnes et al., J. Clin. Invest. 101: 2910-2919 (1998).

También se ha demostrado que la MCP-1 es producida por las células sinoviales y la infiltración de leucocitos en los pacientes con RA. Los anticuerpos neutralizantes de MCP-1 también reducen la marcación clínica en un modelo de roedor de la artritis; Ogata, et al., J. Pathol. 182: 106-114 (1997).

La esclerosis múltiple (MS) se caracteriza por una ruptura de la vaina de mielina alrededor de los nervios y por la afluencia de leucocitos en el tejido nervioso. Se encuentran altos niveles de quimioquinas incluyendo MIP-1 $\alpha$ , RANTES y MCP-1 en las lesiones cerebrales de pacientes con MS; Sorensen, et al., J. Clin. Invest. 103: 807-815 (1999).

La encefalitis autoinmune experimental (EAE) es un modelo de enfermedad que imita estrechamente la MS humana. Tanto la MIP-1 $\alpha$  como la y MCP-1 se han implicado en la inducción de síntomas de la enfermedad y en el desarrollo de recaídas, como se demuestra con anticuerpos neutralizantes; Kennedy, et al., J. Neuroimmunol. 92: 98-108 (1998).

5 La enfermedad fibrótica incluye cualquier condición marcada por un incremento del tejido fibroso intersticial. Las quimioquinas CC son conocidos por estar asociados con condiciones fibróticas. Por ejemplo, los niveles de MCP-1, MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$  están elevados en pacientes con esclerosis sistémica y altos niveles de quimioquinas CC correlacionadas con el desarrollo de la fibrosis de pulmón en estos pacientes; Hasegawa et al., Clin. Exp. Immunol. 117: 159-165 (1999).

10 La aterosclerosis se caracteriza por depósitos de lípidos vasculares con alta infiltración de macrófagos. Los ratones con eliminación de MCP-1 muestran una marcada disminución de macrófagos y deposición de lípidos en un modelo murino de aterosclerosis; Gu, et al., Mol. Móvil 2: 275-281 (1998).

15 Los pacientes de asma tienen marcada infiltración de leucocitos y niveles incrementados de quimioquinas CC en los pulmones que conducen a hiperrespuesta de las vías respiratorias. En modelos de roedores de anticuerpos neutralizantes de asma a MIP-1 $\alpha$ , MCP-1 o RANTES disminuyó la inflamación y/o la hiperreactividad de las vías respiratorias típicas de esta enfermedad; Lukacs, et al., J. Immunol. 158: 4398-4404 (1997).

Los modelos animales descritos en los documentos anteriores se pueden usar para evaluar la eficacia de los anticuerpos de antiquina en el tratamiento de la condición asociada, trastorno o enfermedad y estos modelos y métodos de su uso son divulgados en los documentos anteriores.

20 Además de las enfermedades señaladas anteriormente, otras numerosas condiciones, trastornos y enfermedades han sido asociadas con la actividad de una o más quimioquinas, estos incluyen, pero no se limitan a: enfermedades oncogénicas, enfermedades inflamatorias del intestino, dermatitis atópica, psoriasis, apoplejía, trasplantes de órganos, COPD, glomerulonefritis, lupus nefritis, esclerodermia, cirrosis, enfermedad de Alzheimer, isquemia por CHF, restenosis coronaria, nefropatía/neuropatía/retinopatía diabética, osteoartritis, periodontitis, infecciones por levadura y virales, y desregulación del embarazo. Cuando las quimioquinas CC desempeñan un papel en estas patologías, se puede administrar un anticuerpo de antiquina para reducir la gravedad de estas condiciones.

25 Tales métodos involucran generalmente la administración de una cantidad de un anticuerpo de antiquina usualmente en un vehículo farmacéuticamente aceptable a un sujeto, tal como un animal o humano, en necesidad del mismo. La cantidad de anticuerpo de antiquina o una versión truncada o fragmento del mismo se selecciona a fin de inhibir la actividad de una o más quimioquinas en el sujeto. Métodos similares pueden llevarse a cabo *ex vivo* en materiales biológicos (por ejemplo, sangre, médula ósea, tejido orgánico) retirado de un sujeto o en materiales biológicos mantenidos *in vitro*.

30 Los anticuerpos de antiquina pueden ser utilizados para bloquear la quimiotaxis. Tales métodos comprenden mezclar o poner en contacto un anticuerpo de antiquina con un medio que contiene quimioquinas CC a las que se enlaza el anticuerpo de antiquina, o un medio que contiene células que producen estas quimioquinas CC.

35 Los ensayos de diagnóstico pueden emplear útilmente los anticuerpos de antiquina de la invención. Tales ensayos involucran poner en contacto un anticuerpo de antiquina que tiene especificidades conocidas para las quimioquinas CC con una muestra biológica sospechosa de contener al menos una quimioquina a la que se enlaza el anticuerpo de antiquina y determinar la cantidad de enlazamiento, por ejemplo, mediante la medición de formación de complejos. Los anticuerpos de antiquina pueden usarse en forma libre o enlazada al sustrato. La invención provee además inmunoensayos *in vitro* para la detección de quimioquinas CC en las muestras.

40 Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de la invención pueden usarse para detectar quimioquinas CC en las muestras usando una variedad de ensayos inmunológicos bien conocidos. Los anticuerpos se pueden usar, por ejemplo, en los ELISA, transferencia Western, radioinmunoensayos, inmunoprecipitación, cromatografía de inmunoafinidad, inmunotinción de secciones de tejido, detección por inmuno-oro en muestras de tejido con microscopía electrónica, y similares. Los protocolos para estos y otros ensayos son bien conocidos en la técnica y están bien dentro de la competencia del experto en la materia.

45 Utilizando los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de la invención los inmunoensayos pueden usarse para detectar la presencia y cantidades relativas de quimioquinas CC en una muestra. Las muestras pueden incluir, pero no se limitan a, tejido o células homogeneizadas, secciones de tejido histológico para microscopía de luz y electrónica, extractos de proteínas de tejidos o células, csf, fluido de las articulaciones, sangre, plasma, suero, secreciones de la mucosa, semen, secreciones vaginales, lágrimas, saliva, sudor, orina, heces y similares. La presencia de cantidades incrementadas de una(s) quimioquina(s) CC en relación con, por ejemplo, muestras normales, pueden indicar la presencia de un estado de enfermedad, y puede ser indicado el tratamiento con un agente terapéutico de la invención. En algunos casos, puede haber una cantidad disminuida de quimioquinas CC en

relación con las muestras normales, y se puede usar el tratamiento apropiado con quimioquina CC o anticuerpos de imagen interna que imitan las quimioquinas CC para estimular la función inmune.

En algunas realizaciones, un inmunoensayo se puede utilizar para ayudar en la purificación de quimioquinas CC. Por ejemplo, una resina de inmunoafinidad se puede utilizar en la que los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de la invención se inmovilizan sobre un sustrato. Se agrega una muestra que contiene las quimioquinas CC a la resina de inmunoafinidad y los anticuerpos se enlazan a la resina, mientras que otros componentes de la muestra permanecen en solución. La resina es lavada y las quimioquinas CC subsecuentemente son eluidas de la resina, sustancialmente purificada y aislada. Preferiblemente, los anticuerpos usados en el inmunoensayo tendrán alta afinidad de enlazamiento, tal como se define aquí.

10 **EJEMPLOS**

Esta invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que no deben interpretarse como limitantes.

**Ejemplo 1 - Producción de hibridomas que producen anticuerpos de antiquina**

15 Los ratones fueron inmunizados secuencialmente con tres quimioquinas CC, en orden aleatorio, a partir del conjunto que inicialmente incluía MIP-1 $\alpha$ , RANTES y MCP-1 (PeproTech). Para la fusión de hibridoma 3, que produce MAB 3C12F, el ratón fue inmunizado inicialmente con MIP-1 $\alpha$ , seguido por impulsos con RANTES, luego MCP-1, luego MCP-1 de nuevo. Para la fusión de hibridoma 7, que produjo MABs 7D12A y 7D1G, el ratón fue inmunizado inicialmente con MIP-1 $\alpha$ , seguido por impulsos con MCP-1, luego RANTES, luego una combinación de MIP-1 $\alpha$  y RANTES. Para la fusión de hibridoma 18, que produjo MABs 18V4F y 18P7E, los ratones fueron inmunizados  
20 inicialmente con MIP-1 $\beta$ , seguido por impulsos con MIP-1 $\alpha$ , luego RANTES, y luego otro impulso con RANTES.

Para cada inmunización se utilizaron 10  $\mu$ g de proteína, siguiendo protocolos de inmunización estándar, véase Current Protocols in Immunology, Eds. Coligan JE, et al. (2006), sección 2.1. Las inmunizaciones iniciales se realizaron en adyuvantes de Freund completos, seguido por incrementos a intervalos de 3 semanas de dos quimioquinas diferentes en adyuvantes de Freund incompletos.

25 Diez días después el suero de impulso final se recogió y se realizaron las pruebas de reactividad con quimioquinas CC, MIP-1 $\alpha$ , RANTES, MCP-1 y MIP-1 $\beta$  por ELISA como se describe en Current Protocols in Immunology, 2006, Eds. JE Coligan et al., Sección 2.4. Para la MIP-1 $\alpha$ , la quimioquina se recubrió sobre una placa ELISA de 96 pozos (a 1  $\mu$ g/mL) y se incubó con suero en un rango de diluciones de 1:50 a 1:6400. Para RANTES, MCP-1 y MIP-1 $\beta$ , se agregaron quimioquinas biotiniladas (0.5  $\mu$ g/mL) a placas recubiertas con estreptavidina (Pierce) y luego se  
30 incubaron con sueros diluidos. El Anticuerpo enlazado a quimioquinas recubiertas se detectó utilizando un anticuerpo secundario Fc anti-ratón conjugado con HR.

La biotinilación de las quimioquinas para ensayos de ELISA se realizó usando sulfo-NHS-LC-biotina (Pierce). La quimioquina en PBS se mezcló con aproximadamente 2 veces exceso molar de sulfo-NHS-LC-biotina y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min. Reactivo de biotina libre se removió por diálisis en PBS durante la noche  
35 utilizando unidades de mini diálisis Slide-a-Lyzer con corte de 3,500 MW (Pierce).

Resultados de los ELISA en suero desde el conjunto inicial de las inmunizaciones utilizando MIP-1 $\alpha$ , RANTES y MCP-1 mostraron una variedad de respuestas (véase la Tabla 1), incluyendo algunas respuestas a MIP-1 $\beta$  a pesar de que no se utilizó como un inmunógeno directo. Varios ratones tenían respuestas a 3 y hasta 4 quimioquinas. Estos fueron candidatos para fusiones de hibridomas para buscar anticuerpos individuales que reaccionaron con quimioquinas múltiples. Como se muestra en la Tabla 1 a continuación, los ratones inmunizados produjeron sueros  
40 policlonales que reaccionaron con quimioquinas CC múltiples.

Tabla 1. Reactividades en suero de ratones inmunizados

Ratón	MCP-1	RANTES	MIP-1 $\alpha$	MIP-1 $\beta$	Secuencia de inmunización
A1			+		MIP-1 $\alpha$ →
A2		+			RANTES →
A3	+		+		MCP-1
A4	+	+	+		
A5	+	+	+	+	

ES 2 531 561 T3

B1	+	+	+	+	MIP-1 $\alpha$ → MCP-1 → RANTES
B2	+	+/-			
B3	+	+/-	+	+/-	
B4	+		+		
B5		+	+		
C1	+	+	+	+/-	RANTES →
C2	+/-	+	+		MIP-1 $\alpha$ →
C3		+	+/-		MCP-1
C4		+	+/-		
C5	+	+			
D1		+			RANTES →
D2		+			MCP-1 →
D3	+	+	+		MIP-1 $\alpha$
D4	+	+			
D5		+			
E1	+		+		MCP-1 →
E2	+	+	+	+/-	MIP-1 $\alpha$ →
E3	+		+		RANTES
E4	+	+/-	+/-		
E5	+	+	+		
F1	+	+	+		MCP-1 →
F2		+/-			RANTES →
F3					MIP-1 $\alpha$
F4	+			+/-	
F5	+				

Los ratones que muestran significativa reactividad en suero con al menos 3 quimioquinas objetivo se seleccionaron para las fusiones de hibridoma; véase Antibodies: A Laboratory Manual, Eds. E. Harlow & D. Lane (1988), capítulo 6.

- 5 Un ratón escogido fue impulsado con una mezcla de quimioquinas (20  $\mu$ g cada una) en PBS en los días -4 y -3 antes de la recolección del bazo para la fusión con células NS1 para crear hibridomas. Una suspensión celular individual se hizo a partir del bazo presionando entre los extremos helados de dos láminas y recogiendo las células en 10 mL RPMI. Las células se pasaron a través de un colador de nailon de 70  $\mu$ m, se enjuagaron con 10 mL adicionales de RPMI, y se granularon a 300 x g durante 5 minutos. Las células se lavaron y se centrifugaron 2 veces más y luego se recomptaron. Las células de bazo se combinaron con células NS1 (ATCC) en una relación de bazo:NS1 5:1 y luego se granularon. Se añadió un ml de PEG al 50% gota a gota a las células granuladas durante 1 minuto con agitación, entonces la mezcla se agitó durante 1 minuto adicional. Se agregó un 1 mL adicional de RPMI durante 1 minuto con agitación, y luego se agregaron otros 3 mL de RPMI durante 1 minuto con agitación, y luego se agregaron otros 16 mL de RPMI durante 2 minutos con agitación. Las células se granularon a 300 x g durante 10 minutos y se resuspendieron en 800 mL de medio de selección de hibridoma. Las células se dejaron reposar durante 2 horas y
- 10

5 luego se distribuyen sobre 40 placas de 96 pozos a 200 µl/pozo. Las placas se colocaron en incubadora a 37 °C y se alimentaron cada 2-3 días durante los siguientes 8-10 días mediante la eliminación y la sustitución de la mitad del volumen de medio. Alternativamente, las células fusionadas fueron suspendidas en medio semisólido a base de metilcelulosa CloneMatrix (Genetix) que contiene CloneDetect (Genetix) más etiquetado con Alexa488 MIP-1α a 4 µg/mL y se sembraron en una placa de pozo sencillo de 10 cm (Genetix).

**Ejemplo 2-Identificación de Anticuerpos de antiquina**

10 Los anticuerpos en el sobrenadante del hibridoma obtenido en el Ejemplo 1 se probaron para determinar su capacidad para reconocer 1α MIP, RANTES, MCP-1 y MIP-1β por ELISA (similar a las pruebas de suero descritas anteriormente). Los resultados de ELISA para los sobrenadantes de hibridoma iniciales se muestran en la Tabla 2 a continuación. Las células de los pozos de fusión que mostraron reactividad de al menos 4 veces más de fondo con más de una quimioquina se expandieron en placas de 24 pozos para realizar pruebas adicionales. Células de los pozos que reaccionaron con al menos 3 quimioquinas se clonaron por dilución limitante o por dilución en serie por lo menos dos veces. Los sobrenadantes de la placa del clon se probaron de nuevo por ELISA para identificar los clones individuales que producen anticuerpos reactivos contra quimioquinas múltiples. Los pozos positivos fueron confirmados mediante inspección visual para ser clonados.

15 Alternativamente, se analizaron hibridomas cultivados como colonias en medios semi-sólidos después de 16 días de crecimiento y enlazamiento de quimioquina fluorescente usando ClonePixFL (Genetix), y las mejores colonias se recogieron en placas de 96 pozos. Se analizaron los sobrenadantes que contenían anticuerpos de los clones de hibridoma después de 4 días para la reactividad por ELISA con MIP-1α (tanto directamente revestido como biotinilado), RANTES y MIP-1β como se describió anteriormente para el análisis de suero. Los clones 18V4F y 18P7E mostraron reactividad significativa con todas las 3 quimioquinas CC. Estos se reclonaron por dilución en serie para confirmar clonalidad y se probaron de nuevo por ELISA para confirmar la producción de anticuerpos de antiquina que exhiben reactividad multi-quimioquina.

20 Tabla 2. Señales de ELISA de los pozos de fusión de hibridomas originales para anticuerpos monoclonales antiquina.

a) Señales de ELISA para anticuerpos 3C12F, 7D1G, y 7D12A				
	3C12F	7D1G	7D12A	Fondo (aprox.)
MIP-1α	1.84	1.70	1.47	0.150
Biotina-RANTES	2.61	0.145	0.178	0.150
Biotina-MCP1	0.189	0.220	0.246	0.150
Biotina-MIP-1β	1.92	2.57	2.68	0.150
b) Señales de ELISA para anticuerpos 18V4F y 18P7E				
	18V4F	18P7E	Fondo	
Biotina-MIP-1α	1.674	1.001	0.040	
Biotina-RANTES	0.909	0.462	0.030	
Biotina-MIP-1β	1.699	1.603	0.075	

**Ejemplo 3: Caracterización de especificidades enlazantes a quimioquina de anticuerpos de antiquina**

30 Se realizó un análisis más completo de las especificidades enlazantes a quimioquinas para los anticuerpos de antiquina aislados utilizando un ensayo MSD (Meso Scale Discovery). Este es muy similar a los ensayos de ELISA realizados durante la selección de anticuerpos, sin embargo, utiliza la detección de la electroquimioluminiscencia de reactivos SULFO-TAG. En este caso, una selección de quimioquinas se recubrió en 1 µg/mL en una placa multidisposición de 96 pozos MSD (MA2400). Se adicionan anticuerpos de antiquina bien sea en 3 µg/mL (anticuerpos purificados 3C12F, 7D12A, 7D1G, 18V4F) o como sobrenadante que contiene anticuerpos de hibridoma no cuantificados (18P7E) y son detectados con un anticuerpo anti-murino SULFO-TAG utilizado en 1 µg/mL. Las placas se leyeron en un MSD sector imager 2400. Los niveles de fondo se muestran como líneas punteadas en las Figuras están basadas en el enlazamiento a una proteína no reactiva, albúmina de suero bovino (BSA).

**Ejemplo 4: Examen de las actividades funcionales de Anticuerpos de antiquina**

Los sobrenadantes de los pozos de fusión expandidos obtenidos en el Ejemplo 2 se probaron para la capacidad de bloquear la quimiotaxis mediada por una quimioquina objetivo. Esto se probó *in vitro* utilizando transfectantes CCR2 (receptor para MCP-1) o transfectantes CCR5 (receptor de MIP-1 $\alpha$ , RANTES y MIP-1 $\beta$ ) en placas Transwell de 96 pozos (Millipore). En el pozo inferior de cada cámara Transwell, se mezclaron 75  $\mu$ L de solución de quimioquinas (10 ng/ml en RPMI con FBS al 2%) con 75  $\mu$ L de sobrenadante de hibridoma. En el pozo superior de cada cámara se agregaron  $4 \times 10^5$  células en 75  $\mu$ L de RPMI con FBS al 2%. Se permite que ocurra la migración celular durante 2 horas a 37°C, entonces se cuantificó el número de células en la cámara inferior mediante conteo de células usando el FACScalibur. Las células de los pozos de hibridoma que mostraron una inhibición de al menos 2 quimioquinas también fueron clonadas mediante dilución en serie. Los anticuerpos purificados se probaron de manera similar para la inhibición de la quimiotaxis en un rango de concentraciones.

Transfectantes del receptor de quimioquinas utilizados en ensayos de quimiotaxis se generaron utilizando células Ba/F3 (obtenidas de la German Collection of Microorganisms and Cell Cultures - DSMZ). Los marcos de lectura abiertos de CCR2 y CCR5 humano se amplificaron mediante PCR (véase Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Eds Sambrook et al.) a partir de clones de ADNc adquiridos en Origene. Los cebadores de PCR se diseñaron a partir de secuencias publicadas. El cebador 5' se superpuso al codón Met de iniciación y contenía un sitio de clonación XhoI. El cebador 3' se superpuso al codón de terminación y contenía un sitio de clonación XbaI. El fragmento amplificado fue digerido con XhoI y XbaI y se insertó en los sitios equivalentes en el plásmido de expresión pNEF38 (Running Deer & Allison, Biotechnol Prog 20, 880-889, 2004). Las células Ba/F3 fueron transfectadas con los plásmidos de expresión por electroporación (Amaxa) y se seleccionaron en G418. Las células que expresan receptor funcional fueron seleccionadas a través de quimiotaxis para los ligandos de quimioquinas afines, y las células migradoras se clonaron por dilución limitante para obtener un clon celular estable.

**Ejemplo 5 Identificación y caracterización de anticuerpos de antiquina**

Cinco anticuerpos monoclonales únicos que reconocen quimioquinas CC múltiples fueron identificadas y designadas 3C12F, 7D1G, 7D12A, 18V4F y 18P7E. Los isotipos de los anticuerpos se determinaron utilizando IsoStrips (Roche). Se determinó que la cadena pesada 3C12F era un miembro del subgrupo IgG1 murino, mientras que se determinó que la cadena ligera 3C12F era un miembro del grupo  $\kappa$  murino. Se determinó que la cadena pesada 7D1G era un miembro del subgrupo IgG1 murino, mientras que se determinó que la cadena ligera 7D1G era un miembro del grupo  $\kappa$  murino. Se determinó que la cadena pesada 7D12A era un miembro del subgrupo IgG1 murino, mientras que se determinó que la cadena ligera 7D12A era un miembro del grupo  $\kappa$  murino. Se determinó que la cadena pesada 18V4F era un miembro del subgrupo murino IgG2a, mientras que se determinó que la cadena ligera 18V4F era un miembro de  $\lambda$  murino. Se determinó que la cadena pesada 18P7E era IgG1 y también se encontró que su cadena ligera también era  $\lambda$  murino.

MAB 3C12F reconoció MIP-1 $\alpha$ , RANTES y MIP-1 $\beta$  como se muestra utilizando anticuerpo purificado en la Figura 1 y como se ensayó originalmente por ELISA (véase la Tabla 2a) y bloqueó el enlazamiento de la molécula vCCI viral para RANTES (Figura 2). En ensayos de quimiotaxis 3C12F inhibió la función de MIP-1 $\alpha$  y RANTES, con valores de IC<sub>50</sub> de 3-5  $\mu$ g/ml cuando se utilizan 5 ng/mL de quimioquinas para inducir la quimiotaxis (Figura 3). Por BIAcore®, la afinidad de 3C12F para MIP-1 $\alpha$  es 49 nM.

Los dos anticuerpos 7D1G y 7D12A reconocieron MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$  cuando los sobrenadantes de hibridoma se ensayaron por ELISA (Tabla 2a). Estos mismos anticuerpos también bloquearon las funciones de ambas quimioquinas en ensayos de quimiotaxis, como se muestra en la Figura 4 y Figura 5.

Los dos anticuerpos 18V4F y 18P7E reconocieron MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  y RANTES cuando los sobrenadantes de hibridoma se ensayaron por ELISA (Tabla 2b). Los mismos anticuerpos también bloquearon las funciones (al menos parcialmente) de las quimioquinas MIP-1 $\alpha$ , RANTES, y MIP-1 $\beta$  en ensayos de quimiotaxis, como se muestra en la Figura 6 y Figura 7.

Utilizando la plataforma MSD para analizar la reactividad de los anticuerpos de antiquina purificados (o sobrenadantes de anticuerpos de hibridomas clonales, en el caso de 18P7E) con una disposición de quimioquinas, se encontró que el anticuerpo de antiquina 3C12F enlaza MIP-1 $\alpha$ , RANTES, MIP-1 $\beta$ , MPIF-1 y HCC-2, al menos, cuatro veces sobre el fondo (Figura 8). Del mismo modo el anticuerpo de antiquina 7D12A enlaza MIP-1 $\alpha$ , RANTES, MIP-1 $\beta$  y MPIF-1 (Figura 9), y el anticuerpo de antiquina 7D1G enlaza MIP-1 $\alpha$ , RANTES, MIP-1 $\beta$ , HCC-1, MPIF-1 y PARC (Figura 10). Los anticuerpos de antiquina 18V4F y 18P7E enlazan tanto a MIP-1 $\alpha$ , RANTES como MIP-1 $\beta$  (Figura 11 y Figura 12).

La Tabla 3 a continuación resume las especificidades de enlazamiento de estos cinco anticuerpos monoclonales antiquina.

55

Tabla 3. Especificidades y actividades funcionales de MAbs 3C12F, 7D1G, 7D12A, 18V4F y 18P7E.

	3C12F	7D1G	7D12A	18V4F	18P7E
<b>Enlazamiento (MSD)</b>					
MIP-1 $\alpha$ /CCL3	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
MIP-1 $\beta$ /CCL4	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
RANTES/CCL5	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
MCP-1/CCL2	No	No	No	No	No
Otras quimioquinas CC	Sí (MPIF-1, HCC-2)	Sí (HCC-1, MPIF-1, PARC)	Sí (MPIF-1)	No	No
muMIP-1 $\alpha$	No	Sí	No	No	No
muMIP-1 $\beta$	No	Sí	No	No	No
muRANTES	No	No	No	No	No
<b>Inhibición de Quimiotaxis</b>					
MIP-1 $\alpha$ /CCL3	Inhibe	Inhibe	Inhibe	Inhibe	Inhibe
MIP-1 $\beta$ /CCL4	-	Inhibe	Inhibe	Inhibe	Inhibe
RANTES/CCL5	Inhibe	-	-	Inhibe	Inhibe
MCP-1/CCL2	-	-	-	-	-
Otras quimioquinas CC	-	-	-	-	-
Inhibición de enlazamiento a vCCI a una quimioquina CC	Sí (para RANTES)	ND	ND	ND	ND
ND= No determinado					

**Ejemplo 6: Análisis de estructuras comunes a CC quimioquinas enlazadas por Anticuerpos de antiquina**

- 5 Se alinearon las secuencias de aminoácidos de las quimioquinas CC enlazadas por anticuerpos monoclonales 7D1G, 7D12A, 3C12F, 18V4F y 18P7E. Como se muestra en la Figura 13, se identificaron varias áreas de homología o que tienen un alto grado de similitud estructural con la que se enlazan los anticuerpos monoclonales antiquina de la invención. La identificación de estos segmentos comunes o conservados de quimioquinas CC caracteriza el enlazamiento al anticuerpo y sirve como estructuras de núcleo para la producción o selección de nuevos anticuerpos de antiquina .
- 10 Las Figuras 13a-d muestran las alineaciones de las quimioquinas CC enlazadas por cada anticuerpo de antiquina 3C12F (Figura 13a), 7D12A (Figura 13b), 7D1G (Figura 13c), 18V4F (Figura 13d) y 18P7E (Figura 13d). Los residuos de aminoácidos idénticos compartidos por las quimioquinas CC enlazados por un anticuerpo de antiquina particular, están sombreadas. Los residuos de aminoácidos similares se designan de acuerdo con la Tabla 5, por ejemplo, el residuo de aminoácido alanina (A) es similar a la glicina, serina o treonina.
- 15 Los residuos idénticos o similares compartidos se caracterizaron adicionalmente como no expuestos al solvente, parcialmente expuestos al solvente o totalmente expuestos al solvente basado en las Figuras. 1 y 2 de Fernández, id and Czaplewski et al., J. Biol. Chem. 274: 16077-84 (1999).
- 20 El análisis adicional correlacionó los residuos compartidos expuestos a solventes de los residuos idénticos alineados o idénticos + similares con residuos de quimioquinas CC asociados con el enlazamiento del receptor de quimioquina CC. La información estructural concerniente a los sitios de enlazamiento al receptor de quimioquina y otra información estructural, química, o funcional es divulgada en las entradas para las quimioquinas u otras moléculas

biológicas descritas aquí para el NCBI Conserved Domain Database CDD 29111 [uid] y para las direcciones web que aparecen debajo de cada último acceso el 9 de agosto de 2010.

5 Residuos del sitio enlazante al receptor putativo y otras características estructurales para MIP-1 $\alpha$ /CCL3 (SEQ ID NO: 71) se describen en [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?INPUT\\_TYPE=live&SEQUENCE=NP\\_002974.1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?INPUT_TYPE=live&SEQUENCE=NP_002974.1).

Residuos del sitio enlazante al receptor putativo y otras características estructurales para MIP-1 $\beta$ /CCL4 (SEQ ID NO: 72) se describen en [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?INPUT\\_TYPE=live&SEQUENCE=AAH70310.1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?INPUT_TYPE=live&SEQUENCE=AAH70310.1).

10 Residuos del sitio enlazante al receptor putativo y otras características estructurales para RANTES/CCL5 (SEQ ID NO:73) se describen en [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?INPUT\\_TYPE=live&SEQUENCE=P13501.3](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?INPUT_TYPE=live&SEQUENCE=P13501.3).

Residuos del sitio enlazante al receptor putativo y otras características estructurales para MPIF-1/ CCL23 (SEQ ID NO:81) se describen en [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?INPUT\\_TYPE=live&SEQUENCE=P55773.2](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?INPUT_TYPE=live&SEQUENCE=P55773.2).

15 Residuos del sitio enlazante al receptor putativo y otras características estructurales para HCC-1/ CCL14 (SEQ ID NO: 78) se describen en [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?INPUT\\_TYPE=live&SEQUENCE=NP\\_004157.1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?INPUT_TYPE=live&SEQUENCE=NP_004157.1).

20 Residuos del sitio enlazante al receptor putativo y otras características estructurales para HCC-2/ CCL15 (SEQ ID NO: 79) se describen en [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?INPUT\\_TYPE=live&SEQUENCE=Q16663.2](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?INPUT_TYPE=live&SEQUENCE=Q16663.2).

Residuos del sitio enlazante al receptor putativo y otras características estructurales para PARC/CCL18 (SEQ ID NO:82) se describen en [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?INPUT\\_TYPE=live&SEQUENCE=P55774.1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?INPUT_TYPE=live&SEQUENCE=P55774.1).

25 El MAb 3C12F reconoce quimioquinas CC que comparten residuos de aminoácidos idénticos C, C, Y, P, Y, T, C, S, P, V, F, T, C, A, P, V y L e las posiciones relativas 11, 12, 15, 21, 28, 31, 35, 36, 38, 40, 42, 44, 51, 52, 54, 59 y 66 en la figura 13a. De estos residuos, los residuos 11, 12, 15, 21, 28, 31, 35, 36, 38, 54 y 66 están parcial o completamente expuestos al solvente basado en las Figuras 1 y 2 de Fernandez, *id* and Czaplowski, *id*.

30 Además, las quimioquinas CC reconocidos por MAb 3C12F comparten residuos de aminoácidos químicamente similares en las posiciones 9, 14, 20, 25, 29, 33, 39, 41, 45, 46, 48 y 63 en la Figura 13a. De estos residuos, aquellos en 14, 20, 29, 33, 39, 45, 46, y 48 están parcial o completamente expuestos al solvente (comparar la Figura 13A y las Figuras 1 y 2 de Fernández, et al.).

35 Con base en este análisis estructural, residuos idénticos y similares 11, 12, 14, 15, 20, 21, 28, 29, 31, 33, 35, 36, 38, 39, 45, 46, 48, 54 y 66 forman porciones compartida de las moléculas de quimioquinas CC enlazadas por MAb 3C12F disponible como determinante para el enlazamiento entre este anticuerpo y las quimioquinas CC que reconoce.

De estos residuos compartidos, expuestos al solvente, los residuos 14, 15, 20, 21 y 66 se han caracterizado como residuos de contacto del receptor de quimioquinas de acuerdo con NCBI Conserved Domain Database CDD 29111. El bloqueo o enlazamiento de un anticuerpo de antiquina para poner en contacto residuos para un receptor de quimioquina CC afectaría o modularía la capacidad de una quimioquina CC para enlazarse a sus receptores.

40 Los residuos compartidos, accesibles al solvente de quimioquinas CC enlazadas por MAb 3C12F se han correlacionado además con la estructura de quimioquinas CC y aparecen en el bucle N entre los residuos de CC iniciales de las quimioquinas CC y la hebra  $\beta$  1, así como en el bucle 30 de las quimioquinas CC entre las hebras  $\beta$  1 y  $\beta$  2.

45 El MAb 7D12A reconoce quimioquinas CC con residuos de aminoácidos C, C, Y, R, P, Y, T, C, S, P, V, F, T, C, A, P, V y L en las posiciones relativas 11, 12, 15, 18, 21, 28, 31, 35, 36, 38, 40, 42, 44, 51, 52, 54, 59 y 66 en la Figura 13b. De estos residuos, los residuos 11, 12, 15, 18, 21, 28, 31, 35, 36, 38, 54 y 66 están parcial o completamente expuestos al solvente basado en las Figuras 1 y 2 de Fernandez, *id* y Czaplowski, *id*.

50 Además, las quimioquinas CC reconocidas por el MAb 7D12A comparten residuos de aminoácidos similares en las posiciones 9, 14, 20, 25, 29, 33, 39, 41, 45, 46, 48 y 63 en la Figura 13b. De estos residuos, aquellos en 14, 20, 29, 33, 39, 45, 46 y 48 están parcialmente o completamente expuestos al solvente (comparar Figura 13b y las Figuras 1 y 2 de Fernandez, et al.).

Sobre la base de este análisis estructural, residuos idénticos y similares 14, 15, 18, 20, 21, 28, 29, 31, 33, 35, 36, 38, 39, 45, 46, 48, 54 y 66 forman porciones compartidas de las moléculas de quimioquinas CC enlazadas por el MAb 7D12A disponible como determinante para el enlazamiento entre este anticuerpo y las quimioquinas CC que reconoce

5 De estos residuos, los residuos 14, 15, 18, 20, 21 y 66 se han caracterizado como residuos de contacto del receptor de quimioquinas de acuerdo con la NCBI Conserved Domain Database CDD 29111. El enlazante al anticuerpo competitivo que abarca estos residuos afectaría la capacidad de una quimioquina CC para enlazarse a sus receptores. Para las quimioquinas CC reconocidas por el MAb 7D12A varios residuos accesibles al solvente compartidos aparecen en el bucle N entre los residuos de CC iniciales de las quimioquinas CC y la hebra  $\beta$ 1, en el bucle 30 de las quimioquinas CC entre las hebras  $\beta$ 1 y 2, así como en el bucle 40 entre las hebras  $\beta$ 2 y  $\beta$ 3.

10 El MAb 7D1G reconoce quimioquinas CC con residuos de aminoácidos idénticos C, C, Y, P, Y, T, C, P, T, C, P, y V en las posiciones relativas 11, 12, 15, 21, 28, 31, 35, 38, 44, 51, 54 y 59 en la figura 13c. De estos residuos, los residuos 11, 12, 15, 21, 28, 31, 35, 38 y 54 están parcial o completamente expuestos al solvente basado en las Figuras 1 y 2 de Fernandez, *id* y Czaplowski, *id*.

15 Además, las quimioquinas CC reconocidas por el MAb 7D1G comparten residuos de aminoácidos similares en las posiciones 20, 25, 39-41, 45, 46, 63 y 66 en la Figura 13c. De estos residuos, aquellos en 20, 39, 45, 46 y 66 están parcial o completamente expuestos al solvente (comparar Figura 13c y Figuras 1 y 2 de Fernandez, et al.).

20 Sobre la base de este análisis estructural, residuos idénticos y similares 11, 12, 15, 20, 21, 28, 31, 35, 38, 39, 45, 46, 54 y 66 forman porciones compartidas de las moléculas de quimioquinas CC enlazadas por el MAb 7D1G disponible como determinantes para el enlazamiento entre este anticuerpo y las quimioquinas CC que reconoce.

25 De estos residuos compartidos, los residuos 15, 20, 21, 24 y 66 se han caracterizado como residuos de contacto del receptor de quimioquinas de acuerdo con la NCBI Conserved Domain Database CDD 29111. El enlazante al anticuerpo competitivo que abarca estos residuos afectaría la capacidad de una quimioquina CC para enlazarse a sus receptores. Para las quimioquinas CC reconocidas por el MAb 7D1G varios residuos accesibles al solvente compartidos aparecen en el bucle N entre los residuos de CC iniciales de las quimioquinas CC y la hebra  $\beta$ 1, así como en el bucle 40 entre las hebras  $\beta$ 2 y  $\beta$ 3.

30 Los MAb 18V4F y MAb 18P7E reconocen las quimioquinas CC con residuos de aminoácidos C, C, Y, R, P, Y, T, C, S, P, V, F, T, C, A, P, V y L en las posiciones relativas 11, 12, 15, 18, 21, 28, 31, 35, 36, 38, 40, 42, 44, 51, 52, 54, 59 y 66 en la Figura 13d. De estos residuos, los residuos 11, 12, 15, 18, 21, 28, 31, 35, 36, 38, 54 y 66 están parcial o completamente expuestos al solvente basado en las Figuras. 1 y 2 de Fernandez, *id* y Czaplowski, *id*.

Además, las quimioquinas CC reconocidas por los MAb 18V4F y 18P7E comparten residuos de aminoácidos similares en las posiciones 9, 14, 20, 25, 29, 33, 39, 41, 45, 46, 48 y 63 en la Figura 13d. De estos residuos, aquellos en 14, 20, 29, 33, 39, 45, 46 y 48 están parcial o completamente expuestos al solvente (comparar Figura 13d y Figuras 1 y 2 de Fernandez, et al.).

35 Sobre la base de este análisis estructural, residuos idénticos y similares 14, 15, 18, 20, 21, 28, 29, 31, 33, 35, 36, 38, 39, 45, 46, 48, 54 y 66 forman porciones compartidas de la moléculas de quimioquinas CC enlazadas por los MAb 18V4F y 18P7E disponibles como determinantes para el enlazamiento entre estos anticuerpos y las quimioquinas CC que reconocen.

40 De estos residuos, los residuos 14, 15, 18, 20, 21 y 66 se han caracterizado como residuos de contacto del receptor de quimioquinas de acuerdo con la NCBI Conserved Domain Database CDD 29111. El enlazamiento al anticuerpo competitivo que abarca estos residuos que afectarían la capacidad de una quimioquina CC para enlazarse a sus receptores. Para las quimioquinas CC reconocidas por los MAb 18V4F y 18P7E varios residuos accesibles al solvente compartidos aparecen en el bucle N entre los residuos de CC iniciales de las quimioquinas CC y la hebra  $\beta$ 1, en el bucle 30 de las quimioquinas CC entre las hebras  $\beta$ 1 y  $\beta$ 2, así como en el bucle 40 entre las hebras  $\beta$ 2 y  $\beta$ 3.

#### **Ejemplo 7: Secuencias de polinucleótidos de anticuerpos de antiquina**

Las secuencias de los dominios variables de los anticuerpos se determinaron después de la amplificación por PCR de estas regiones utilizando cebadores dentro de las regiones constantes. Se extrajo ARN de 107 células de hibridoma utilizando RNeasy (Qiagen), luego transcripción inversa utilizando el kit de transcripción inversa Superscript III de Invitrogen. Las regiones CDR fueron amplificadas por PCR usando un conjunto de cebadores para la cadena ligera o la cadena pesada (Jones y Bendig, *Biotechnology* 9, 88-89, 1991). Los fragmentos resultantes se insertaron en el plásmido pCRII utilizando el kit de clonación Zero Blunt TOPO PCR de Invitrogen y se secuenciaron usando cebadores M13 y M13rev. Se describen a continuación las secuencias de polinucleótidos que codifican los segmentos de cadena ligera y pesada, tales como las CDR de anticuerpos monoclonales, 3C12F, 7D1G, 7D12A, 18V4F y 18P7E. La secuencia de codificación de ADN de la región variable de cadena pesada de 3C12F se define

como SEQ ID NO: 1 y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de 3C 12F se define como SEQ ID NO: 2. La secuencia de codificación de ADN de la región variable de cadena ligera de 3C12F se define como SEQ ID NO: 6 y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 3C12F se define como SEQ ID NO: 7. Adicionalmente, las CDR de anticuerpo 3C12F se describen como SEQ ID NOS: 3-5 (región variable de cadena pesada) y SEQ ID NOS: 8-10 (región variable de cadena ligera).

La secuencia de codificación de ADN de la región variable de cadena pesada de 7D12A se define como SEQ ID NO: 11 y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de 7D12A se define como SEQ ID NO: 12. La secuencia de codificación de ADN de la región variable de cadena ligera de 7D12A se define como SEQ ID NO: 16 y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 7D12A se define como SEQ ID NO: 17. Adicionalmente, las CDR del anticuerpo 7D12A se describen como SEQ ID NOS: 13- 15 (región variable de cadena pesada) y SEQ ID NOS: 18-20 (región variable de cadena ligera).

La secuencia de codificación de ADN de la región variable de cadena pesada de 7D1G se define como SEQ ID NO: 21 y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de 7D1G se define como SEQ ID NO: 22. La secuencia de codificación de ADN de la región variable de cadena ligera de 7D1G se define como SEQ ID NO: 26 y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 7D1G se define como SEQ ID NO: 27. Adicionalmente, las CDR del anticuerpo 7D1G se definen como SEQ ID NOS: 23- 25 (región variable de cadena pesada) y SEQ ID NOS: 28-30 (región variable de cadena ligera).

La secuencia de codificación de ADN de la región variable de cadena pesada de 18V4F se define como SEQ ID NO: 31 y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de 18V4F se define como SEQ ID NO: 32. La secuencia de codificación de ADN de la región variable de cadena ligera de 18V4F se define como SEQ ID NO: 36 y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 18V4F se define como SEQ ID NO: 37. Adicionalmente, las CDR del anticuerpo 18V4F, tal como se define por Chothia and Lesk, se describen como SEQ ID NOS: 33-35 (región variable de cadena pesada) y SEQ ID NOS: 38-40 (región variable de cadena ligera).

La secuencia de codificación de ADN de la región variable de cadena pesada de 18P7E se define como SEQ ID NO: 41 y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de 18P7E se define como SEQ ID NO: 42. La secuencia de codificación de ADN de la región variable de cadena ligera de 18P7E se define como SEQ ID NO: 46 y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de 18P7E se define como SEQ ID NO: 47. Adicionalmente, las CDR del anticuerpo 18P7E, tal como se define por Chothia and Lesk, se describen como SEQ ID NOS: 43-45 (región variable de cadena pesada) y SEQ ID NOS: 48-50 (región variable cadena ligera).

### **Ejemplo 8: Humanización del anticuerpo monoclonal 3C 12F**

Los métodos de humanización de anticuerpos están diseñados para producir una molécula con inmunogenicidad humana reducida. Los métodos de humanización de anticuerpos son bien conocidos por aquellos de experiencia normal en la técnica e incluyen los descritos por Almagro and Fransson, *Frontiers Bioscience* 13:1619-1633 (2008). El método de injerto de CDR (Jones et al., *Nature* 321:522-525, 1986; Riechmann, et al., *Nature* 332:323-327, 1988)) se utilizó para embeber las secuencias de CDR de 3C12F en las secuencias marco de la región variable de IgC de cadena pesada y ligera de genes de la línea germinal humanos similares. En este caso, las secuencias de CDR de roedores han sido embebidas en las secuencias marco de región variable de IgC de cadena pesada y ligera de secuencias marco de genes escogidos de la línea germinal humanos que tienen la mayor identidad con las respectivas secuencias variables de cadenas pesada y ligera de roedores. Para métodos adecuados véase Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann, et al., *Nature* 332:323-327 (1988).

En la humanización de 3C12F, las secuencias de línea germinal humana para las cadenas pesadas y ligeras variables que comparten la mayor similitud con la secuencia 3C12F murínica se utilizaron como las secuencias marco humanas. Además de compartir alta similitud de secuencia con el anticuerpo murínico, también se encontró que las secuencias de línea germinal escogidas son abundantes en un muestreo de secuencias de anticuerpo reorganizado. Los residuos murinos que residen en las regiones determinantes de la complementariedad (CDR), tal como se define por Kabat, se injertaron en las secuencias marco humanas con residuos adicionales que se revirtieron al aminoácido murino cuando la evidencia indicó que pueden ser esenciales para el enlazamiento. Las secuencias de polinucleótidos que codifican las cadenas pesadas y ligeras del MAb 3C12F humanizado están dadas por SEQ ID NOS: 51 y 56. Las secuencias de aminoácidos correspondientes y las CDR y son identificadas por SEQ ID NOS: 52-55 y 57-60.

### **Ejemplo 9: Humanización del anticuerpo monoclonal 18V4F**

En la humanización de 18V4F, se empleó una estrategia diferente a la que se utilizó para humanizar el 3C12F. En lugar de injertar las CDR del anticuerpo murínico 18V4F en la secuencia de la línea germinal humana más similar, las CDR fueron injertadas en una secuencia consenso compilada a partir de la familia de cadena pesada variable más poblada, VHIII, y la familia de cadena ligera lambda variable más poblada, VLIII. A continuación, solamente aquellos residuos en la CDR, que han sido definidos por Chothia y Lesk para ser estructuralmente relevantes para el enlazamiento, se injertaron inicialmente en los marcos de consenso. Posiciones adicionales de CDR definidas más

ampliamente por Kabat, así como los residuos marco, fueron revertidas al aminoácido murínico nuevamente cuando la evidencia indicó que pueden ser importantes para retener el enlazamiento. Las secuencias de polinucleótidos que codifican las cadenas pesadas y ligeras del MAb 18V4F humanizado están dadas por SEQ ID NOS: 61 y 66. Las secuencias de aminoácidos correspondientes y las CDR se identifican por SEQ ID NOS: 62-65 y 67-70.

## 5 Ejemplo 10: Maduración por afinidad del MAb 3C12F y del Mab 18V4F humanizados

Las afinidades de enlazamiento de los anticuerpos monoclonales antiquina de la invención, si se desea, pueden potenciarse adicionalmente, mediante la maduración por afinidad como se describe por ejemplo, por Wu et al. (1998), Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 95: 6037-6.042.

10 Para mejorar las características de enlazamiento del MAb 3C12F humanizado y del MAb 18V4F humanizado a diversas quimioquinas (por ejemplo, RANTES/CCL5, MIP-1 $\alpha$ /CCL3 y MIP-1 $\beta$ /CCL4) y para generar agentes más potentes, se empleó una estrategia de mutagénesis dirigida al sitio en conjunción con el despliegue de fagos. El fragmento Fab de 3C12F humanizado o 18V4F humanizado se desplegó primero en la superficie del fago filamentoso M 13 como una fusión de cadena pesada con la proteína del gen III de M13 con la coexpresión del 15 3C12F humanizado o la cadena ligera de 18V4F humanizado, respectivamente. A continuación, cada posición de todas las seis CDR de Mab 3C12F humanizado o 18V4F humanizado se mutó metódicamente, 4-6 residuos de CDR contiguos a la vez, utilizando el protocolo de Sidhu y Weiss (Phage Display, A Practical Approach, Clackson, T. and Lowman, H. B., ed., Oxford University Press, 2004, Chapter 4). En algunos casos, los aminoácidos que rodean las CDR definidas también se mutaron en caso de que estuvieran involucradas en el enlazamiento al antígeno. Se construyó un total de 15 bibliotecas para cada anticuerpo.

20 El despliegue de fago 3C12F humanizado mutante o fragmentos Fab 18V4F humanizados se prepararon para cada biblioteca para selecciones de enlazamiento. Se llevaron a cabo hasta seis rondas de selección de fagos para las variantes de mayor afinidad de 3C12F humanizado o 18V4F humanizado utilizando los protocolos de maduración por la afinidad de Nielsen and Marks (Clackson and Lowman, *ibid*, Chapter 14). En resumen, las selecciones enlazantes se llevaron a cabo utilizando quimioquinas biotiniladas se capturaron usando perlas magnéticas 25 recubiertas con estreptavidina para identificar las variantes más altas de Fab 3C12F humanizado o Fab 18V4F humanizado. Las variantes de mayor afinidad son primero identificadas usando métodos bien conocidos en la técnica (véase Clackson and Lowman y las referencias citadas aquí) y luego se combinaron para lograr mayores mejoras de afinidad.

30 También se puede incrementar la afinidad de los anticuerpos por sus objetivos utilizando otros diversos métodos conocidos en la técnica. La afinidad se puede incrementar por mutación directa, despliegue de fagos o combinación aleatoria de cadenas dentro de los ácidos nucleicos que codifican las moléculas de anticuerpo. Los residuos individuales o múltiples pueden ser puestos de forma aleatoria de modo que en una población de sitios de anticuerpo antígeno por lo demás idénticos, todos los veinte aminoácidos, o un subconjunto de estos se encuentra 35 en posiciones particulares dentro o adyacentes a las CDR. Se divulgan métodos útiles para este propósito en Yang et al., J. Mol. Biol. 254, 392-403(1995); Hawkins et al., J. Mol. Biol. 226, 889-896 (1992); o Low et al., J. Mol. Biol. 250, 359-368 (1996). Marks et al., Bio/Technology, 10:779-783 (1992) describe la maduración por afinidad mediante combinación aleatoria del dominio de VH y VL; la mutagénesis aleatoria de CDR y/o residuos de marco se describe por Barbas et al., Proc. Nat. Acad. Sci., EE.UU 91:3809-3813 (1994); Schier et al., Gene, 169:147-155, 1995, Yelton et al., J. Immunol., 155:1994-2004 (1995); Jackson et al., J. Immunol. 154(7):3310-3319 (1995); and Hawkins et al., 40 J. Mol. Biol., 226:889-896 (1992).

La maduración por afinidad a veces se lleva a cabo usando mutagénesis aleatoria. Las sustituciones de aminoácidos hechas en posiciones particulares pueden ser aleatorias, o hacerse utilizando reglas simplistas. Por ejemplo, todos los residuos pudieron ser mutados a alanina, que es denominada como barrido de alanina, véase, por ejemplo, la WO 9523813. También pueden ser utilizados métodos basados en la secuencia de maduración por afinidad para 45 incrementar las afinidades de enlazamiento de anticuerpos, véase el documento US 2003/022240 A1 y US 2002/177170A1. Otros métodos incluyen mutagénesis basada en oligonucleótido de aminoácidos dentro de algunas o todas las posiciones con algunas o todas las CDR, seguido por la selección de mayor afinidad, como se describe por Wu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 95, 6037-6042 (1998) o por la selección para mayor afinidad usando despliegue de fagos, como se describe por Rajpal, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 102: 8466-8471 (1996). La 50 selección de anticuerpos madurados por afinidad también se puede hacer desplegando el anticuerpo o un fragmento del mismo en las células de levadura de superficie, como se describe por Siegal, Methods Mol. Biol., 504: 351-83 (2009), o en la superficie de células de mamíferos, como se describe por Ho, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 103: 9.637-9.642 (2.006). Los métodos descritos en los documentos anteriores que se pueden utilizar en el proceso de maduración por afinidad son cada uno divulgados en los documentos citados en este Ejemplo.

55 Identificación de secuencias de la quimioquina CC y del virus de la viruela

Las identidades de las quimioquinas y otros productos divulgados aquí se divulgan en los números de acceso en la Tabla 4.

Tabla 4. Números de acceso para Quimioquinas CC.y otras moléculas

Quimioquina	SEQ ID	# de Catálogo	# de acceso NCBI	Secuencias de aminoácidos
<b>HUMANO</b>				
MIP-1α/CCL3	71	PeptoTech 300-08	P10147.1; NP_002974.1	ASLAADTPTACCFSTYTSRQIPQNF IADYFETSSQCSKPGVIFLTKRSR QVCADPSEEWVQYVSDLELSA
MIP-1β/CCL4	72	PeptoTech 300-09	GenBank AAH70310.1	APMGSDPPTACCFSTYARKLPHN FVVDYYETSSLCSQPAVVFQTKR GKQVCADPSESWWQEYVYDLEL N
RANTES/CC L5	73	PeptoTech 300-06	P13501.3	SPYSSDTTPCCFAYIARPLPRAHI KEYFYTSKGKCSNPAAVVFVTRKN RQVCANPEKKWVREYINSLEMS
MCP-1/CCL2	74	PeptoTech 300-04	P13500.1	QPDAINAPVTCCYNFTNRKISVQ RLASYRRITSSKCPKEAVIFKTIV AKEICADPKQKWVQDSMDHLD KQTQTPKT
MCP-2/CCL8	75	R & D Systems 281- CP	P80075.2	QPDSVSIPITCCFNVINRKIPIQRL ESYTRITNIQCPKEAVIFKTKRGG EVCADPKERWVDRSMKHLDDQIF QNLKP
MCP-3/CCL7	76	R & D Systems 282- P3	P80098.3	QPVGINTSTTCCYRFINKKIPKQR LESYRRTTSSHCPREAVIFKTKLDD KEICADPTQKWVQDFMKHLDDK TQTPKL
MCP-4/CCL13	77	R & D Systems 327- P4	Q99616.1	QPDALNVPSTCCFTFSSKKISLQR LKSYYVITTSRCPQKAVIFRDKLGG EICADPKQKWVQNYMKHLGRK AHTLKT

(continuación)

Quimioquina	SEQ ID	# de Catálogo	# de Acceso NCBI	Secuencia de Amino ácido
<b>HUMANO</b>				
HCC-1/CCL14/ CCL14a	78	R & D Systems 1578-HC	NP_004157.1	GPYPSECCFTYTYTKIPRQRIMDY YETNSQCSKPGIVFITKRGHSVCTN PSDKWVDYIKDMKEN
HCC-2/MIP-1δ/CCL15	79	R & D Systems 628-LK	Q16663.2	SFHFAADCCTSYISQSPCSLMKS YFETSSECSKPGVIFLTKKGRQV CAKPSGPGVQDCMKKLLKPYSI
HCC-4/CCL16	80	R & D Systems 802-HC	O15467.1	QPKVPEWVNTPSTCCLKYYEKV LPRRLVGYRKALNCHLPAIFV TKRNREVCNPNDDWVQEYIKD PNLPLPTRNLSTVKIITAKNGQP QLLSQ
MP1F-1/CCL23	81	R & D Systems 131-M1	P55773.2	RFHATSADCCISYTPRSIPCSLLES YFETNSECSKPGVIFLTKKGRRFC ANPSDKQVQVCMRMLKLDTRIK TRKN
PARC/CCL18	82	R & D Systems 394-PA	P55774.1	AQVGTNKELCCLVYTSWQIPQK FIVDYSETSPQCPKPGVILLTKRG RQICADPNKKWVQKYISDLKLN A
Eotaxin/CCL11	83	R & D Systems 320-EO	P51671.1; Q6I9T4	GPASVPTTCCFNLANRKIPLQRL ESYRRITSGKCPQKAVIFKTKLA KDICADPKKKWVQDSMKYLDQ KSPTPKP
Eotaxin-2/CCL24	84	R & D Systems 343-E2	GenBank AAB51135.1	VVIPSPCCMFFVSKRIPENRVVSYQ LSSRSTCLKGGVIFTTKKGGQFCGD PKQEWQRYMKNLDAKQKKASPRAR AVAVKGPVQRYPGNQITTC

(continuación)

Quimioquina	SEQ ID	# de Catálogo	# de Acceso NCBI	Secuencia de aminoácido
<b>HUMANO</b>				
Eotaxin-3/CCL26	85	R & D Systems 346-E3	Q9Y258.1	TRGSDISKTCCKFQYSHKPLPW TWVRSYEFTSNCSQRAVIFTTKRG KKVCTHPRKKWVQK YISLLKTP KQL
MDC/CCL22	86	R & D Systems 336- MD	000626.1	GPYGANMEDSVCCRDYVRYRLP LRVVKHFYWTSDSCPRPGVVLL TFRDKEICADPRVPWVKMILNKL SQ
TARC/CCL17	87	R & D Systems 364-DN	Q92583.1	ARGTNVGRECCLEYFKGAIPLRK LKTWYQTSSEDCSRDAIVFVTVQ GRAICSDPNKRVKNAVYKYLQS LERS
LARC/MIP- 3α/CCL20	88	R & D Systems 360- MP	P78556.1	ASNFDCCLGYTDRILHPKFI VGFTR QLANEGCDINAIIFHTKKKLSVCAN PKQTWVKYIVRLLSKVKNM
ELC/MIP-3β/CCL19	89	R & D Systems 361-MI	Q99731.1	GTNDAEDCCLSVTQKPIPGYIVRNF HYLLIKDGCVRPAVVFTTLRGRQLC APPDQPWVERIIQRLQRTSAKMKRR SS
SLC/6Ckine/ CCL21	90	R & D Systems 366-6C	O00585.1; Q61CR7	SDGGAQDCCLKYQKIPAKVVRSY RKQEPSLGCSPAILFLPRKRSQAE LCADPKELWVQQLMQHLDKTPSPQK PAQGCRRKDRGASKTKGKKGSGKCK RTERSQTPKGP
I-309/CCL1	91	R & D Systems 272-I	P22362.1	KSMQVFFSRCCFSFAEQEIPLRAI LCYRNTSSICSNGLIFKLRGKE ACALDTVGVVQRHRKMLRHCP SKRK

(continuación)

Quimioquina	SEQ.ID	# de Catálogo	# de Acceso NCBI	Secuencia de aminoácido
<b>HUMANO</b>				
TECK/CCL2 5	92	R & D Systems 334-TK	GenBank AAB69981.1	QGVFEDCCLAYHYPIGWAVLRR AWTYRIQEVSGSCNLPAAIFYLP. KRHRKVCGNPKSREVQRAMKLL DARNKVFAKLHHNMQTFQAGP HAVKLLSSGNSKLSKFSNPIS SKRNVSLISANSGL
CTACK/CC L27	93	R & D Systems 376-CT	Q9Y4X3.1	FLPPSTACCTQLYRKPLSDKLL RKVIQVELQEADGDCHLQAFVL HLAQRSICIHQPQNPSSLQWFEHQ ERKLLHGTLPKLNFGLMRKMG
CCL28	94	R & D Systems 717-VC	Q9NRJ3.1	ILPIASSCCTEVSHHISRRLLERVN MCRIQRADGDCDLAAVILHVKR RRICVSPHNHTVKQWMKVQAA KKNKGKGNVCHRKKHHGKRNSN RAHQGKHETYGHKTPY
XCL1	95	R & D Systems 695-LT	P47992.1	MVGSEVSDKRTCVSLLTQRLLPVSRI KTYTITEGSLRAVIFITKRGLKVCA DPQATWVRDVRSMDRKSNTRNMI QTKPTGTQOSTNTAVTLTG

(continuación)

Quimioquina	SEQ ID	# de Catálogo	# de Acceso NCBI	Secuencia de aminoácido
<b>HUMANO</b>				
Fractalkine/C X3CL1	96	R & D Systems 365-FR	GenBank AAB49679.1	MAPISLSWLLRLATFCHLTVLLAGQ HHGVTKCNITCSKMTSKIIPVALLIH YQONQASCGRKRAIIILETRQHLFCA DPKEQWVKDAMQHLDROAAALTRNG GTFEKQIGEVKPRITPAAGGMDES VLEPEATGESSSLEPTPSQEAQRA LGTSPELPTGVTGSSGTRLPPTPKA QDGGPVGTELFRRVPPVSTAAATWQSS APHQPGPSLWAEAKTSEAPSTQDPS TQASTASSPAPEENAPSEGRVWGO GQSPRPENSLEREEMGPPVPAHTDAF QDWGPGSMHVSVVPSSEGTSPRE PVASGSWTPKAEPIHATMDPPQRLG VLIITPVPDQAATR
IL-8/CXCL8	97	R & D Systems 208-IL	P10145.1	SAKELRCQIKTYKPFHPKFIKEL RVIESGPHCANTEIIVKLSDGRELC LDPKENWVQRVVEKFLKRAENS
Gro- $\alpha$ /CXCL1	98	R & D Systems 275-GR	P09341.1	ASVATELRCQCLQTLQGIHPKNI QSVNVKSPGPHCAQTEVIATLKN GRKACLNPAPIVKKIIEKMLNS DKSN
Gro- $\beta$ /CXCL2	99	R & D Systems 276-GB	P19875.1	APLATELRCQCLQTLQGIHLKNI QSVKVKSPGPHCAQTEVIATLKN GQKACLNPAAPMVVKIIEKMLK NGKSN
Gro- $\gamma$ /CXCL3	100	R & D Systems 277-GG	P 19876.1	ASVVTELRQCCLQTLQGIHLKNI QSVNVRSPPGPHCAQTEVIATLKN GKKACLNPAAPMVVKIIEKILNK GSTN

(continuación)

Quimioquina	SEQ ID	# de Catálogo	# de Acceso NCBI	Secuencia de aminoácido
<b>HUMANO</b>				
ENA-78/CXCL5	101	R & D Systems 254-X	P42830.1	AGPAAAVLRELRCVCLQTQTQGVHPK MISNLQVFAIGPQCSKVEVVASLKN GKEICLDPEAPFLKKVIQKILDGNG KEN
GCP-2/CXCL6	102	R & D Systems 333-GC	P80162.4	VSAVLTELRCTCLRVTLRVNPKT IGKLQVFPAGPQCSKVEVVASLK NGKQVCLDPEAPFLKKVIQKILD SGNKKN
NAP-2/CXCL7	103	R & D Systems 393-NP	P02775.3	AELRCMCIKTTSGIHPKNIQSLEV IGKGTHCNQVEVIATLKDGRKIC LDPDAPRIKKIVQKKLAGDESAD
PF4/CXCL4	104	R & D Systems 795-P4	P02776.2	EAEEDGDLQCLCVKTTTSQVRPRHIT SLEVIKAGPHCPTAQLIATLKNGRK ICLDLQAPLYKKI I I K K L L E S
IP-10/CXCL10	105	R & D Systems 266-IP	P02778.2	MVPLSRVTRCTCISISNQVNPRL EKLEIIPASQFCPRVEIIATMKKKG EKRCNPESKAIKNLLKAVSKERSK RSP
MIG/CXCL9	106	R & D Systems 392-MG	Q07325.1	TPVVRKGRCSISTNQGTIHLQSL KDLKQFAPSPCEKIEIIATLKNQ VQTCLNPDSDADVKELIKTEKQV SQKKKQKNGKKKHQKKVVKVR KSQRSRQKKT
I-TAC/CXCL11	107	R & D Systems 672-IT	O14625.1	FPMFKRGRCLCIGPVKAVKVDIE KASIMYPNNCDKIEVII TLKENKG QRCLNPKSKQARLI I K K V E R K N F

(continuación)

Quimioquina	SEQ ID	# de Catálogo	# de Acceso NCBI	Secuencia de aminoácido
<b>HUMANO</b>				
SDF-1/CXCL12	108	R & D Systems 350-NS	P48061.1; Q9H554	KPVSLSYRCPRCRFFEFESHVARANVKH LKILNTPNCALQIVARLKNNNRQVC IDPKLKIWEYLEKALNK
BCA-1/BLC/CXC L13	109	R & D Systems 801-CX	043927.1; Q53X90	VLEVYYTSLRRCRCVQESSVFIPRRF IDRIQILPRNGCPRKEIIVWKKNK SIVCVDPPQAEWIQRMMEVLRKRSSS TLPVPVFKRKIP
CXCL 16	110	R & D Systems 976-CX	Q9H2A7.4	NEGSVTGSCYCGKRISSDSPSPVQF MNRLLRKHRLRAYHRCLYYTRFQLLSW SVCGGNKDPWVQELMSCLDLKECGH AYSGIVAHQKHLLP
BRAK/CXC L14	111	R & D Systems 866-CX	095715.1	SKKCSRKGPKIRYSDVKKLEMKPK YPHCEEKMWIITTKSVSRYRQGEHC LHPKLQSTKRFIKWYNANNEKRRVY EE
<b>RATÓN</b>				
MIP-1 $\alpha$ /CCL3	112	R & D Systems 450-MA	P10855.2	APYGADTPTACCFSSYSRKIPRQFI VDYFETSSLCSQPGVIFLTKRNR QICADSKETWVQEYITDLELNA
MIP-1 $\beta$ /CCL4	113	R & D Systems 451-MA	P14097.3	APMGSDPPTSCCFYSYTSRQLHRS FVMDYETSSLCSKPAVVFLTKR GRQICANPSEPWVTEYMSDLELN
RANTES/CC L5	114	R & D Systems 478-MR	P30882.2	SPYGSDDTTPCCFAYLSLALPRAH VKEYFYTSSKCSNLA VVFV TRNRQVCANPEKKWVQEYINY LEMS

(continuación)

RATÓN				
MCP-1/CCL2	115	R & D Systems 479-JE	81870303; Q5SVU3	QPDVAVNAPLTCYYSFTSKMIPMSRL ESYKRI TSSRCPKEAVFVTKLKRE VCADPKKEWQTYIKNLDRNQMRSE PTTLFKTASALRSSAPLNVKLTTRKS EANASTTFSTTTSSTSVGVTSVTVN
MCP-5/CCL12	116	R & D Systems 428-P5	Q62401.1	GPDAVSTPVTCYNNVVKQKIHV RKLSYRRITSSQCPREAVIFRTIL DKEICADPKEKWVKNSINHLDK TSQIFILEPSCLG
VIRUS DE LA VIRUELA				
vCCI	117	N/A	NP_620006.1	MKQIVLACICLAAVAIPTSLQQSFS SSSSCTEENKHHMGIDVVIKVTKQ DQTPNDKICQSVTEVTESEDESEE VVKGDPTTYTVVGGGLTMDFGFTK CPKISSISEYSDGNTVNARLSSVSP GQKDSPAITREALSMIKDCEMSI NIKCEEEKDSNIKTHPVLGNSISH KKVSYEDI IGSTIVDTKCVKNLEIS VRIGDMCKESSELEVKDGFKYVDGS ASEDAADDTSLSINSAKLIACV

Tabla 5. Aminoácidos de fuerte similitud

Aminoácido	Aminoácido Similar
A	G,S,T
D	E
E	D
F	W,Y,H
G	A,S,T
H	Y,F,W
I	L,M,W
K	R
L	I,M,V
M	I,L, V
N	Q
Q	N
R	K
S	A,T,G
T	S,G,A
V	I,L,M
W	F,Y,H
Y	F,H,W

## Depósitos de hibridoma

- 5 Líneas celulares de hibridoma 3C12F, 7D12A, 7D1G, 18V4F y 18P7E fueron depositados el 12 de agosto de 2010 en el American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, Virginia 20110-2209, Estados Unidos de América, bajo los siguientes números de acceso

Hibridoma de Ratón	Número de Acceso ATCC
3C12F	PTA-11261
7D12A	PTA-11259
7D1G	PTA-11257
18V4F	PTA-11260
18P7E	PTA-11258

## Modificaciones y otras realizaciones

Aunque la invención se ha descrito en relación con realizaciones específicas, debe entenderse que la invención reivindicada no pretende estar limitada a tales realizaciones específicas.

Listado de secuencias

<110> VLST CORPORATION Allison, Dan Raport, Carol

5 <120> Anticuerpos Multiquina que se enlazan a CC Quimioquinas CC múltiples

<130> 366369WO

<150> US 61/238,015

<151> 2009-08-28

<160> 117

10 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 357

<212> ADN

<213> Mus musculus

15 <220>

<221> CDS

<222> (1) .. (357)

<223> Secuencia de codificación para 3C12F VH

<400> 1

ES 2 531 561 T3

gag gtt cag ctg cag cag tct ggg gca gag ctt gtg aag cca ggg gcc	48
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala	
1 5 10 15	
tca gtc aag ttg tcc tgc aca gct tct ggc ttc aac att aaa gac acc	96
Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr	
20 25 30	
tat ata cac tgg gtg aag cag agg cct gaa cag ggc ctg gag tgg att	144
Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile	
35 40 45	
gga agg att gat cct gcg aat ggt aat act caa tat gac ccg aag ttc	192
Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Gln Tyr Asp Pro Lys Phe	
50 55 60	
cag ggc aag gcc act ata aca gca gac aca tcc tcc aac aca gcc tac	240
Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr	
65 70 75 80	
ctg cag ctc acc agc ctg aca tct gag gac act gcc gtc tat tac tgt	288
Leu Gln Leu Thr Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
85 90 95	
gct aga agg tgg gat tac gac tat gct atg gac tac tgg ggt caa gga	336
Ala Arg Arg Trp Asp Tyr Asp Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly	
100 105 110	
acc tca gtc acc gtc tcc tca	357
Thr Ser Val Thr Val Ser Ser	
115	

<210> 2

<211> 119

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 2

ES 2 531 561 T3

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Arg Trp Asp Tyr Asp Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (1)..(5)

<223> VH CDR1 de 3C12F

10 <400> 3

Asp Thr Tyr Ile His  
1 5

<210> 4

<211> 17

<212> PRT

15 <213> Mus musculus

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

ES 2 531 561 T3

<222> (1)..(17)

<223> VH CDR2 de 3C12F

<400> 4

**Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Gln Tyr Asp Pro Lys Phe Gln**  
**1 5 10 15**

**Gly**

5 <210> 5

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

10 <221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (1)..(10)

<223> VH CDR3 de 3C12F

<400> 5

**Arg Trp Asp Tyr Asp Tyr Ala Met Asp Tyr**  
**1 5 10**

15 <210> 6

<211> 321

<212> ADN

<213> Mus musculus

<220>

20 <221> CDS

<222> (1)..(321)

<223> Secuencia de codificación para 3C12F VL

<400> 6

ES 2 531 561 T3

gac atc cag atg act cag tct cca gcc tcc cta tct gca tct gtg gga	48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly	
1 5 10 15	
gaa act gtc acc atc aca tgt cga gga agt ggg aat att cac aat tat	96
Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Gly Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr	
20 25 30	
tta gca tgg tat cag cag aaa cag gga aaa tct cct cag ctc ctg gtc	144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val	
35 40 45	
tat aat gca aaa acc tta gca gat ggt gtg cca tca agg ttc agt ggc	192
Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly	
50 55 60	
agt gga tca gga aca caa tat tct ctc aag atc aac agc ctg cag cct	240
Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro	
65 70 75 80	
gaa gat ttt ggg agt tat tac tgt caa cat ttt tgg agt act ccg tac	288
Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Thr Pro Tyr	
85 90 95	
acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa	321
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	
100 105	

<210> 7

<211> 107

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 7

ES 2 531 561 T3

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

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

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

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

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

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

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

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (1)..(11)

<223> VL CDR1 de 3C12F

10 <400> 8

Arg Gly Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr Leu Ala  
 1 5 10

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

15 <213> Mus musculus

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (1) .. (7)

<223> VL CDR2 de 3C12F

ES 2 531 561 T3

<400> 9

**Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp**  
**1 5**

<210> 10

<211> 9

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (1)..(9)

10 <223> VL CDR3 de 3C12F

<400> 10

**Gln His Phe Trp Ser Thr Pro Tyr Thr**  
**1 5**

<210> 11

<211> 354

15 <212> ADN

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(354)

20 <223> Secuencia de codificación para 7D12A VH

<400> 11

<b>gag gtg cat ctt cag gag tca gga cct agc ctc gtg aaa cct tct cag</b>	<b>48</b>
<b>Glu Val His Leu Gln Glu Ser Gly Pro Ser Leu Val Lys Pro Ser Gln</b>	
<b>1 5 10 15</b>	
<b>act ctg tcc ctc acc tgt tct gtc act ggc gac tcc atc acc aat ggt</b>	<b>96</b>
<b>Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Ile Thr Asn Gly</b>	
<b>20 25 30</b>	
<b>tac tgg aac tgg atc cgg aaa ttc cca ggg aat aaa ctt gac tac atg</b>	<b>144</b>
<b>Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys Phe Pro Gly Asn Lys Leu Asp Tyr Met</b>	
<b>35 40 45</b>	
<b>gga tac ata agc tac gat ggt aac act tac tac aat cca tct ctc aaa</b>	<b>192</b>
<b>Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys</b>	
<b>50 55 60</b>	
<b>agt cga ttc tcc atc act cga gac aca tcc aag aac cag tac tac ctg</b>	<b>240</b>
<b>Ser Arg Phe Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Tyr Leu</b>	
<b>65 70 75 80</b>	



ES 2 531 561 T3

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (1)..(5)

<223> VH CDR1 de 7D12A

5 <400> 13

**Asn Gly Tyr Trp Asn**  
**1 5**

<210> 14

<211> 16

<212> PRT

10 <213> Mus musculus

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (1)..(16)

<223> VH CDR2 de 7D12A

15 <400> 14

**Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser**  
**1 5 10 15**

<210> 15

<211> 10

<212> PRT

20 <213> Mus musculus

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (1)..(10)

<223> VH CDR3 de 7D12A

25 <400> 15

**Gly Asp Tyr Gly Thr Tyr Val Met Asp Tyr**  
**1 5 10**

<210> 16

<211> 333

<212> ADN

30 <213> Mus musculus

<220>

ES 2 531 561 T3

<221> CDS

<222> (1)..(333)

<223> Secuencia de codificación para 7D12A VL

<400> 16

	aac att gtg ctg acc caa tct cca gtt tct ttg gct gtg tct cta ggg	48
	Asn Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Val Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly	
	1 5 10 15	
	cag agg gcc acc att tcc tgc aga gcc agt gaa agt gtt gat agt cat	96
	Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser His	
	20 25 30	
	ggc aat agt ttt atg cac tgg tac cag cag aaa ccg gga cag cca ccc	144
	Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro	
	35 40 45	
5	aaa ctc ctc atc tat ctt gca tcc aac cta gag tct ggg gtc cct gcc	192
	Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala	
	50 55 60	
	agg ttc act ggc ggt ggg tct ggg tca gac ttc acc ctg acc att gac	240
	Arg Phe Thr Gly Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp	
	65 70 75 80	
	cct gtg gag gct gat gat gtt gga aca tat tac tgt cag caa aat aat	288
	Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn	
	85 90 95	
	gag gat ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa	333
	Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	
	100 105 110	

<210> 17

<211> 111

<212> PRT

10 <213> Mus musculus

<400> 17

ES 2 531 561 T3

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser His  
20 25 30

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

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

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

Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn  
85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105 110

<210> 18

<211> 15

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (1)..(15)

<223> VL CDR1 de 7D12A

10 <400> 18

Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser His Gly Asn Ser Phe Met His  
1 5 10 15

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

15 <213> Mus musculus

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (1)..(7)

ES 2 531 561 T3

<223> VL CDR2 de 7D12A

<400> 19

**Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser**  
**1 5**

<210> 20

5 <211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

10 <222> (1)..(9)

<223> VL CDR3 de 7D12A

<400> 20

**Gln Gln Asn Asn Glu Asp Pro Tyr Thr**  
**1 5**

<210> 21

15 <211> 345

<212> ADN

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

20 <222> (1)..(345)

<223> Secuencia de codificación para 7D1G VH

<400> 21

**cag gtg cag ctg cag cag cct ggg gct gag ctg gtg aag cct ggg gcc 48**  
**Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala**  
**1 5 10 15**

**tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct ggc tac aca ttt acc agt tac 96**  
**Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr**  
**20 25 30**

**aat ata cac tgg gta aag cag aca cct gga cag ggc ctg gaa tgg att 144**  
**Asn Ile His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile**

ES 2 531 561 T3

35	40	45	
gga gct gtt tct cca cga aat ggt gat act tcc tac aat cag agg ttc			192
Gly Ala Val Ser Pro Arg Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Arg Phe			
50	55	60	
aaa ggc aag gcc aca ttg act gca gac att tcc tcc agc aca gcc tac			240
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Ile Ser Ser Ser Thr Ala Tyr			
65	70	75	80
atg cag ctc agc agc ctg aca tct gag gac tct gcg gtc tat tac tgt			288
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys			
	85	90	95
gca aga ggg tat ggt tac gac tac tgg ggc caa ggc acc act ctc aca			336
Ala Arg Gly Tyr Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr			
	100	105	110
gtc tcc tca			345
Val Ser Ser			
115			

<210> 22

<211> 115

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 22

ES 2 531 561 T3

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

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

Asn Ile His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

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

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Ile Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

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

Val Ser Ser  
 115

<210> 23

<211> 5

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (1) .. (5)

<223> VH CDR1 de 7D1G

10 <400> 23

Ser Tyr Asn Ile His  
 1 5

<210> 24

<211> 17

<212> PRT

15 <213> Mus musculus

<220>

ES 2 531 561 T3

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (1)..(17)

<223> VH CDR2 de 7D1G

<400> 24

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

5

**Gly**

<210> 25

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus musculus

10

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (1)..(6)

<223> VH CDR3 de 7D1G

<400> 25

15

Gly Tyr Gly Tyr Asp Tyr  
1 5

<210> 26

<211> 321

<212> ADN

<213> Mus musculus

20

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (321)

<223> Secuencia de codificación para 7D1G VL

<400> 26

ES 2 531 561 T3

gat gtt gtg cta act cag tct cca gcc acc ctg tct gtg act cca gga	48
Asp Val Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly	
1 5 10 15	
gat aga gtc agt ctt tcc tgc agg gcc agt caa agt gtt agc aag tac	96
Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Lys Tyr	
20 25 30	
cta cac tgg tat caa caa aaa tca cat gag tct cca agg ctt ctc atc	144
Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile	
35 40 45	
aag tat gtt tcc cag tcc atc tct ggg atc ccc tcc agg ttc agt ggc	192
Lys Tyr Val Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly	
50 55 60	
agt gga tca ggg aca gat ttc act ctc agt atc aac agt gtg gag act	240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Thr	
65 70 75 80	
gaa gat ttg gga atg tat ttc tgt caa cag agt aac agc tgg cct cac	288
Glu Asp Leu Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro His	
85 90 95	
acg ttc ggt gct ggg acc aag ctg gag ctg aaa	321
Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys	
100 105	

<210> 27

<211> 107

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 27

ES 2 531 561 T3

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

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

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile  
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Thr  
65 70 75 80

Glu Asp Leu Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro His  
85 90 95

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

<210> 28

<211> 11

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (1) .. (11)

<223> VL CDR1 de 7D1G

10 <400> 28

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Lys Tyr Leu His  
1 5 10

<210> 29

<211> 7

<212> PRT

15 <213> Mus musculus

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (1)..(7)

ES 2 531 561 T3

<223> VL CDR2 de 7D1G

<400> 29

**Tyr Val Ser Gln Ser Ile Ser**  
**1 5**

<210> 30

5 <211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

10 <222> (1)..(9)

<223> VL CDR3 de 7D1G

<400> 30

**Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro His Thr**  
**1 5**

<210> 31

15 <211> 360

<212> ADN

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

20 <222> (1)..(360)

<223> Secuencia de codificación para MAb 18V4F VH

<400> 31

ES 2 531 561 T3

cag gtg cag ctg aag gag tca gga cct ggc ctg gtg gcg ccc tca cag 48  
 Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln  
 1 5 10 15  
 agc ctg tcc atc act tgc act gtc tct ggg ttt tca tta acc ggc tat 96  
 Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Gly Tyr  
 20 25 30  
 ggt ata cac tgg gtt cgc cag cct cca gga aag ggt ctg gag tgg ctg 144  
 Gly Ile His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu  
 35 40 45  
 gga gta ata tgg cct ggt gga ggc aca aat tat aat tcg gct ctc atg 192  
 Gly Val Ile Trp Pro Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met  
 50 55 60  
 tcc aga ctg agc atc agc aaa gac aac tcc aag agc caa gtt ttc tta 240  
 Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu  
 65 70 75 80  
 aaa atg aac agt ctg caa act gat gac aca gcc atg tac tac tgt gcc 288  
 Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala  
 85 90 95  
 aga ggt ccc ctt att act acg gaa gtt tct atg gac tac tgg ggt caa 336  
 Arg Gly Pro Leu Ile Thr Thr Glu Val Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110  
 gga acc tcg gtc acc gtc tcc tca 360  
 Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 32

<211> 120

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 32

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

ES 2 531 561 T3

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

Arg Gly Pro Leu Ile Thr Thr Glu Val Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 33

<211> 7

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (1)..(7)

<223> MAb 18V4F VH CDR1

10 <400> 33

Gly Phe Ser Leu Thr Gly Tyr  
1 5

<210> 34

<211> 14

<212> PRT

15 <213> Mus musculus

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (1)..(14)

<223> MAb 18V4F VH CDR 2

20 <400> 34

Trp Pro Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met Ser  
1 5 10

<210> 35

<211> 12

<212> PRT

25 <213> Mus musculus

<220>



ES 2 531 561 T3

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 37

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

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Asn Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser  
20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly  
35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe  
50 55 60

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

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

His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
100 105 110

5

<210> 38

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

10 <220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (1)..(11)

<223> MAb 18V4F VL CDR 1

<400> 38

15

Ser Asn Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr  
1 5 10

<210> 39

<211> 3

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (1)..(3)

5 <223> MAb 18V4F VL CDR 2

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<400> 39

**Gly Thr Asn**  
**1**

10 <210> 40

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

15 <221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (1)..(6)

<223> MAb 18V4F VL CDR3

<400> 40

**Trp Tyr Ser Asn His Trp**  
**1 5**

20 <210> 41

<211> 360

<212> ADN

<213> Mus musculus

<220>

25 <221> CDS

<222> (1)..(360)

<223> Región de codificación de MAb 18P7E VH

<400> 41

ES 2 531 561 T3

cag	gtg	cag	ctg	aag	gag	tca	gga	cct	ggc	ctg	gtg	gcg	ccc	tca	cag	48
Gln	Val	Gln	Leu	Lys	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Ala	Pro	Ser	Gln	
1				5					10					15		
agc	ctg	tcc	atc	act	tgc	act	gtc	tct	ggg	ttt	tca	tta	acc	ggc	tat	96
Ser	Leu	Ser	Ile	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Thr	Gly	Tyr	
			20					25					30			
ggt	ata	cac	tgg	gtt	cgc	cag	cct	cca	gga	aag	ggt	ctg	gag	tgg	ctg	144
Gly	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Leu	
		35					40					45				
gga	gta	ata	tgg	cct	ggt	gga	ggc	aca	aat	tat	aat	tcg	gct	ctc	atg	192
Gly	Val	Ile	Trp	Pro	Gly	Gly	Gly	Thr	Asn	Tyr	Asn	Ser	Ala	Leu	Met	
	50					55					60					
tcc	aga	ctg	aac	atc	agc	aaa	gac	aac	tcc	aag	agc	caa	gtt	ttc	tta	240
Ser	Arg	Leu	Asn	Ile	Ser	Lys	Asp	Asn	Ser	Lys	Ser	Gln	Val	Phe	Leu	
65					70					75					80	
aaa	atg	aac	agt	ctg	caa	act	gat	gac	aca	gcc	atg	tac	tac	tgt	gcc	288
Lys	Met	Asn	Ser	Leu	Gln	Thr	Asp	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys	Ala	
				85					90					95		
aga	ggt	ccc	ctt	att	act	acg	gaa	gtt	tct	atg	gac	tac	tgg	ggt	caa	336
Arg	Gly	Pro	Leu	Ile	Thr	Thr	Glu	Val	Ser	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	
			100					105					110			
gga	acc	tcg	gtc	acc	gtc	tcc	tca									360
Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser									
		115					120									

<210> 42

<211> 120

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 42

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

ES 2 531 561 T3

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

<210> 43

<211> 7

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (1)..(7)

<223> MAb 18P7E VH CDR1

10 <400> 43

Gly Phe Ser Leu Thr Gly Tyr  
1 5

<210> 44

<211> 14

<212> PRT

15 <213> Mus musculus

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (1)..(14)

# ES 2 531 561 T3

<223> MAb 18P7E VH CDR2

<400> 44

**Trp Pro Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met Ser**  
**1 5 10**

<210> 45

5 <211> 12

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

10 <222> (1) .. (12)

<223> MAb 18P7E VH CDR3

<400> 45

**Gly Pro Leu Ile Thr Thr Glu Val Ser Met Asp Tyr**  
**1 5 10**

<210> 46

15 <211> 330

<212> ADN

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

20 <222> (1) .. (330)

<223> Secuencia de código del MAb 18P7E VL

<400> 46

ES 2 531 561 T3

cag gct gtt gtg act cag gaa tct gca ctc acc aca tca cct ggt gaa	48
Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu	
1 5 10 15	
aca gtc aca ctc act tgt cgc tca aat act ggg gct gtt aca act agt	96
Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Asn Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser	
20 25 30	
aac tat gcc aac tgg gtc caa gaa aaa cca gat cat tta ttc act ggt	144
Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly	
35 40 45	
cta ata ggt ggt acc aac aac cga gct cca ggt gtt cct gcc aga ttc	192
Leu Ile Gly Gly Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe	
50 55 60	
tca ggc tcc ctg att gga gac aag gct gcc ctc acc atc aca ggg gca	240
Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala	
65 70 75 80	
cag act gag gat gag gca ata tat ttc tgt gct cta tgg tac agc aac	288
Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn	
85 90 95	
cat tgg gtg ttc ggt gga gga acc aaa ctg act gtc cta ggc	330
His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly	
100 105 110	

<210> 47

<211> 110

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 47

ES 2 531 561 T3

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

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Asn Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser  
 20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly  
 35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe  
 50 55 60

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

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

His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
 100 105 110

<210> 48

<211> 11

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (1)..(11)

<223> MAb 18P7E VL CDR1

10 <400> 48

Ser Asn Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr  
 1 5 10

<210> 49

<211> 3

<212> PRT

15 <213> Mus musculus

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (1)..(3)

<223> MAb 18P7E VL CDR2

<220>

<400> 49

**Gly Thr Asn**  
**1**

5 <210> 50

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

10 <221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (1) .. (6)

<223> MAb 18P7E VL CDR3

<400> 50

**Trp Tyr Ser Asn His Trp**  
**1 5**

15 <210> 51

<211> 357

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Versión humanizada de MAb 3C12F

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(357)

<223> Secuencia de codificación de MAb 3C12F VH humanizado

25 <400> 51

ES 2 531 561 T3

gag	gtg	cag	ctg	gtg	cag	tct	gga	gca	gag	gtg	aaa	aag	ccc	ggg	gag	48
Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu	
1			5				10						15			
tct	ctg	aag	atc	tcc	tgt	aag	ggt	tct	gga	ttc	aac	att	aaa	gac	acc	96
Ser	Leu	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Gly	Ser	Gly	Phe	Asn	Ile	Lys	Asp	Thr	
		20					25					30				
tat	ata	cac	tgg	gtg	cgc	cag	atg	ccc	ggg	aaa	ggc	ctg	gag	tgg	att	144
Tyr	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Met	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	
		35				40						45				
ggg	agg	att	gat	cct	gcg	aat	ggt	aat	act	caa	tat	gac	ccg	aag	ttc	192
Gly	Arg	Ile	Asp	Pro	Ala	Asn	Gly	Asn	Thr	Gln	Tyr	Asp	Pro	Lys	Phe	
	50					55				60						
cag	ggc	aag	gcc	acc	atc	tca	gcc	gac	aca	tcc	atc	agc	acc	gcc	tac	240
Gln	Gly	Lys	Ala	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr	
65					70					75					80	
ctg	cag	tgg	agc	agc	ctg	aag	gcc	tcg	gac	acc	gcc	atg	tat	tac	tgt	288
Leu	Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys	
				85					90					95		
gcg	aga	agg	tgg	gat	tac	gac	tat	gct	atg	gac	tac	tgg	ggg	caa	ggg	336
Ala	Arg	Arg	Trp	Asp	Tyr	Asp	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	
			100				105						110			
acc	acg	gtc	acc	gtc	tcc	tca										357
Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser										
		115														

<210> 52

<211> 119

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Constructo Sintético

<400> 52

ES 2 531 561 T3

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

<210> 53

<211> 5

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> MAb 3C12F VH CDR1 humanizado

<400> 53

Asp Thr Tyr Ile His  
 1 5

10 <210> 54

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> MAb 3C12F VH CDR2 humanizado

ES 2 531 561 T3

<400> 54

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

Gly

<210> 55

<211> 10

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> MAb 3C12F VH CDR3 humanizado

<400> 55

Arg Trp Asp Tyr Asp Tyr Ala Met Asp Tyr  
 1 5 10

10

<210> 56

<211> 321

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Secuencia de codificación de MAb 3C12F VL humanizado

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (321)

20 <400> 56

gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga 48  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

gac aga gtc acc atc act tgc cga gga agt ggg aat att cac aat tat 96  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Gly Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr  
 20 25 30

tta gca tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg gtc 144  
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Val  
 35 40 45

tat aat gca aaa acc tta gca gat ggg gtc cca tca agg ttc agt ggc 192  
 Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

agt gga tct ggg aca gat tac act ctc acc atc agc agt ctg caa cct 240

ES 2 531 561 T3

```

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                               70                               75                               80
gaa gat ttt gca act tac tac tgt caa cat ttt tgg agt act ccg tac      288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Thr Pro Tyr
                               85                               90                               95
acg ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa      321
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
                               100                               105

```

<210> 57

<211> 107

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Constructo Sintético

<400> 57

```

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

```

10 <210> 58

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

ES 2 531 561 T3

<223> MAb 3C12F VL CDR1 humanizado

<400> 58

**Arg Gly Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr Leu Ala**  
**1 5 10**

<210> 59

5 <211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> MAb 3C12F VL CDR2 humanizado

10 <400> 59

**Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp**  
**1 5**

<210> 60

<211> 9

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> MAb 3C12F VL CDR3 humanizado

<400> 60

**Gln His Phe Trp Ser Thr Pro Tyr Thr**  
**1 5**

20 <210> 61

<211> 360

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Secuencia de codificación de MAb 18V4F VH humanizado

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(360)

<400> 61

ES 2 531 561 T3

<b>gaa gtt cag ctg gtg gaa tct ggt ggt ggt ctg gtt caa cct ggc ggc</b>	<b>48</b>
<b>Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly</b>	
<b>1 5 10 15</b>	
<b>tct ctg cgt ctg tcc tgc gct gcc tcc ggt ttc tct ctg acc ggc tac</b>	<b>96</b>
<b>Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Gly Tyr</b>	
<b>20 25 30</b>	
<b>gca atg cac tgg gtt cgc cag gcc ccg ggt aaa ggc ctg gaa tgg gtt</b>	<b>144</b>
<b>Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val</b>	
<b>35 40 45</b>	
<b>ggt gtt atc tgg ccg ggt ggc ggt act aat tac aac tcc gcg ctg atg</b>	<b>192</b>
<b>Gly Val Ile Trp Pro Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met</b>	
<b>50 55 60</b>	
<b>agc cgt ttt acc atc tcc aag gac aat tcc aaa aac acc gtt tac ctg</b>	<b>240</b>
<b>Ser Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu</b>	
<b>65 70 75 80</b>	
<b>cag atg aac tcc ctg cgt gct gaa gat act gct gtg tac tac tgt gct</b>	<b>288</b>
<b>Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala</b>	
<b>85 90 95</b>	
<b>cgt ggt cca ctg atc acc acc gaa gtg agc atg gac tat tgg ggc caa</b>	<b>336</b>
<b>Arg Gly Pro Leu Ile Thr Thr Glu Val Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln</b>	
<b>100 105 110</b>	
<b>ggt acg ctg gtc acc gtt agc tct</b>	<b>360</b>
<b>Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser</b>	
<b>115 120</b>	

<210> 62

<211> 120

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Constructo Sintético

<400> 62

ES 2 531 561 T3

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 Ser Leu Thr Gly Tyr  
 20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Pro Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met  
 50 55 60

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

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

Arg Gly Pro Leu Ile Thr Thr Glu Val Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 63

<211> 7

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> MAb 18V4F VH CDR1 humanizado

<400> 63

Gly Phe Ser Leu Thr Gly Tyr  
 1 5

10 <210> 64

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> MAb 18V4F VH CDR2 humanizado

<400> 64

ES 2 531 561 T3

**Trp Pro Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met Ser**  
**1 5 10**

<210> 65

<211> 12

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> MAb 18V4F VH CDR3 humanizado

<400> 65

**Gly Pro Leu Ile Thr Thr Glu Val Ser Met Asp Tyr**  
**1 5 10**

10 <210> 66

<211> 330

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Secuencia de codificación de MAb 18V4F VL humanizado

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(330)

<223> Secuencia de codificación de MAb 18V4F VL humanizado

20 <400> 66

ES 2 531 561 T3

tct gcg gaa gtt acc cag cct ccg tct gtg agc gta tct ccg ggt cag	48
Ser Ala Glu Val Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln	
1 5 10 15	
acc gcg cgc atc acg tgt tcc tct aac acg ggc gca gtt acg act agc	96
Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Ser Asn Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser	
20 25 30	
aac tat gct aac tgg gtt caa cag aag ccg ggc cag gct ccg gtg ggt	144
Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Gly	
35 40 45	
ctg att ggt ggc acg aac gag cgt ccg agc ggc att cca gaa cgt ttt	192
Leu Ile Gly Gly Thr Asn Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe	
50 55 60	
tct ggc agc tct tct ggt aac act gcg acc ctg acc atc tct ggc gct	240
Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Ala	
65 70 75 80	
cag gct gaa gac gaa gcg gat tac tac tgc gcg ctg tgg tac agc aac	288
Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn	
85 90 95	
cac tgg gta ttc ggc ggt ggt acc aaa ctg act gtg ctg ggc	330
His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly	
100 105 110	

<210> 67

<211> 110

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Constructo Sintético

<400> 67

ES 2 531 561 T3

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

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Ser Asn Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser  
20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Gly  
35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe  
50 55 60

Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Ala  
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn  
85 90 95

His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
100 105 110

<210> 68

<211> 11

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> MAb 18V4F VL CDR1 humanizado

<400> 68

Ser Asn Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr  
1 5 10

10 <210> 69

<211> 3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> MAb 18V4F VL CDR2 humanizado

<400> 69

Gly Thr Asn  
1

<210> 70

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> MAb 18V4F VL CDR3 humanizado

<400> 70

**Ala Leu Trp Tyr Ser Asn His Trp**  
**1 5**

<210> 71

10 <211> 70

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

15 <222> (1) .. (70)

<223> MIP1-alpha humano, CCL3

<400> 71

**Ala Ser Leu Ala Ala Asp Thr Pro Thr Ala Cys Cys Phe Ser Tyr Thr**  
**1 5 10 15**

**Ser Arg Gln Ile Pro Gln Asn Phe Ile Ala Asp Tyr Phe Glu Thr Ser**  
**20 25 30**

**Ser Gln Cys Ser Lys Pro Gly Val Ile Phe Leu Thr Lys Arg Ser Arg**  
**35 40 45**

**Gln Val Cys Ala Asp Pro Ser Glu Glu Trp Val Gln Lys Tyr Val Ser**  
**50 55 60**

**Asp Leu Glu Leu Ser Ala**  
**65 70**

<210> 72

20 <211> 69

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (1)..(69)

<223> MIP1-beta humano, CCL4

5 <400> 72

Ala Pro Met Gly Ser Asp Pro Pro Thr Ala Cys Cys Phe Ser Tyr Thr  
1 5 10 15

Ala Arg Lys Leu Pro His Asn Phe Val Val Asp Tyr Tyr Glu Thr Ser  
20 25 30

Ser Leu Cys Ser Gln Pro Ala Val Val Phe Gln Thr Lys Arg Gly Lys  
35 40 45

Gln Val Cys Ala Asp Pro Ser Glu Ser Trp Val Gln Glu Tyr Val Tyr  
50 55 60

Asp Leu Glu Leu Asn  
65

<210> 73

<211> 68

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (1)..(68)

<223> RANTES humano, CCL5

15 <400> 73

ES 2 531 561 T3

Ser Pro Tyr Ser Ser Asp Thr Thr Pro Cys Cys Phe Ala Tyr Ile Ala  
1 5 10 15

Arg Pro Leu Pro Arg Ala His Ile Lys Glu Tyr Phe Tyr Thr Ser Gly  
20 25 30

Lys Cys Ser Asn Pro Ala Val Val Phe Val Thr Arg Lys Asn Arg Gln  
35 40 45

Val Cys Ala Asn Pro Glu Lys Lys Trp Val Arg Glu Tyr Ile Asn Ser  
50 55 60

Leu Glu Met Ser

65

<210> 74

<211> 76

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (1)..(76)

<223> MCP-1 humano, CCL2

10 <400> 74

Gln Pro Asp Ala Ile Asn Ala Pro Val Thr Cys Cys Tyr Asn Phe Thr  
1 5 10 15

Asn Arg Lys Ile Ser Val Gln Arg Leu Ala Ser Tyr Arg Arg Ile Thr  
20 25 30

Ser Ser Lys Cys Pro Lys Glu Ala Val Ile Phe Lys Thr Ile Val Ala  
35 40 45

Lys Glu Ile Cys Ala Asp Pro Lys Gln Lys Trp Val Gln Asp Ser Met  
50 55 60

Asp His Leu Asp Lys Gln Thr Gln Thr Pro Lys Thr  
65 70 75

<210> 75

<211> 76

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

5 <221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (1)..(76)

<223> MCP-2 humano, CCL8

<400> 75

**Gln Pro Asp Ser Val Ser Ile Pro Ile Thr Cys Cys Phe Asn Val Ile**  
**1 5 10 15**

**Asn Arg Lys Ile Pro Ile Gln Arg Leu Glu Ser Tyr Thr Arg Ile Thr**  
**20 25 30**

**Asn Ile Gln Cys Pro Lys Glu Ala Val Ile Phe Lys Thr Lys Arg Gly**  
**35 40 45**

**Lys Glu Val Cys Ala Asp Pro Lys Glu Arg Trp Val Arg Asp Ser Met**  
**50 55 60**

**Lys His Leu Asp Gln Ile Phe Gln Asn Leu Lys Pro**  
**65 70 75**

10 <210> 76

<211> 76

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

15 <221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (1)..(76)

<223> MCP-3 humano, CCL7

<400> 76

Gln Pro Val Gly Ile Asn Thr Ser Thr Thr Cys Cys Tyr Arg Phe Ile  
 1 5 10 15

Asn Lys Lys Ile Pro Lys Gln Arg Leu Glu Ser Tyr Arg Arg Thr Thr  
 20 25 30

Ser Ser His Cys Pro Arg Glu Ala Val Ile Phe Lys Thr Lys Leu Asp  
 35 40 45

Lys Glu Ile Cys Ala Asp Pro Thr Gln Lys Trp Val Gln Asp Phe Met  
 50 55 60

Lys His Leu Asp Lys Lys Thr Gln Thr Pro Lys Leu  
 65 70 75

<210> 77

<211> 75

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (1)..(75)

<223> MCP-4 humano, CCL13

10 <400> 77

Gln Pro Asp Ala Leu Asn Val Pro Ser Thr Cys Cys Phe Thr Phe Ser  
 1 5 10 15

Ser Lys Lys Ile Ser Leu Gln Arg Leu Lys Ser Tyr Val Ile Thr Thr  
 20 25 30

Ser Arg Cys Pro Gln Lys Ala Val Ile Phe Arg Thr Lys Leu Gly Lys  
 35 40 45

Glu Ile Cys Ala Asp Pro Lys Glu Lys Trp Val Gln Asn Tyr Met Lys  
 50 55 60

His Leu Gly Arg Lys Ala His Thr Leu Lys Thr  
 65 70 75

<210> 78

<211> 66

ES 2 531 561 T3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

5 <222> (1)..(66)

<223> HCC-1/CCL14a humano

<400> 78

**Gly Pro Tyr His Pro Ser Glu Cys Cys Phe Thr Tyr Thr Thr Tyr Lys**  
**1 5 10 15**

**Ile Pro Arg Gln Arg Ile Met Asp Tyr Tyr Glu Thr Asn Ser Gln Cys**  
**20 25 30**

**Ser Lys Pro Gly Ile Val Phe Ile Thr Lys Arg Gly His Ser Val Cys**  
**35 40 45**

**Thr Asn Pro Ser Asp Lys Trp Val Gln Asp Tyr Ile Lys Asp Met Lys**  
**50 55 60**

**Glu Asn**  
**65**

<210> 79

10 <211> 68

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

15 <222> (1)..(68)

<223> HCC-2/MIP1-delta/CCL15 humano

<400> 79

ES 2 531 561 T3

Ser Phe His Phe Ala Ala Asp Cys Cys Thr Ser Tyr Ile Ser Gln Ser  
1 5 10 15

Ile Pro Cys Ser Leu Met Lys Ser Tyr Phe Glu Thr Ser Ser Glu Cys  
20 25 30

Ser Lys Pro Gly Val Ile Phe Leu Thr Lys Lys Gly Arg Gln Val Cys

35

40

45

Ala Lys Pro Ser Gly Pro Gly Val Gln Asp Cys Met Lys Lys Leu Lys  
50 55 60

Pro Tyr Ser Ile  
65

<210> 80

<211> 97

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (1)..(97)

<223> HCC-4 humano, CCL16

10 <400> 80

ES 2 531 561 T3

Gln Pro Lys Val Pro Glu Trp Val Asn Thr Pro Ser Thr Cys Cys Leu  
 1 5 10 15

Lys Tyr Tyr Glu Lys Val Leu Pro Arg Arg Leu Val Val Gly Tyr Arg  
 20 25 30

Lys Ala Leu Asn Cys His Leu Pro Ala Ile Ile Phe Val Thr Lys Arg  
 35 40 45

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

Ile Lys Asp Pro Asn Leu Pro Leu Leu Pro Thr Arg Asn Leu Ser Thr  
 65 70 75 80

Val Lys Ile Ile Thr Ala Lys Asn Gly Gln Pro Gln Leu Leu Asn Ser  
 85 90 95

**Gln**

<210> 81

<211> 75

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (1)..(75)

<223> MPIF-1 humano, CCL23

10 <400> 81

ES 2 531 561 T3

Arg Phe His Ala Thr Ser Ala Asp Cys Cys Ile Ser Tyr Thr Pro Arg  
 1 5 10 15

Ser Ile Pro Cys Ser Leu Leu Glu Ser Tyr Phe Glu Thr Asn Ser Glu  
 20 25 30

Cys Ser Lys Pro Gly Val Ile Phe Leu Thr Lys Lys Gly Arg Arg Phe  
 35 40 45

Cys Ala Asn Pro Ser Asp Lys Gln Val Gln Val Cys Met Arg Met Leu  
 50 55 60

Lys Leu Asp Thr Arg Ile Lys Thr Arg Lys Asn  
 65 70 75

<210> 82

<211> 69

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (1)..(69)

<223> PARC humano, CCL18

10 <400> 82

Ala Gln Val Gly Thr Asn Lys Glu Leu Cys Cys Leu Val Tyr Thr Ser  
 1 5 10 15

Trp Gln Ile Pro Gln Lys Phe Ile Val Asp Tyr Ser Glu Thr Ser Pro  
 20 25 30

Gln Cys Pro Lys Pro Gly Val Ile Leu Leu Thr Lys Arg Gly Arg Gln  
 35 40 45

Ile Cys Ala Asp Pro Asn Lys Lys Trp Val Gln Lys Tyr Ile Ser Asp  
 50 55 60

Leu Lys Leu Asn Ala  
 65

<210> 83

<211> 74

ES 2 531 561 T3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 83

```

      Gly Pro Ala Ser Val Pro Thr Thr Cys Cys Phe Asn Leu Ala Asn Arg
      1           5           10           15
Lys Ile Pro Leu Gln Arg Leu Glu Ser Tyr Arg Arg Ile Thr Ser Gly
      20           25           30
Lys Cys Pro Gln Lys Ala Val Ile Phe Lys Thr Lys Leu Ala Lys Asp
      35           40           45
Ile Cys Ala Asp Pro Lys Lys Lys Trp Val Gln Asp Ser Met Lys Tyr
      50           55           60
Leu Asp Gln Lys Ser Pro Thr Pro Lys Pro
      65           70

```

5

<210> 84

<211> 93

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 84

```

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

```

<210> 85

<211> 71

ES 2 531 561 T3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 85

Thr Arg Gly Ser Asp Ile Ser Lys Thr Cys Cys Phe Gln Tyr Ser His  
1 5 10 15

Lys Pro Leu Pro Trp Thr Trp Val Arg Ser Tyr Glu Phe Thr Ser Asn  
20 25 30

Ser Cys Ser Gln Arg Ala Val Ile Phe Thr Thr Lys Arg Gly Lys Lys  
35 40 45

Val Cys Thr His Pro Arg Lys Lys Trp Val Gln Lys Tyr Ile Ser Leu  
50 55 60

Leu Lys Thr Pro Lys Gln Leu  
65 70

5

<210> 86

<211> 69

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10 <400> 86

Gly Pro Tyr Gly Ala Asn Met Glu Asp Ser Val Cys Cys Arg Asp Tyr  
1 5 10 15

Val Arg Tyr Arg Leu Pro Leu Arg Val Val Lys His Phe Tyr Trp Thr  
20 25 30

Ser Asp Ser Cys Pro Arg Pro Gly Val Val Leu Leu Thr Phe Arg Asp  
35 40 45

Lys Glu Ile Cys Ala Asp Pro Arg Val Pro Trp Val Lys Met Ile Leu  
50 55 60

Asn Lys Leu Ser Gln  
65

<210> 87

<211> 71

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

ES 2 531 561 T3

<400> 87

Ala Arg Gly Thr Asn Val Gly Arg Glu Cys Cys Leu Glu Tyr Phe Lys  
1 5 10 15  
Gly Ala Ile Pro Leu Arg Lys Leu Lys Thr Trp Tyr Gln Thr Ser Glu  
20 25 30  
Asp Cys Ser Arg Asp Ala Ile Val Phe Val Thr Val Gln Gly Arg Ala  
35 40 45  
Ile Cys Ser Asp Pro Asn Asn Lys Arg Val Lys Asn Ala Val Lys Tyr  
50 55 60  
Leu Gln Ser Leu Glu Arg Ser  
65 70

<210> 88

5 <211> 70

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 88

Ala Ser Asn Phe Asp Cys Cys Leu Gly Tyr Thr Asp Arg Ile Leu His  
1 5 10 15  
Pro Lys Phe Ile Val Gly Phe Thr Arg Gln Leu Ala Asn Glu Gly Cys  
20 25 30  
Asp Ile Asn Ala Ile Ile Phe His Thr Lys Lys Lys Leu Ser Val Cys  
35 40 45  
Ala Asn Pro Lys Gln Thr Trp Val Lys Tyr Ile Val Arg Leu Leu Ser  
50 55 60  
Lys Lys Val Lys Asn Met  
65 70

10 <210> 89

<211> 77

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 89

ES 2 531 561 T3

Gly Thr Asn Asp Ala Glu Asp Cys Cys Leu Ser Val Thr Gln Lys Pro  
 1 5 10 15

Ile Pro Gly Tyr Ile Val Arg Asn Phe His Tyr Leu Leu Ile Lys Asp  
 20 25 30

Gly Cys Arg Val Pro Ala Val Val Phe Thr Thr Leu Arg Gly Arg Gln  
 35 40 45

Leu Cys Ala Pro Pro Asp Gln Pro Trp Val Glu Arg Ile Ile Gln Arg  
 50 55 60

Leu Gln Arg Thr Ser Ala Lys Met Lys Arg Arg Ser Ser  
 65 70 75

<210> 90

<211> 111

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 90

Ser Asp Gly Gly Ala Gln Asp Cys Cys Leu Lys Tyr Ser Gln Arg Lys  
 1 5 10 15

Ile Pro Ala Lys Val Val Arg Ser Tyr Arg Lys Gln Glu Pro Ser Leu  
 20 25 30

Gly Cys Ser Ile Pro Ala Ile Leu Phe Leu Pro Arg Lys Arg Ser Gln  
 35 40 45

Ala Glu Leu Cys Ala Asp Pro Lys Glu Leu Trp Val Gln Gln Leu Met  
 50 55 60

Gln His Leu Asp Lys Thr Pro Ser Pro Gln Lys Pro Ala Gln Gly Cys  
 65 70 75 80

Arg Lys Asp Arg Gly Ala Ser Lys Thr Gly Lys Lys Gly Lys Gly Ser  
 85 90 95

Lys Gly Cys Lys Arg Thr Glu Arg Ser Gln Thr Pro Lys Gly Pro  
 100 105 110

<210> 91

<211> 73

10 <212> PRT

ES 2 531 561 T3

<213> Homo sapiens

<400> 91

```
Lys Ser Met Gln Val Pro Phe Ser Arg Cys Cys Phe Ser Phe Ala Glu
 1          5          10          15

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

Ile Cys Ser Asn Glu Gly Leu Ile Phe Lys Leu Lys Arg Gly Lys Glu
 35          40          45

Ala Cys Ala Leu Asp Thr Val Gly Trp Val Gln Arg His Arg Lys Met
 50          55          60

Leu Arg His Cys Pro Ser Lys Arg Lys
 65          70
```

<210> 92

5 <211> 127

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 92

ES 2 531 561 T3

Gln Gly Val Phe Glu Asp Cys Cys Leu Ala Tyr His Tyr Pro Ile Gly  
 1 5 10 15

Trp Ala Val Leu Arg Arg Ala Trp Thr Tyr Arg Ile Gln Glu Val Ser  
 20 25 30

Gly Ser Cys Asn Leu Pro Ala Ala Ile Phe Tyr Leu Pro Lys Arg His  
 35 40 45

Arg Lys Val Cys Gly Asn Pro Lys Ser Arg Glu Val Gln Arg Ala Met  
 50 55 60

Lys Leu Leu Asp Ala Arg Asn Lys Val Phe Ala Lys Leu His His Asn  
 65 70 75 80

Met Gln Thr Phe Gln Ala Gly Pro His Ala Val Lys Lys Leu Ser Ser  
 85 90 95

Gly Asn Ser Lys Leu Ser Ser Ser Lys Phe Ser Asn Pro Ile Ser Ser  
 100 105 110

Ser Lys Arg Asn Val Ser Leu Leu Ile Ser Ala Asn Ser Gly Leu  
 115 120 125

<210> 93

<211> 88

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 93

ES 2 531 561 T3

Phe Leu Leu Pro Pro Ser Thr Ala Cys Cys Thr Gln Leu Tyr Arg Lys  
 1 5 10 15

Pro Leu Ser Asp Lys Leu Leu Arg Lys Val Ile Gln Val Glu Leu Gln  
 20 25 30

Glu Ala Asp Gly Asp Cys His Leu Gln Ala Phe Val Leu His Leu Ala  
 35 40 45

Gln Arg Ser Ile Cys Ile His Pro Gln Asn Pro Ser Leu Ser Gln Trp  
 50 55 60

Phe Glu His Gln Glu Arg Lys Leu His Gly Thr Leu Pro Lys Leu Asn  
 65 70 75 80

Phe Gly Met Leu Arg Lys Met Gly  
 85

<210> 94

<211> 105

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 94

Ile Leu Pro Ile Ala Ser Ser Cys Cys Thr Glu Val Ser His His Ile  
 1 5 10 15

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

Asp Gly Asp Cys Asp Leu Ala Ala Val Ile Leu His Val Lys Arg Arg  
 35 40 45

Arg Ile Cys Val Ser Pro His Asn His Thr Val Lys Gln Trp Met Lys  
 50 55 60

Val Gln Ala Ala Lys Lys Asn Gly Lys Gly Asn Val Cys His Arg Lys  
 65 70 75 80

Lys His His Gly Lys Arg Asn Ser Asn Arg Ala His Gln Gly Lys His  
 85 90 95

Glu Thr Tyr Gly His Lys Thr Pro Tyr  
 100 105

<210> 95

ES 2 531 561 T3

<211> 94

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 95

Met Val Gly Ser Glu Val Ser Asp Lys Arg Thr Cys Val Ser Leu Thr  
1 5 10 15

Thr Gln Arg Leu Pro Val Ser Arg Ile Lys Thr Tyr Thr Ile Thr Glu  
20 25 30

Gly Ser Leu Arg Ala Val Ile Phe Ile Thr Lys Arg Gly Leu Lys Val  
35 40 45

Cys Ala Asp Pro Gln Ala Thr Trp Val Arg Asp Val Val Arg Ser Met  
50 55 60

Asp Arg Lys Ser Asn Thr Arg Asn Asn Met Ile Gln Thr Lys Pro Thr  
65 70 75 80

5

Gly Thr Gln Gln Ser Thr Asn Thr Ala Val Thr Leu Thr Gly  
85 90

<210> 96

<211> 339

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 96

ES 2 531 561 T3

Met Ala Pro Ile Ser Leu Ser Trp Leu Leu Arg Leu Ala Thr Phe Cys  
1 5 10 15

His Leu Thr Val Leu Leu Ala Gly Gln His His Gly Val Thr Lys Cys  
20 25 30

Asn Ile Thr Cys Ser Lys Met Thr Ser Lys Ile Pro Val Ala Leu Leu  
35 40 45

Ile His Tyr Gln Gln Asn Gln Ala Ser Cys Gly Lys Arg Ala Ile Ile  
50 55 60

Leu Glu Thr Arg Gln His Arg Leu Phe Cys Ala Asp Pro Lys Glu Gln  
65 70 75 80

Trp Val Lys Asp Ala Met Gln His Leu Asp Arg Gln Ala Ala Ala Leu  
85 90 95

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

Arg Thr Thr Pro Ala Ala Gly Gly Met Asp Glu Ser Val Val Leu Glu  
115 120 125

Pro Glu Ala Thr Gly Glu Ser Ser Ser Leu Glu Pro Thr Pro Ser Ser  
130 135 140

Gln Glu Ala Gln Arg Ala Leu Gly Thr Ser Pro Glu Leu Pro Thr Gly  
145 150 155 160

Val Thr Gly Ser Ser Gly Thr Arg Leu Pro Pro Thr Pro Lys Ala Gln  
165 170 175

Asp Gly Gly Pro Val Gly Thr Glu Leu Phe Arg Val Pro Pro Val Ser  
180 185 190

Thr Ala Ala Thr Trp Gln Ser Ser Ala Pro His Gln Pro Gly Pro Ser  
195 200 205

ES 2 531 561 T3

Leu Trp Ala Glu Ala Lys Thr Ser Glu Ala Pro Ser Thr Gln Asp Pro  
 210 215 220

Ser Thr Gln Ala Ser Thr Ala Ser Ser Pro Ala Pro Glu Glu Asn Ala  
 225 230 235 240

Pro Ser Glu Gly Gln Arg Val Trp Gly Gln Gly Gln Ser Pro Arg Pro  
 245 250 255

Glu Asn Ser Leu Glu Arg Glu Glu Met Gly Pro Val Pro Ala His Thr  
 260 265 270

Asp Ala Phe Gln Asp Trp Gly Pro Gly Ser Met Ala His Val Ser Val  
 275 280 285

Val Pro Val Ser Ser Glu Gly Thr Pro Ser Arg Glu Pro Val Ala Ser  
 290 295 300

Gly Ser Trp Thr Pro Lys Ala Glu Glu Pro Ile His Ala Thr Met Asp  
 305 310 315 320

Pro Gln Arg Leu Gly Val Leu Ile Thr Pro Val Pro Asp Ala Gln Ala  
 325 330 335

Ala Thr Arg

<210> 97

<211> 72

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 97

ES 2 531 561 T3

Ser Ala Lys Glu Leu Arg Cys Gln Cys Ile Lys Thr Tyr Ser Lys Pro  
1 5 10 15

Phe His Pro Lys Phe Ile Lys Glu Leu Arg Val Ile Glu Ser Gly Pro  
20 25 30

His Cys Ala Asn Thr Glu Ile Ile Val Lys Leu Ser Asp Gly Arg Glu  
35 40 45

Leu Cys Leu Asp Pro Lys Glu Asn Trp Val Gln Arg Val Val Glu Lys  
50 55 60

Phe Leu Lys Arg Ala Glu Asn Ser  
65 70

<210> 98

<211> 73

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 98

Ala Ser Val Ala Thr Glu Leu Arg Cys Gln Cys Leu Gln Thr Leu Gln  
1 5 10 15

Gly Ile His Pro Lys Asn Ile Gln Ser Val Asn Val Lys Ser Pro Gly  
20 25 30

Pro His Cys Ala Gln Thr Glu Val Ile Ala Thr Leu Lys Asn Gly Arg  
35 40 45

Lys Ala Cys Leu Asn Pro Ala Ser Pro Ile Val Lys Lys Ile Ile Glu  
50 55 60

Lys Met Leu Asn Ser Asp Lys Ser Asn  
65 70

<210> 99

<211> 73

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 99

ES 2 531 561 T3

Ala Pro Leu Ala Thr Glu Leu Arg Cys Gln Cys Leu Gln Thr Leu Gln  
1 5 10 15

Gly Ile His Leu Lys Asn Ile Gln Ser Val Lys Val Lys Ser Pro Gly  
20 25 30

Pro His Cys Ala Gln Thr Glu Val Ile Ala Thr Leu Lys Asn Gly Gln  
35 40 45

Lys Ala Cys Leu Asn Pro Ala Ser Pro Met Val Lys Lys Ile Ile Glu  
50 55 60

Lys Met Leu Lys Asn Gly Lys Ser Asn  
65 70

<210> 100

<211> 73

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 100

Ala Ser Val Val Thr Glu Leu Arg Cys Gln Cys Leu Gln Thr Leu Gln  
1 5 10 15

Gly Ile His Leu Lys Asn Ile Gln Ser Val Asn Val Arg Ser Pro Gly  
20 25 30

Pro His Cys Ala Gln Thr Glu Val Ile Ala Thr Leu Lys Asn Gly Lys  
35 40 45

Lys Ala Cys Leu Asn Pro Ala Ser Pro Met Val Gln Lys Ile Ile Glu  
50 55 60

Lys Ile Leu Asn Lys Gly Ser Thr Asn  
65 70

<210> 101

<211> 78

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 101

ES 2 531 561 T3

Ala Gly Pro Ala Ala Ala Val Leu Arg Glu Leu Arg Cys Val Cys Leu  
 1 5 10 15

Gln Thr Thr Gln Gly Val His Pro Lys Met Ile Ser Asn Leu Gln Val  
 20 25 30

Phe Ala Ile Gly Pro Gln Cys Ser Lys Val Glu Val Val Ala Ser Leu  
 35 40 45

Lys Asn Gly Lys Glu Ile Cys Leu Asp Pro Glu Ala Pro Phe Leu Lys  
 50 55 60

Lys Val Ile Gln Lys Ile Leu Asp Gly Gly Asn Lys Glu Asn  
 65 70 75

<210> 102

<211> 75

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 102

Val Ser Ala Val Leu Thr Glu Leu Arg Cys Thr Cys Leu Arg Val Thr  
 1 5 10 15

Leu Arg Val Asn Pro Lys Thr Ile Gly Lys Leu Gln Val Phe Pro Ala  
 20 25 30

Gly Pro Gln Cys Ser Lys Val Glu Val Val Ala Ser Leu Lys Asn Gly  
 35 40 45

Lys Gln Val Cys Leu Asp Pro Glu Ala Pro Phe Leu Lys Lys Val Ile  
 50 55 60

Gln Lys Ile Leu Asp Ser Gly Asn Lys Lys Asn  
 65 70 75

<210> 103

<211> 70

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 103

ES 2 531 561 T3

Ala Glu Leu Arg Cys Met Cys Ile Lys Thr Thr Ser Gly Ile His Pro  
 1 5 10 15

Lys Asn Ile Gln Ser Leu Glu Val Ile Gly Lys Gly Thr His Cys Asn  
 20 25 30

Gln Val Glu Val Ile Ala Thr Leu Lys Asp Gly Arg Lys Ile Cys Leu  
 35 40 45

Asp Pro Asp Ala Pro Arg Ile Lys Lys Ile Val Gln Lys Lys Leu Ala  
 50 55 60

Gly Asp Glu Ser Ala Asp  
 65 70

<210> 104

<211> 70

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 104

Glu Ala Glu Glu Asp Gly Asp Leu Gln Cys Leu Cys Val Lys Thr Thr  
 1 5 10 15

Ser Gln Val Arg Pro Arg His Ile Thr Ser Leu Glu Val Ile Lys Ala  
 20 25 30

Gly Pro His Cys Pro Thr Ala Gln Leu Ile Ala Thr Leu Lys Asn Gly  
 35 40 45

Arg Lys Ile Cys Leu Asp Leu Gln Ala Pro Leu Tyr Lys Lys Ile Ile  
 50 55 60

Lys Lys Leu Leu Glu Ser  
 65 70

<210> 105

<211> 78

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 105

ES 2 531 561 T3

Met Val Pro Leu Ser Arg Thr Val Arg Cys Thr Cys Ile Ser Ile Ser  
1 5 10 15

Asn Gln Pro Val Asn Pro Arg Ser Leu Glu Lys Leu Glu Ile Ile Pro  
20 25 30

Ala Ser Gln Phe Cys Pro Arg Val Glu Ile Ile Ala Thr Met Lys Lys  
35 40 45

Lys Gly Glu Lys Arg Cys Leu Asn Pro Glu Ser Lys Ala Ile Lys Asn  
50 55 60

Leu Leu Lys Ala Val Ser Lys Glu Arg Ser Lys Arg Ser Pro  
65 70 75

<210> 106

<211> 103

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 106

Thr Pro Val Val Arg Lys Gly Arg Cys Ser Cys Ile Ser Thr Asn Gln  
1 5 10 15

Gly Thr Ile His Leu Gln Ser Leu Lys Asp Leu Lys Gln Phe Ala Pro  
20 25 30

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

Val Gln Thr Cys Leu Asn Pro Asp Ser Ala Asp Val Lys Glu Leu Ile  
50 55 60

Lys Lys Thr Glu Lys Gln Val Ser Gln Lys Lys Lys Gln Lys Asn Gly  
65 70 75 80

Lys Lys His Gln Lys Lys Lys Val Leu Lys Val Arg Lys Ser Gln Arg  
85 90 95

Ser Arg Gln Lys Lys Thr Thr  
100

<210> 107

<211> 73

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 107

ES 2 531 561 T3

Phe Pro Met Phe Lys Arg Gly Arg Cys Leu Cys Ile Gly Pro Gly Val  
 1 5 10 15

Lys Ala Val Lys Val Ala Asp Ile Glu Lys Ala Ser Ile Met Tyr Pro  
 20 25 30

Ser Asn Asn Cys Asp Lys Ile Glu Val Ile Ile Thr Leu Lys Glu Asn  
 35 40 45

Lys Gly Gln Arg Cys Leu Asn Pro Lys Ser Lys Gln Ala Arg Leu Ile  
 50 55 60

Ile Lys Lys Val Glu Arg Lys Asn Phe  
 65 70

<210> 108

<211> 68

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 108

Lys Pro Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys Arg Phe Phe Glu Ser  
 1 5 10 15

His Val Ala Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys Ile Leu Asn Thr Pro  
 20 25 30

Asn Cys Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys Asn Asn Asn Arg Gln  
 35 40 45

Val Cys Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln Glu Tyr Leu Glu Lys  
 50 55 60

Ala Leu Asn Lys  
 65

<210> 109

<211> 87

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 109

ES 2 531 561 T3

Val Leu Glu Val Tyr Tyr Thr Ser Leu Arg Cys Arg Cys Val Gln Glu  
1 5 10 15

Ser Ser Val Phe Ile Pro Arg Arg Phe Ile Asp Arg Ile Gln Ile Leu  
20 25 30

Pro Arg Gly Asn Gly Cys Pro Arg Lys Glu Ile Ile Val Trp Lys Lys  
35 40 45

Asn Lys Ser Ile Val Cys Val Asp Pro Gln Ala Glu Trp Ile Gln Arg  
50 55 60

Met Met Glu Val Leu Arg Lys Arg Ser Ser Ser Thr Leu Pro Val Pro  
65 70 75 80

Val Phe Lys Arg Lys Ile Pro  
85

<210> 110

<211> 89

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 110

Asn Glu Gly Ser Val Thr Gly Ser Cys Tyr Cys Gly Lys Arg Ile Ser  
1 5 10 15

Ser Asp Ser Pro Pro Ser Val Gln Phe Met Asn Arg Leu Arg Lys His  
20 25 30

Leu Arg Ala Tyr His Arg Cys Leu Tyr Tyr Thr Arg Phe Gln Leu Leu  
35 40 45

Ser Trp Ser Val Cys Gly Gly Asn Lys Asp Pro Trp Val Gln Glu Leu  
50 55 60

Met Ser Cys Leu Asp Leu Lys Glu Cys Gly His Ala Tyr Ser Gly Ile  
65 70 75 80

Val Ala His Gln Lys His Leu Leu Pro  
85

<210> 111

<211> 77

10 <212> PRT

ES 2 531 561 T3

<213> Homo sapiens

<400> 111

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

<210> 112

5 <211> 69

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

10 <222> (1)..(69)

<223> MIP-1alpha murino, CCL3

<400> 112

Ala Pro Tyr Gly Ala Asp Thr Pro Thr Ala Cys Cys Phe Ser Tyr Ser  
1 5 10 15  
Arg Lys Ile Pro Arg Gln Phe Ile Val Asp Tyr Phe Glu Thr Ser Ser  
20 25 30  
Leu Cys Ser Gln Pro Gly Val Ile Phe Leu Thr Lys Arg Asn Arg Gln  
35 40 45  
Ile Cys Ala Asp Ser Lys Glu Thr Trp Val Gln Glu Tyr Ile Thr Asp  
50 55 60  
Leu Glu Leu Asn Ala  
65

<210> 113

15 <211> 69

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

5 <222> (1)..(69)

<223> MIP-1beta murino, CCL4

<400> 113

```

Ala Pro Met Gly Ser Asp Pro Pro Thr Ser Cys Cys Phe Ser Tyr Thr
 1                               10                15
Ser Arg Gln Leu His Arg Ser Phe Val Met Asp Tyr Tyr Glu Thr Ser
 20                               25                30
Ser Leu Cys Ser Lys Pro Ala Val Val Phe Leu Thr Lys Arg Gly Arg
 35                               40                45
Gln Ile Cys Ala Asn Pro Ser Glu Pro Trp Val Thr Glu Tyr Met Ser
 50                               55                60
Asp Leu Glu Leu Asn
 65
    
```

<210> 114

10 <211> 68

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

15 <222> (1)..(68)

<223> RANTES murinico, CCL5

<400> 114

ES 2 531 561 T3

Ser Pro Tyr Gly Ser Asp Thr Thr Pro Cys Cys Phe Ala Tyr Leu Ser  
1 5 10 15

Leu Ala Leu Pro Arg Ala His Val Lys Glu Tyr Phe Tyr Thr Ser Ser  
20 25 30

Lys Cys Ser Asn Leu Ala Val Val Phe Val Thr Arg Arg Asn Arg Gln  
35 40 45

Val Cys Ala Asn Pro Glu Lys Lys Trp Val Gln Glu Tyr Ile Asn Tyr  
50 55 60

Leu Glu Met Ser  
65

<210> 115

<211> 125

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (1)..(125)

<223> MCP-1 murínico, CCL2

10 <400> 115

ES 2 531 561 T3

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

<210> 116

<211> 82

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (1)..(82)

<223> MCP-5 murínico, CCL12

10 <400> 116

ES 2 531 561 T3

Gly Pro Asp Ala Val Ser Thr Pro Val Thr Cys Cys Tyr Asn Val Val  
1 5 10 15

Lys Gln Lys Ile His Val Arg Lys Leu Lys Ser Tyr Arg Arg Ile Thr  
20 25 30

Ser Ser Gln Cys Pro Arg Glu Ala Val Ile Phe Arg Thr Ile Leu Asp  
35 40 45

Lys Glu Ile Cys Ala Asp Pro Lys Glu Lys Trp Val Lys Asn Ser Ile  
50 55 60

Asn His Leu Asp Lys Thr Ser Gln Thr Phe Ile Leu Glu Pro Ser Cys  
65 70 75 80

Leu Gly

<210> 117

<211> 246

<212> PRT

5 <213> Virus de la viruela

<400> 117

ES 2 531 561 T3

Met Lys Gln Ile Val Leu Ala Cys Ile Cys Leu Ala Ala Val Ala Ile  
1 5 10 15

Pro Thr Ser Leu Gln Gln Ser Phe Ser Ser Ser Ser Ser Cys Thr Glu  
20 25 30

Glu Glu Asn Lys His His Met Gly Ile Asp Val Ile Ile Lys Val Thr  
35 40 45

Lys Gln Asp Gln Thr Pro Thr Asn Asp Lys Ile Cys Gln Ser Val Thr  
50 55 60

Glu Val Thr Glu Ser Glu Asp Glu Ser Glu Glu Val Val Lys Gly Asp  
65 70 75 80

Pro Thr Thr Tyr Tyr Thr Val Val Gly Gly Gly Leu Thr Met Asp Phe  
85 90 95

Gly Phe Thr Lys Cys Pro Lys Ile Ser Ser Ile Ser Glu Tyr Ser Asp  
100 105 110

Gly Asn Thr Val Asn Ala Arg Leu Ser Ser Val Ser Pro Gly Gln Gly  
115 120 125

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

Asp Cys Glu Met Ser Ile Asn Ile Lys Cys Ser Glu Glu Glu Lys Asp  
145 150 155 160

Ser Asn Ile Lys Thr His Pro Val Leu Gly Ser Asn Ile Ser His Lys  
165 170 175

Lys Val Ser Tyr Glu Asp Ile Ile Gly Ser Thr Ile Val Asp Thr Lys  
180 185 190

Cys Val Lys Asn Leu Glu Ile Ser Val Arg Ile Gly Asp Met Cys Lys  
195 200 205

Glu Ser Ser Glu Leu Glu Val Lys Asp Gly Phe Lys Tyr Val Asp Gly  
210 215 220

Ser Ala Ser Glu Asp Ala Ala Asp Asp Thr Ser Leu Ile Asn Ser Ala  
225 230 235 240

Lys Leu Ile Ala Cys Val  
245

**REIVINDICACIONES**

1. Un anticuerpo monoclonal o fragmento enlazante a antígeno del mismo, que se enlaza a al menos tres quimioquinas CC diferentes, en donde al menos una quimioquina CC es CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ , o CCL5 / RANTES, en donde
- 5 el anticuerpo o fragmento enlazante a antígeno del mismo:
- (a) tiene un par de secuencias de aminoácido HCVR/LCVR seleccionadas del grupo que consiste de SEQ ID NO: 2/7, 12/17, 22/27, 32/37, 42/47, 52/57, y 62/67; o
- (b) compite con un anticuerpo que tiene un par de secuencias de aminoácido HCVR/LCVR seleccionadas del grupo que consiste de SEQ ID NO: 2/7, 12/17, 22/27, 32/37, 42/47, 52/57, y 62/67 para enlazamiento específico a CCL3/MIP- 1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ , o CCL5/RANTES.
- 10 2. El anticuerpo monoclonal o fragmento enlazante a antígeno del mismo de la reivindicación 1, el cual no se enlaza a MCP-1, MCP-2 o MCP-3.
3. El anticuerpo monoclonal o fragmento enlazante a antígeno del mismo de la reivindicación 1, el cual se enlaza a al menos tres quimioquinas CC diferentes seleccionadas del grupo que consiste de CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ , CCL5/RANTES, CCL14/HCC-1, CCL15/HCC-2, CCL18/PARC, y CCL23/MPIF-1.
- 15 4. El anticuerpo monoclonal o fragmento enlazante a antígeno de la reivindicación 1, el cual se enlaza a al menos a un determinante de CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ , CCL5/RANTES, CCL14/HCC-1, CCL15/HCC-2, CCL18/PARC, y CCL23/MPIF-1 cuyo determinante está localizado entre los residuos de CC de dicha quimioquina CC y el último residuo de C de dicha quimioquina
- 20 5. El anticuerpo monoclonal o fragmento enlazante a antígeno de la reivindicación 1, el cual se enlaza a al menos a un determinante de CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ , CCL5/RANTES, CCL14/HCC-1, CCL15/HCC-2, CCL18/PARC, y CCL23/MPIF-1 el cual está localizado en el bucle N o bucle 30, o el bucle 40 de dicha quimioquina CC.
- 25 6. El anticuerpo monoclonal o fragmento enlazante a antígeno de la reivindicación 1, el cual se enlaza a al menos a un determinante dentro del receptor de CC que enlaza los residuos de una quimioquina CC.
7. El anticuerpo monoclonal o fragmento enlazante a antígeno de la reivindicación 1, el cual neutraliza la actividad quimiotáctica de una quimioquina CC a la cual se enlaza.
8. El anticuerpo monoclonal o fragmento enlazante a antígeno de la reivindicación 1, el cual es producido por la línea celular de hibridoma 3C12F, 7D1G, 7D12A, 18V4F o 18P7E o que bloquea competitivamente el enlazamiento de un anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma 3C12F, 7D1G, 7D12A, 18V4F o 18P7E, en donde
- 30 - dicha línea celular de hibridoma 3C12F fue depositada el 12 de Agosto de 2010 en la American Type Culture Collection (ATCC) bajo el número de acceso PTA-11261,
- dicha línea celular de hibridoma 7D1G fue depositada el 12 de Agosto de 2010 en la ATCC bajo el número de acceso PTA-11257,
- 35 - dicha línea celular de hibridoma 7D12A fue depositada el 12 de Agosto de 2010 en la ATCC bajo el número de acceso PTA-11259,
- dicha línea celular de hibridoma 18V4F fue depositada el 12 de Agosto de 2010 en la ATCC bajo el número de acceso PTA-11260, and
- 40 - dicha línea celular de hibridoma 18P7E fue depositada el 12 de Agosto de 2010 en la ATCC bajo el número de acceso PTA-11258.
9. El anticuerpo monoclonal o fragmento enlazante a antígeno del mismo de la reivindicación 1 el cual se enlaza a al menos a cinco quimioquinas CC seleccionadas del grupo que consiste de CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ , CCL5/RANTES, CCL15/HCC-2, y CCL23/MPIF-1, y que no se enlazan a CCL2/MCP-1.
- 45 10. El anticuerpo monoclonal o fragmento enlazante a antígeno del mismo de la reivindicación 1, el cual se enlaza a al menos a cinco quimioquinas CC seleccionadas del grupo que consiste de CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ , CCL5/RANTES, CCL15/HCC-2, y CCL23/MPIF-1, y que no se enlaza a CCL2/MCP-1, que comprende combinaciones de secuencia de CDR de cadena pesada y ligera (HCDR1/HCDR2/HCDR3/LCDR1/LCDR2/LCDR3) seleccionadas del grupo que consiste de SEQ ID NO: 3/4/5/8/9/10 y 53/54/55/58/59/60, o

que compite por el enlazamiento a al menos cinco quimioquinas CC seleccionadas de CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ , CCL5/RANTES, CCL15/HCC-2, y CCL23/MPIF-1, con un anticuerpo o fragmento enlazante a antígeno que comprende combinaciones de secuencias de CDR de cadenas pesadas y ligeras seleccionadas del grupo que consiste de SEQ ID NO: 3/4/5/8/9/10 y 53/54/55/58/59/60.

- 5 11. El anticuerpo monoclonal o fragmento enlazante a antígeno de la reivindicación 9, el cual es producido por la línea celular de hibridoma que produce el MAb 3C12F, o por un subcultivo del mismo; o que bloquea competitivamente el enlazamiento de un anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma 3C12F,

en donde dicha línea celular de hibridoma 3C12F fue depositada el 12 de Agosto de 2010 en la ATCC bajo el número de acceso PTA-11261.

- 10 12. El anticuerpo monoclonal o fragmento enlazante a antígeno del mismo de la reivindicación 1 el cual se enlaza a al menos a cuatro quimioquinas CC seleccionadas del grupo que consiste de CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ , CCL5/RANTES, CCL14/HCC-1, y CCL18/PARC, y que no se enlaza a CCL2/MCP-1.

- 15 13. El anticuerpo monoclonal o fragmento enlazante a antígeno del mismo de la reivindicación 1, el cual se enlaza a al menos a cuatro quimioquinas CC seleccionadas del grupo que consiste de CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ , CCL5/RANTES, CCL14/HCC-1, y CCL18/PARC, y que no se enlaza a CCL2/MCP-1, que comprende una combinación de secuencia de CDR de cadena pesada y ligera HCDR1/HCDR2/HCDR3/LCDR1/LCDR2/LCDR3) de SEQ ID NO: 23/24/25/28/29/30, o

- 20 que compite por el enlazamiento a al menos cuatro quimioquinas CC seleccionadas del grupo que consiste de CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ , CCL5/RANTES, CCL4/HCC-1, y CCL18/PARC, con un anticuerpo o fragmento enlazante a antígeno que comprende una combinación de secuencia de CDR de cadena pesada y ligera de SEQ ID NO: 23/24/25/28/29/30.

14. El anticuerpo monoclonal o fragmento enlazante a antígeno de la reivindicación 12, el cual es producido por la línea celular de hibridoma que produce el MAb 7D1G, o por un subcultivo del mismo; o que bloquea competitivamente el enlazamiento de un anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma 7D1G,

- 25 en donde dicha línea celular de hibridoma 7D1G fue depositada el 12 de Agosto de 2010 en la ATCC bajo el número de acceso PTA-11257.

15. El anticuerpo monoclonal o fragmento enlazante a antígeno del mismo de la reivindicación 1, el cual se enlaza a al menos a cuatro quimioquinas CC seleccionadas del grupo que consiste de CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ , CCL5/RANTES, y CCL23/MPIF-1, y que no se enlaza a CCL2/MCP-1.

- 30 16. El anticuerpo monoclonal o fragmento enlazante a antígeno del mismo de la reivindicación 1, el cual se enlaza a al menos a cuatro quimioquinas CC seleccionadas del grupo que consiste de CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ , CCL5/RANTES, y CCL23/MPIF-1, y que no se enlaza a CCL2/MCP-1, que comprende una combinación de secuencia de CDR de cadena pesada y ligera (HCDR1/HCDR2/HCDR3/LCDR1/LCDR2/LCDR3) de SEQ ID NOS: 13/14/15/18/19/20, o

- 35 que compite por el enlazamiento a al menos cuatro quimioquinas CC seleccionadas de CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ , CCL5/RANTES, y CCL23/MPIF-1, con un anticuerpo o fragmento enlazante a antígeno que comprende una combinación de secuencia de CDR de cadena pesada y ligera de SEQ ID NOS: 13/14/15/18/19/20.

- 40 17. El anticuerpo monoclonal o fragmento enlazante a antígeno de la reivindicación 15, el cual es producido por la línea celular de hibridoma que produce el MAb 7D12A, o por un subcultivo de la misma; o que bloquea competitivamente el enlazamiento de un anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma 7D12A,

en donde dicha línea celular de hibridoma 7D12A fue depositada el 12 de Agosto de 2010 en la ATCC bajo el número de acceso PTA-11259.

- 45 18. El anticuerpo monoclonal o fragmento enlazante a antígeno del mismo de la reivindicación 1, el cual se enlaza a tres quimioquinas CC seleccionadas del grupo que consiste de CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ , y CCL5/RANTES y que no se enlaza a CCL2/MCP-1.

19. El anticuerpo monoclonal o fragmento enlazante a antígeno del mismo de la reivindicación 1, el cual se enlaza a CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ , y CCL5/RANTES y que no se enlaza a CCL2/MCP-1, que comprende una combinación de secuencia de CDR de cadena pesada y ligera (HCDR1/HCDR2/HCDR3/LCDR1/LCDR2/LCDR3) seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOS: 33/34/35/38/39/40 y 63/64/65/68/69/70, o

que compite por el enlazamiento a CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ , y CCL5/RANTES, con un anticuerpo o fragmento enlazante a antígeno que comprende una combinación de secuencia de CDR de cadena pesada y ligera seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOS: 33/34/35/38/39/40 y 63/64/65/68/69/70.

- 5 20. El anticuerpo monoclonal o fragmento enlazante a antígeno de la reivindicación 18, el cual es producido por la línea celular de hibridoma que produce el MAb 18V4F, o por un subcultivo del mismo; o que bloquea competitivamente el enlazamiento de un anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma 18V4F,

en donde dicha línea celular de hibridoma 18V4F fue depositada el 12 de Agosto de 2010 en la ATCC bajo el número de acceso PTA-11260.

- 10 21. El anticuerpo monoclonal o fragmento enlazante a antígeno del mismo de la reivindicación 1, el cual se enlaza a al menos a tres quimioquinas CC seleccionadas del grupo que consiste de CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1P, y CCL5/RANTES y que no se enlaza a CCL2/MCP-1.

22. El anticuerpo monoclonal o fragmento enlazante a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 9, 12, 15, 18 y 21, el cual se enlaza a un determinante en el bucle N, el bucle 30, o el bucle 40 de al menos una de dichas quimioquinas CC.

- 15 23. El anticuerpo monoclonal o fragmento enlazante a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 9, 12, 15, 18 y 21,

el cual se enlaza a al menos un determinante antigénico de CCL3/MIP-1 $\alpha$  localizado dentro de los residuos 11-15 (CCFSY), residuos 17-24 (SRQIPQNF), residuos 34-35 (QC), o residuos 57-67 (EWVQKYVSDLE) de SEQ ID NO: 71;

- 20 el cual se enlaza a al menos un determinante antigénico de CCL4/MIP-1 $\beta$  localizado dentro de los residuos 11-15 (CCFSY), residuos 17-24 (ARKLPHNF), residuos 34-35 (LC), o residuos 57-67 (SWVQEYVYDLE) de SEQ ID NO: 72;

el cual se enlaza a al menos un determinante antigénico de CCL5/RANTES localizado dentro de los residuos 10-14 (CCFAY), residuos 16-23 (ARPLPRAH), residuos 33-34 (KC), o residuos 56-66 (KWVREYINSLE) de SEQ ID NO: 73.

- 25 24. El anticuerpo monoclonal o fragmento enlazante a antígeno del mismo de la reivindicación 1, el cual se enlaza a al menos tres quimioquinas seleccionadas del grupo que consiste de CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ , y CCL5/RANTES y que no se enlaza a CCL2/MCP-1 que comprende una combinación de secuencia de CDR de cadena pesada y ligera (HCDR1/HCDR2/HCDR3/LCDR1/LCDR2/LCDR3) de SEQ ID NO: 43/44/45/48/49/50, o

- 30 que compite por el enlazamiento a CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ , y CCL5/RANTES, con un anticuerpo o fragmento enlazante a antígeno que comprende una combinación de secuencia de CDR de cadena pesada y ligera de SEQ ID NO: 43/44/45/48/49/50.

- 35 25. El anticuerpo monoclonal o fragmento enlazante a antígeno de la reivindicación 21, el cual es producido por la línea celular de hibridoma que produce el MAb 18P7E, o por un subcultivo del mismo; o que bloquea competitivamente el enlazamiento de un anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma 18P7E,

en donde dicha línea celular de hibridoma 18P7E fue depositada el 12 de Agosto de 2010 en la ATCC bajo el número de acceso PTA-11258.

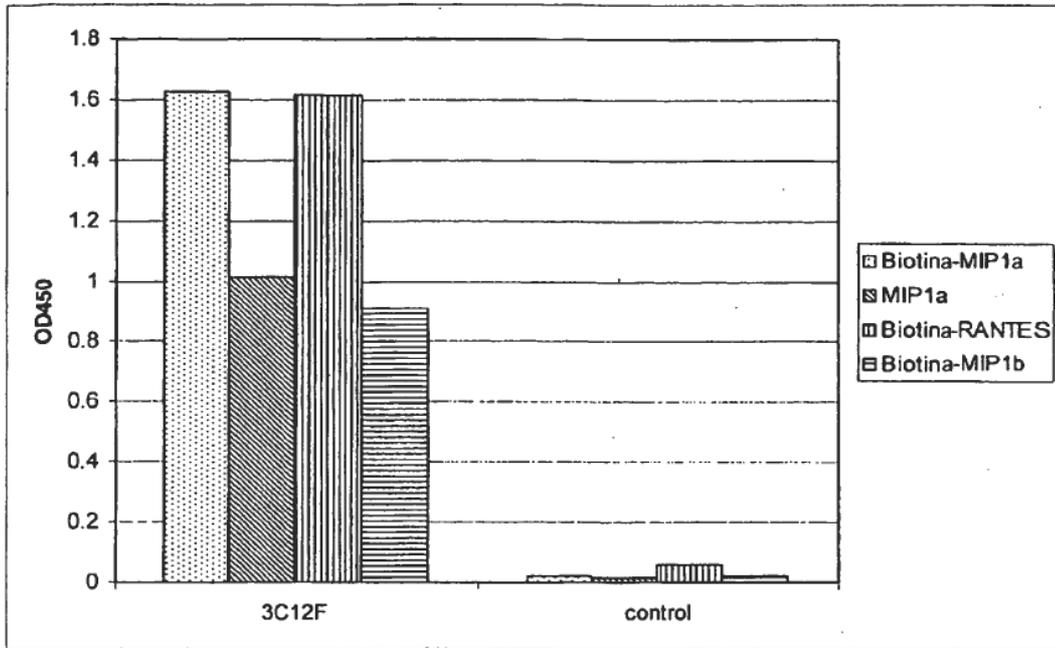
- 40 26. El anticuerpo monoclonal o fragmento enlazante a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 9, 12, 15, 18 y 21, el cual es un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, o un anticuerpo quimérico humano-murínico o un fragmento enlazante a antígeno del mismo.

27. Una línea celular de hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 1

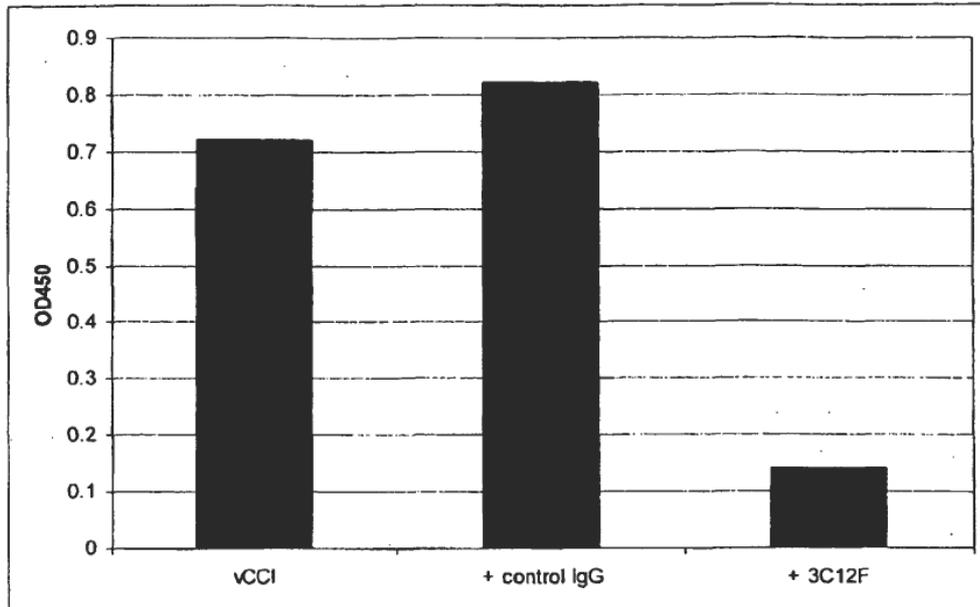
28. Una composición que comprende al menos un anticuerpo monoclonal o fragmento enlazante a antígeno del mismo de la reivindicación 1, en combinación con un vehículo, excipiente o regulador.

- 45 29. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1 o un fragmento enlazante a antígeno del mismo para uso en el tratamiento de una enfermedad, trastorno o condición mediada por una o más quimioquinas CC, en donde dicha enfermedad, trastorno o condición se selecciona del grupo que consiste de artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enfermedad fibrótica, aterosclerosis, asma, enfermedades oncogénicas, enfermedades inflamatorias del intestino, dermatitis atópica, psoriasis, apoplejía, trasplante de órganos, COPD, glomerulonefritis, lupus nefritis, esclerodermia, cirrosis, enfermedad de Alzheimer, isquemia por CHF, restenosis coronaria, nefropatía/neuropatía/retinopatía diabética, osteoartritis, periodontitis, infecciones por levadura y virales, y desregulación del embarazo.
- 50

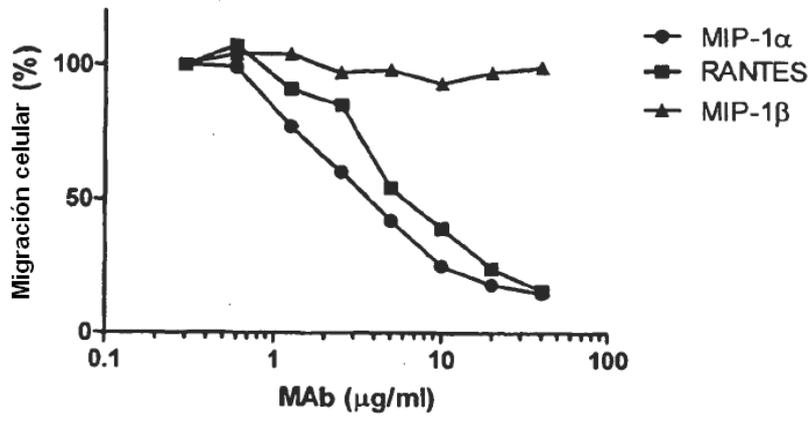
**Figura 1.** Enlazamiento de 3C12F a quimioquinas por ELISA.



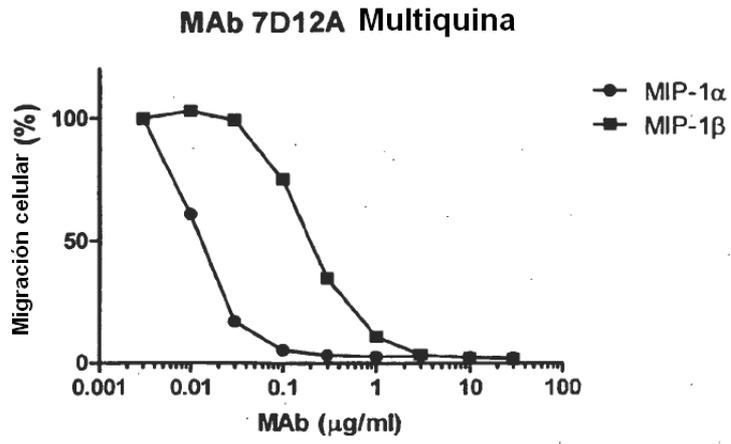
**Figura 2.** vCCI de bloques de 3C12F que enlazan a RANTES.



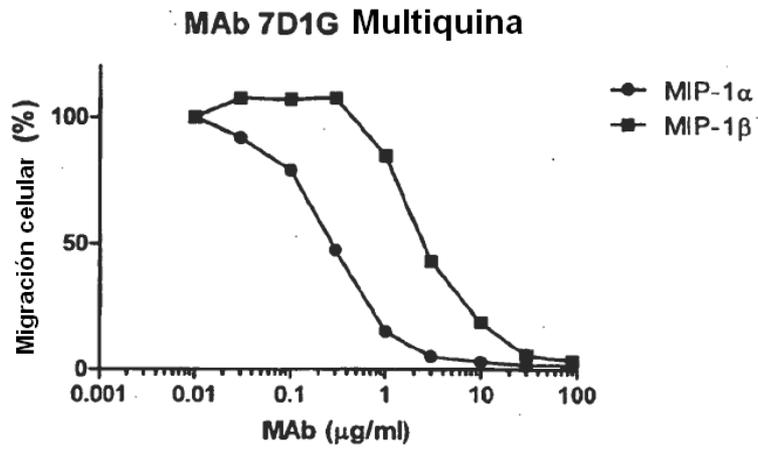
**Figura 3.** Titulación de la actividad inhibidora de 3C12F purificado en ensayos de quimiotaxis.



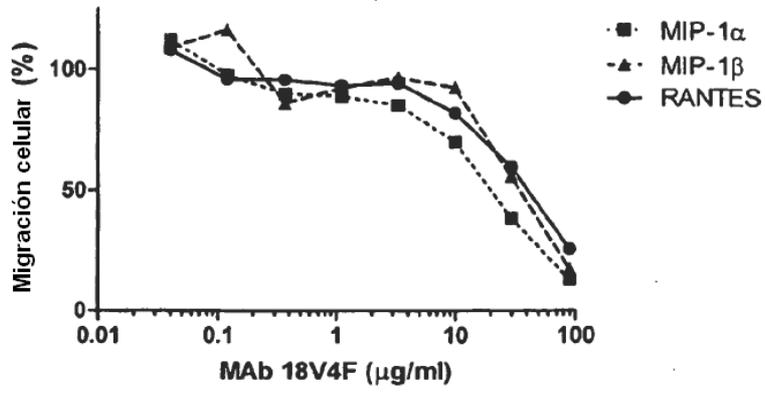
**Figura 4.** Titulación de la actividad inhibidora de 7D12A purificado en ensayos de quimiotaxis



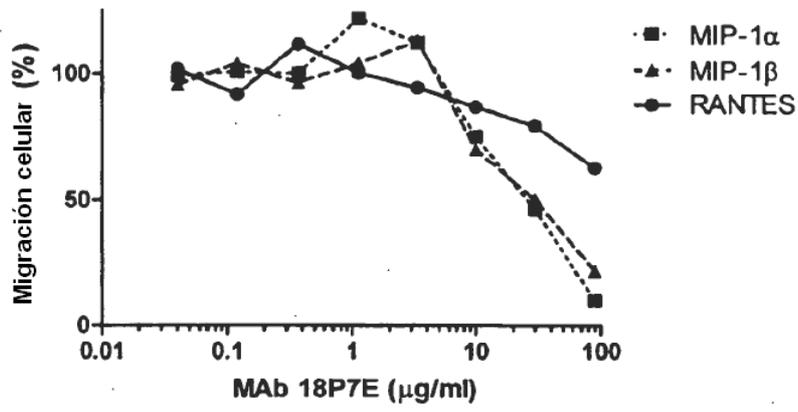
**Figura 5.** Titulación de la actividad inhibidora de 7D1G purificado en ensayos de quimiotaxis.



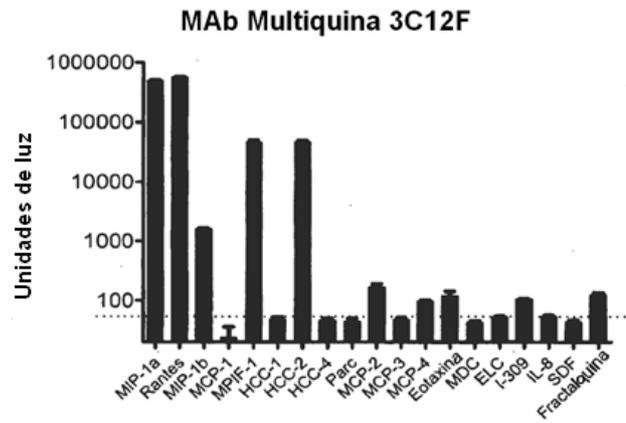
**Figura 6.** Titulación de la actividad inhibidora de 18V4F purificado en ensayos de quimiotaxis.



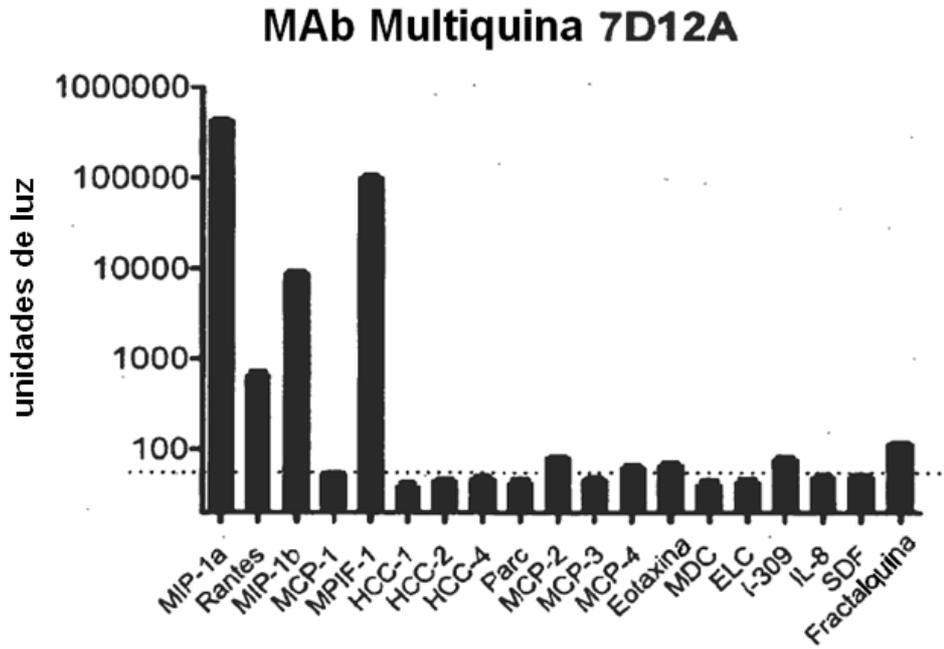
**Figura 7.** Titulación de la actividad inhibidora de 18P7E purificado en ensayos de quimiotaxis.



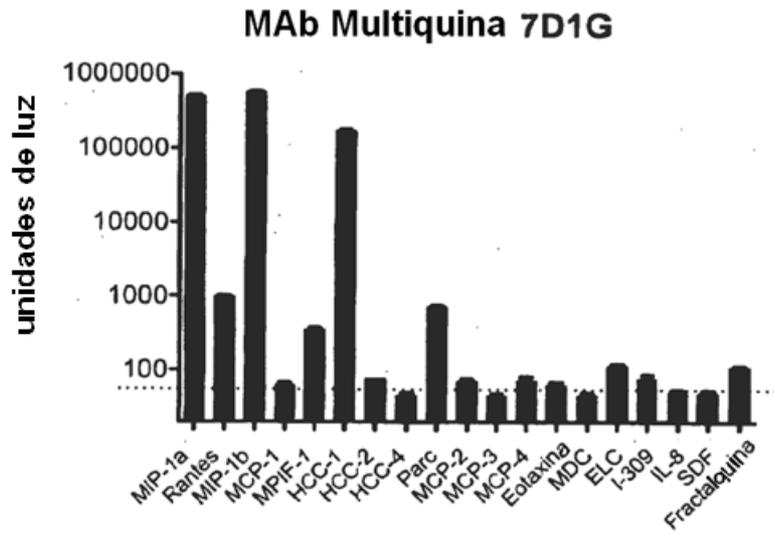
**Figura 8.** Especificidad de enlazamiento a quimioquina de anticuerpo anti quimioquina 3C12F (plataforma MSD). El enlazamiento de fondo es indicado por la línea punteada.



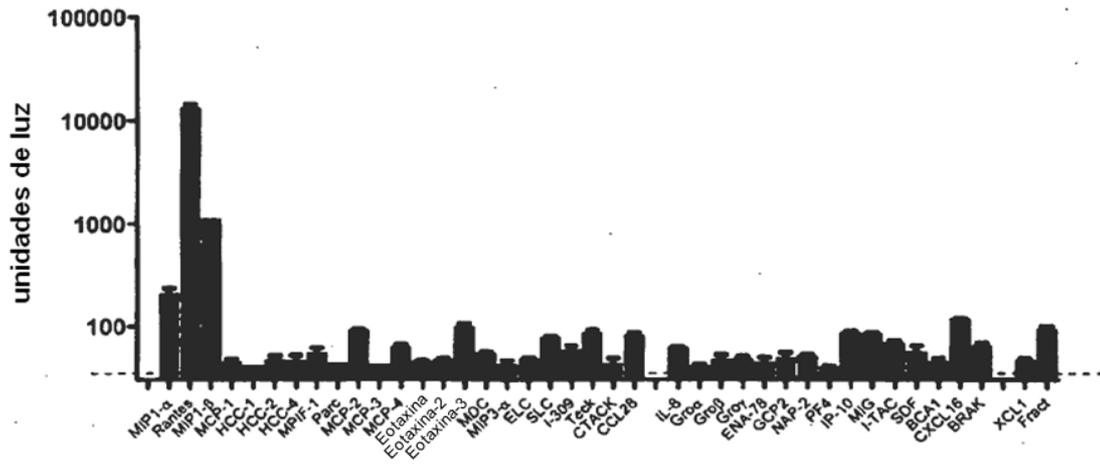
**Figura 9.** Especificidad de enlazamiento a quimioquina de anticuerpo anti quimioquina 7D12A (plataforma MSD). El enlazamiento de fondo es indicado por la línea punteada.



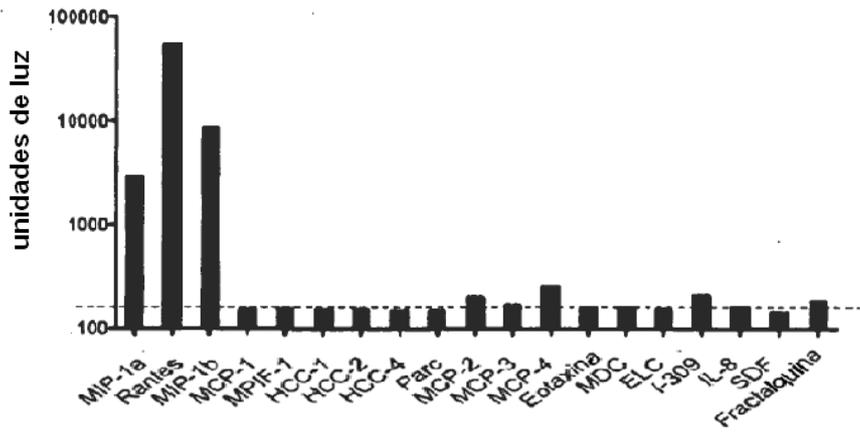
**Figura 10.** Especificidad de enlazamiento a quimioquina de anticuerpo anti quina 7D1G (plataforma MSD). El enlazamiento de fondo es indicado por la línea punteada.



**Figura 11.** Especificidad de enlazamiento a quimioquina de anticuerpo antiquina 18V4F (plataforma MSD). El enlazamiento de fondo es indicado por la línea punteada.



**Figura 12.** Especificidad de enlazamiento a quimioquina de anticuerpo antiquina 18P7E (plataforma MSD). El enlazamiento de fondo es indicado por la línea punteada.



**Figura 13** Alineaciones de secuencias de aminoácidos de quimioquinas CC enlazadas por los MAb 3C12F, 7D12A, 7D1G, 18V4F y 18P7E

a) Alineación de secuencias de aminoácidos de quimioquinas CC enlazadas por el MAb3C12F

```

(1) 1      10      20      30      40      50      60      77
MIP-1a (1) ASLAADTPTACCFSYTSRQIPQNFIAIDYFETSSQCSKPGVIFLTKRSRQVCADPSEEWVQKYVSDLELSA-----
RANTES (1) -SPYSSDITPCCFAYIARPLPRAHIKEYFYTSQCSNPAVVVFVTRKNRQVCANPEKKWVREYINSLEMS-----
MIP-1b (1) APMGSDPPTACCFSYTARKLPHNFVVDYETSSLCSQPAVVFPQTKRGKQVCADPSESWVQEVVYDLELN-----
MPIF-1 (1) --RFHATSADCCISYTPRSIPCSLLESYFETNSECSKPGVIFLTKKGRRFCANPSDKQVQVCMRMLKLDTRI KTRKN
HCC-2 (1) ---SFHFAADCCISYISQSI PCSLMKSYFETSSECSKPGVIFLTKKGRQVCAKPSGGVQDCMKKLPYSI-----
    
```

b) Alineación de secuencias de aminoácidos de quimioquinas CC enlazadas por el MAb 7D12A

```

(1) 1      10      20      30      40      50      60      77
MIP-1a (1) ASLAADTPTACCFSYTSRQIPQNFIAIDYFETSSQCSKPGVIFLTKRSRQVCADPSEEWVQKYVSDLELSA-----
RANTES (1) -SPYSSDITPCCFAYIARPLPRAHIKEYFYTSQCSNPAVVVFVTRKNRQVCANPEKKWVREYINSLEMS-----
MIP-1b (1) APMGSDPPTACCFSYTARKLPHNFVVDYETSSLCSQPAVVFPQTKRGKQVCADPSESWVQEVVYDLELN-----
MPIF-1 (1) --RFHATSADCCISYTPRSIPCSLLESYFETNSECSKPGVIFLTKKGRRFCANPSDKQVQVCMRMLKLDTRI KTRKN
    
```

c) Alineación de secuencias de aminoácidos de quimioquinas CC enlazadas por el MAb 7D1G

```

(1) 1      10      20      30      40      50      60      77
MIP-1a (1) ASLAADTPTACCFSYTSRQIPQNFIAIDYFETSSQCSKPGVIFLTKRSRQVCADPSEEWVQKYVSDLELSA-----
RANTES (1) -SPYSSDITPCCFAYIARPLPRAHIKEYFYTSQCSNPAVVVFVTRKNRQVCANPEKKWVREYINSLEMS-----
MIP-1b (1) APMGSDPPTACCFSYTARKLPHNFVVDYETSSLCSQPAVVFPQTKRGKQVCADPSESWVQEVVYDLELN-----
HCC-1 (1) ---GPHYSECCFTYITTYKIPRQIMDYETNSQCSKPGVIFITKRGHSVCTNPSDKWQDYIKDMKEN-----
MPIF-1 (1) --RFHATSADCCISYTPRSIPCSLLESYFETNSECSKPGVIFLTKKGRRFCANPSDKQVQVCMRMLKLDTRI KTRKN
PARC (1) -AQVGTNKELCCLVYTSWQIPQKFIVDYSETSPQCPKPGVILLTKRGRQICADPNKKWQKYISDLKLN-----
    
```

d) Alineación de secuencias de aminoácidos de quimioquinas CC enlazadas por los MAb 18V4F y 18P7E

```

(1) 1      10      20      30      40      50      60
MIP-1a(1) ASLAADTPTACCFSYTSRQIPQNFIAIDYFETSSQCSKPGVIFLTKRSRQVCADPSEEWVQKYVSDLELSA-
RANTES(1) -SPYSSDITPCCFAYIARPLPRAHIKEYFYTSQCSNPAVVVFVTRKNRQVCANPEKKWVREYINSLEMS--
MIP-1b(1) APMGSDPPTACCFSYTARKLPHNFVVDYETSSLCSQPAVVFPQTKRGKQVCADPSESWVQEVVYDLELN--
    
```