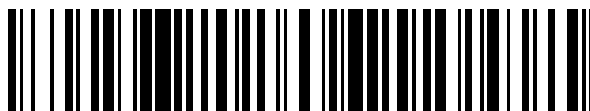


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 540 566**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C07K 16/40 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.04.2008 E 08736848 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2015 EP 2164872**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales anti-VAP-1 completamente humanos**

30 Prioridad:

20.04.2007 FI 20075278

20.04.2007 US 907904 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.07.2015

73 Titular/es:

BIOTIE THERAPIES CORP. (100.0%)

Joukahaisenkatu 6

20520 Turku, FI

72 Inventor/es:

SMITH, DAVID;

VAINIO, PETRI;

MIKKOLA, JARI;

VUORIO, PÄIVI y

VAINIO, JANI

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 540 566 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 monoclonales anti-VAP-1 completamente humanos

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal completamente humano, denominado BTT-1023, que reconoce un epítipo funcional de la proteína de adherencia celular endotelial humana VAP-1.

Antecedentes de la invención

Generalmente, los anticuerpos completos comparten una estructura en Y común compuesta por dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas. Estas cuatro subunidades polipeptídicas se ensamblan de manera que las dos cadenas pesadas están unidas, y una cadena ligera está anclada a cada cadena pesada por medio de enlaces disulfuro. Cada polipéptido que constituye el anticuerpo consiste en una región variable y una constante.

La región variable está localizada en los brazos del anticuerpo en forma de Y, y determina la especificidad de unión al antígeno del anticuerpo. Esta región contiene secuencias de aminoácidos cortas, que son responsables de la unión del anticuerpo a su antígeno. Estas regiones se denominan regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Las partes restantes de las regiones variables son importantes para la conformación del bolsillo de unión al antígeno en su totalidad.

La región constante de un anticuerpo está localizada en la base de las cadenas pesadas, y determina la capacidad del anticuerpo para activar las reacciones inmunitarias a través de interacciones con receptores específicos. Estas regiones están generalmente muy conservadas, y la variabilidad está limitada a cinco isoformas básicas, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM.

La proteína de adherencia vascular 1 (VAP-1) es una molécula de adherencia, inducible por inflamación, no clásica expresada sobre células endoteliales vasculares, donde media el rodamiento de leucocitos bajo condiciones de cizalla fisiológica. En este papel contribuye a la re-circulación de los linfocitos a través de vénulas endoteliales altas (HEV) de tejido linfóide secundario como parte del proceso normal de vigilancia inmunitaria.

No obstante, en condiciones inflamatorias, VAP-1 promueve la infiltración de leucocitos a tejido inflamado, contribuyendo de ese modo, y manteniendo, la respuesta inflamatoria. Esta infiltración puede a su vez estar perjudicando en enfermedades inflamatorias crónicas tales como artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria intestinal, psoriasis y muchas enfermedades autoinmunitarias y otras enfermedades inflamatorias. En otros entornos, la infiltración masiva de células proinflamatorias en el tejido después de un deterioro tisular grave resultante de infarto de miocardio, ictus y otras enfermedades, contribuye a la destrucción del tejido observada en estas respuestas inflamatorias agudas. Es probable que la reducción de la infiltración de células a los sitios de inflamación evitando la función de VAP-1 con anticuerpos bloqueadores permita resolver la inflamación y conducir a una mejora en los síntomas clínicos de estas enfermedades.

La Patente de los Estados Unidos 5580780 describe un anticuerpo monoclonal (mAb), 1 B2, que reconoce VAP-1 y que puede bloquear la unión de los linfocitos a HEV tonsilar en un análisis de sección congelada. El mAb 1 B2 es un anticuerpo IgM murino y es específico para VAP-1.

El uso de mAb murinos como agentes terapéuticos tiene un potencial limitado, puesto que el sistema inmunitario humano reconoce los anticuerpos murinos como material foráneo y produce anticuerpos humanos anti-ratón (HAMA) para aclararlos del organismo. Esta reacción inmunitaria es una limitación principal para el uso de anticuerpos murinos en la terapia a largo plazo cuando se necesitan administraciones repetidas. El uso de anticuerpos anti-VAP-1 murinos en la medicina clínica podría estar limitado a pacientes tratados con inmunosupresores, y por lo tanto menos propensos a reacciones HAM, y a regímenes de tratamiento, en los que solamente es factible una única administración de los anticuerpos, tal como una lesión por isquemia-reperfusión en un infarto agudo o síndrome de dificultad respiratoria aguda.

Una desventaja adicional relacionada con el uso de anticuerpos anti-VAP-1 IgM murinos en terapia es el perfil cinético desfavorable de tales anticuerpos, esto es, la corta vida media, que los hace inadecuados para su uso en trastornos crónicos, tales como artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria intestinal, psoriasis y muchas otras enfermedades.

Se conocen en la técnica diversos métodos de creación de anticuerpos monoclonales menos inmunogénicos. Los enfoques preferidos incluyen "humanizar" los anticuerpos. Las estrategias utilizadas frecuentemente consisten en crear mAb quiméricos, mAb humanizados o mAb completamente humanos. Los mAb quiméricos son anticuerpos en los que la región variable deriva de ratón mientras la región constante es de origen humano. En los anticuerpos quiméricos, aproximadamente 70% de la molécula de anticuerpo de roedor es normalmente remplazado por las correspondientes secuencias humanas a la vez que mantienen los sitios de unión

al antígeno de roedor con sus particulares especificidades y afinidades. Los anticuerpos humanizados son anticuerpos en donde la región variable puede ser derivada de roedor pero que ha sido mutada con el fin de que se asemeje más a un anticuerpo humano y puede contener una región constante de origen humano. Los anticuerpos completamente humanos son anticuerpos en donde tanto la región variable como la región constante son de origen humano.

La publicación de patente internacional WO 03/093319 describe un anticuerpo monoclonal anti-VAP-1 quimérico BTT-1002, que tiene el potencial de presentar una inmunogenicidad reducida en comparación con los correspondientes anticuerpos murinos. No obstante, al ser un anticuerpo quimérico, BTT-1002 todavía tiene secuencias de proteína correspondientes a las regiones variables del anticuerpo del que derivan directamente y sin modificación del anticuerpo de ratón original. Este anticuerpo todavía puede ser reconocido como foráneo y ser inmunogénico cuando se administra al ser humano. Sus propiedades farmacológicas, tales como su vida media de eliminación y sus propiedades funcionales, también pueden resultar comprometidas debido a su inmunogenicidad y a la producción de anticuerpos resultante contra él.

Por lo tanto, existe la necesidad en la técnica de un anticuerpo anti-VAP-1 completamente humano con una inmunogenicidad reducida y mejores propiedades farmacológicas.

Breve descripción de la invención

La presente invención está ampliamente dirigida a anticuerpos anti-VAP-1 completamente humanos, a los métodos para producir tales anticuerpos y a los usos de los anticuerpos.

Un objeto de la presente invención es proporcionar un anticuerpo monoclonal anti-VAP-1 completamente humano o un fragmento de unión a VAP-1 del mismo mostrado en la reivindicación 1. Otro objeto de la presente invención hace referencia al uso del presente anticuerpo en diagnósticos in vivo o in vitro y/o en terapia. El presente anticuerpo tiene un potencial reducido para provocar una respuesta inmunitaria en los pacientes y tiene un perfil farmacológico favorable para fines terapéuticos.

Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar vectores de expresión y células anfitrionas que incorporan ácidos nucleicos que codifican el presente anticuerpo, para la expresión recombinante de anticuerpos anti-VAP-1.

Otra realización de la presente invención está dirigida a métodos para producir los anticuerpos anti-VAP-1 completamente humanos de acuerdo con la presente invención por medio de métodos de producción recombinante.

También se describen las composiciones farmacéuticas que comprenden dichos anticuerpos y los usos terapéuticos de los mismos.

Breve descripción de las figuras

A continuación se describirá la invención con mayor detalle por medio de realizaciones preferidas con referencia a las figuras adjuntas, en las que

Las Figuras 1 a 5 muestran las secuencias de nucleótidos y las correspondientes secuencias de aminoácidos de las regiones variables de los anticuerpos anti-VAP-1 8C10 (Figura 1A-B), 8A4 (Figura 2A-B), 3F10 (Figura 3A-B), 5F12 (Figura 4A-B), y 4B3 (Figura 5A-B). Las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera variable (VL) (A) y la cadena pesada variable (VH) (B) se dedujeron de los ADNc clonados. Las tres CDR de cada cadena de aminoácidos se muestran en negrita con las correspondientes secuencias de nucleótidos subrayadas.

La Figura 6 muestra un alineamiento de la secuencia de proteínas de las regiones variables de la cadena pesada VH de 8C10, 8A4, 3F10, 5F12, y 4B3 que muestra la secuencia consenso (Fig. 6A). Se muestra un alineamiento de las CDR 1 a 3 de la cadena pesada VH con una secuencia consenso en Fig. 6B, Fig. 6C y Fig. 6D. La Figura 6E muestra un alineamiento de la secuencia de proteínas de las regiones variables de la cadena ligera VL de 8C10, 8A4, 3F10, 5F12, y 4B3 que muestra la secuencia consenso. Se muestra un alineamiento de las CDR 1 a 3 de la cadena ligera VL con una secuencia consenso en la Fig. 6F, Fig. 6G y Fig. 6H.

La Figura 7 ilustra la unión a VAP-1 del anticuerpo completamente humano recombinante r8C10 (BTT-1023) para células Ax que expresan VAP-1 humana sobre la superficie de la célula, demostrado por medio de análisis FACS (clasificación celular activada por fluorescencia) de células Ax con VAP-1 teñidas con BTT-1023 en comparación con células teñidas de control.

La Figura 8 ilustra el efecto de BTT-1023 sobre la trans migración de leucocitos in vitro. Se muestra el número de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) trans migradas a través de monocapas de células endoteliales tratadas con anticuerpos BTT-1023 o de control. Las barras de error son el error típico de la media, N=6.

Descripción detallada de la invención

La presente invención está dirigida a anticuerpos monoclonales (mAb) completamente humanos, preferiblemente producidos recombinantemente que reconocen de manera específica la Proteína de Adherencia Vascular 1 humana, VAP-1. Los anticuerpos monoclonales completamente humanos de acuerdo con la presente invención tienen una inmunogenicidad reducida en comparación con los correspondientes anticuerpos humanizados y por tanto son útiles para el tratamiento de numerosas enfermedades autoinmunitarias, afecciones inflamatorias y enfermedades del tejido conectivo, la piel, y el tracto gastrointestinal, el sistema nervioso central, y los sistemas pulmonares, incluyendo afecciones tales como artritis crónicas, enfermedades inflamatorias intestinales, y dermatosis crónicas. Los anticuerpos contra VAP-1 completamente humanos son útiles adicionalmente para aplicaciones de diagnóstico in vitro e in vivo, incluyendo la formación de imágenes inmunoescintográficas in vivo de los sitios de inflamación.

Se pretende que el término "variante de secuencia conservativa" según se utiliza en la presente memoria, incluya modificaciones de la secuencia de nucleótidos y aminoácidos, que no alteran significativamente las propiedades de unión de los anticuerpos anti-VAP-1 completamente humanos de acuerdo con la presente invención. Las variantes de secuencia de nucleótidos conservativas incluyen variantes que se originan a partir de la degeneración del código genético y a partir de mutaciones silenciosas. También están incluidas las sustituciones, deleciones y adiciones de nucleótidos. Las variantes de aminoácidos conservativas incluyen variantes que se originan a partir de sustituciones de aminoácidos con aminoácidos similares bien conocidos en la técnica. También están incluidas las deleciones y adiciones de aminoácidos.

Los polipéptidos y polinucleótidos de acuerdo con la presente invención incluyen aquellos que tienen una identidad de al menos 80%, o una identidad de al menos 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con los anticuerpos anti-VAP-1 completamente humanos o con los polinucleótidos que codifican dichos anticuerpos descritos más abajo.

La presente invención proporciona un anticuerpo anti-VAP-1 completamente humano que comprende un polipéptido de cadena pesada representado en el SEQ ID NO: 47 o su variante de secuencia conservativa, y un polipéptido de cadena ligera representado en el SEQ ID NO: 48 o su variante de secuencia conservativa; en donde el anticuerpo anti-VAP-1 o un fragmento de unión a VAP-1 del mismo muestra un perfil de concentración en suero mejorado en el tiempo (AUC) y una vida media de eliminación prolongada por encima de la de un anticuerpo anti-VAP-1 quimérico denominado BTT-1002.

Las moléculas de anticuerpo de la presente invención pueden comprender: una molécula de anticuerpo natural completa, que tiene cadenas pesadas y ligeras completas; un fragmento de la misma, tal como un fragmento Fab, Fab', F(ab')₂ o Fv; un monómero o dímero de cadena ligera o cadena pesada; o un anticuerpo de cadena sencilla, p. ej. un Fv de cadena sencilla en el que las regiones variables de la cadena pesada y ligera están unidas por un conector peptídico; o cualquier otra molécula recombinante o injertada con CDR. De un modo similar, la región variable de la cadena pesada y ligera se puede combinar con otros dominios de anticuerpo según sea apropiado.

Es bien sabido en la técnica que el dominio CDR3, independientemente de los dominios CDR1 y/o CDR2, solo puede determinar la especificidad de unión de un anticuerpo para un antígeno cognado y que se pueden generar múltiples anticuerpos de manera predecible que tengan la misma especificidad de unión basándose en una secuencia de CDR3 común.

Por consiguiente, la presente descripción proporciona anticuerpos monoclonales que comprenden uno o más dominios CDR3 de cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo derivado de un animal humano o no humano, en donde el anticuerpo monoclonal es capaz de unirse específicamente a VAP-1. En ciertos aspectos, la presente descripción proporciona anticuerpos monoclonales que comprenden uno o más dominios CDR3 de cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo no humano, tal como un anticuerpo de ratón o rata, en donde el anticuerpo monoclonal es capaz de unirse específicamente a VAP-1. En algunas realizaciones, tales anticuerpos de la invención que comprenden uno o más dominios CDR3 de cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo no humano (a) son capaces de competir por la unión con; (b) conservan las características funcionales; (c) se unen al mismo epítopo; y/o (d) tienen una afinidad de unión similar a la del correspondiente anticuerpo no humano parental.

En otros aspectos, la presente descripción proporciona anticuerpos monoclonales que comprenden uno o más dominios CDR3 de cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo humano, tal como, por ejemplo, un anticuerpo humano obtenido de un animal no humano, en donde el primer anticuerpo humano es capaz de unirse específicamente a VAP-1 y en donde el dominio CDR3 del primer anticuerpo humano reemplaza al dominio CDR3 de un anticuerpo humano que carece de especificidad de unión para VAP-1 para generar un segundo anticuerpo humano que es capaz de unirse específicamente a VAP-1. En algunas realizaciones, tales anticuerpos de la invención que comprenden uno o más dominios CDR3 de cadena pesada y/o ligera del primer anticuerpo humano (a) son capaces de competir por la unión con; (b) conservan las características funcionales; (c) se unen al mismo epítopo; y/o (d) tienen una afinidad de unión similar a la del correspondiente primer anticuerpo humano parental.

Los anticuerpos de la presente descripción se pueden caracterizar adicionalmente por las diversas propiedades físicas de los anticuerpos anti-VAP-1. Se pueden utilizar diferentes análisis para detectar y/o diferenciar las diferentes clases de anticuerpos basándose en estas propiedades físicas.

En algunas realizaciones, los anticuerpos de la presente descripción pueden contener uno o más sitios de glicosilación en la región variable de la cadena ligera o pesada. La presencia de uno o más sitios de glicosilación en la región variable puede dar como resultado el aumento de la inmunogenicidad del anticuerpo o una alteración de la farmacocinética del anticuerpo debido a la alteración de la unión al antígeno como es sabido en la técnica. Se ha sabido que la glicosilación se produce en motivos que contienen una secuencia N-X-S/T. La glicosilación de la región variable se puede someter a ensayo utilizando el análisis Glycoblott, que escinde el anticuerpo para producir un Fab, y después somete a ensayo la glicosilación utilizando un análisis que mide la oxidación de peryodato y la formación de bases de Schiff. Alternativamente, la glicosilación de la región variable se puede someter a ensayo utilizando la cromatografía líquida Dionex (Dionex-LC), que escinde los sacáridos de un Fab a monosacáridos y analiza el contenido individual de sacáridos. En algunos casos, se prefiere tener un anticuerpo anti-VAP-1 que no contenga glicosilación en la región variable. Esto se puede lograr seleccionando anticuerpos que no contienen el motivo de glicosilación en la región variable o mutando los residuos del motivo de glicosilación utilizando mecanismos convencionales bien conocidos en la técnica.

En una realización preferida, los anticuerpos de la presente descripción no contienen sitios de isomería de asparagina. Se puede producir un efecto desamidación o ácido isoaspártico en secuencias N-G o D-G, respectivamente. La creación de ácido isoaspártico se puede medir utilizando un análisis Iso-Quant, que utiliza una HPLC de fase inversa para someter a ensayo el ácido isoaspártico.

Cada anticuerpo tendrá un único punto isoeléctrico (pI), pero generalmente los anticuerpos estarán en el intervalo de pH entre 6 y 9,5. El pI para un anticuerpo IgG1 se encuentra típicamente en el intervalo de pH de 7 a 9,5 y el pI para un anticuerpo IgG4 se encuentra típicamente en el intervalo de pH de 6 a 8. Los anticuerpos pueden tener un pI que esté fuera de este intervalo. El punto isoeléctrico se puede someter a ensayo utilizando un análisis de isoelectroenfoque capilar, que crea un gradiente de pH y se puede utilizar un enfoque por láser para aumentar la exactitud como es bien sabido en la técnica. En algunos casos, se prefiere tener un anticuerpo anti-VAP-1 que contenga un valor de pI que se encuentre en el intervalo normal. Esto se puede lograr seleccionando los anticuerpos con un pI en el intervalo normal, o mutando los residuos de la superficie cargada utilizando mecanismos convencionales bien conocidos en la técnica.

Cada anticuerpo tendrá una temperatura de fusión que será indicativa de la estabilidad térmica. Una estabilidad térmica superior indica una estabilidad global mayor del anticuerpo in vivo. El punto de fusión de un anticuerpo se puede medir utilizando mecanismos tales como la calorimetría de barrido diferencial. La TM1 indica la temperatura del desplegamiento inicial del anticuerpo. La TM2 indica la temperatura del desplegamiento completo del anticuerpo. Generalmente, se prefiere que la TM1 de un anticuerpo de la presente descripción sea mayor de 60°C, preferiblemente mayor de 65°C, incluso más preferiblemente mayor de 70°C. Alternativamente, la estabilidad térmica de un anticuerpo se puede medir utilizando el dicroísmo circular como es bien sabido en la técnica.

En una realización preferida, se seleccionan anticuerpos que no se degradan rápidamente. La fragmentación de un anticuerpo anti-VAP-1 se puede medir utilizando la electroforesis capilar (CE) y la Espectrometría de Masas con Ionización por Desorción Láser Asistida por Matriz (MALDI-MS), como es bien sabido en la técnica.

En otra realización preferida, se seleccionan anticuerpos que tienen unos efectos de agregación mínimos. La agregación puede conducir al desencadenamiento de una respuesta inmunitaria no deseada y/o alterada o a propiedades farmacocinéticas desfavorables. Generalmente, son aceptables anticuerpos con una agregación de 25% o menos, preferiblemente 20% o menos, incluso más preferiblemente 15% o menos, incluso más preferiblemente 10% o menos e incluso más preferiblemente 5% o menos. La agregación se puede medir por medio de varios mecanismos bien conocidos en la técnica, incluyendo la columna de exclusión por tamaño (SEC), la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), y la dispersión de luz para identificar monómeros, dímeros, trímeros o multímeros.

Los anticuerpos de acuerdo con la presente invención son preferiblemente de tipo IgG y más preferiblemente de tipo IgG4. No obstante, se incluyen otros isotipos de anticuerpos, tales como IgG1, IgG2, IgG3, IgM e IgE.

En algunas realizaciones, un anticuerpo de acuerdo con la presente invención comprende regiones variables de cadena pesada y ligera que comprenden secuencias de aminoácidos que son homólogas a las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos preferidos descritos en la presente memoria, y en donde los anticuerpos conservan las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos anti-VAP-1 de la invención.

Por ejemplo, la descripción proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera, en donde: (a) la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que es

homóloga al menos en 80% a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en los SEQ ID NO: 19 a 23; (b) la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que es homóloga en al menos 80% a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en los SEQ ID NO: 42 a 46; (c) el anticuerpo se une a VAP-1 con una Kd de 1×10^{-7} M o menor.

En otras realizaciones descritas, las secuencias de aminoácidos de VH y/o VL pueden ser homólogas en 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% a las secuencias mostradas más arriba. Se puede obtener un anticuerpo que tiene regiones VH y VL que tienen una alta homología (esto es, 80% o mayor) con las regiones VH y VL de las secuencias mostradas anteriormente, por medio de mutagénesis (p. ej., mutagénesis dirigida al sitio o mediada por PCR) de moléculas de ácido nucleico que codifican los SEQ ID NO: 19 a 23 y 42 a 46, seguido del ensayo del anticuerpo alterado codificado para determinar la función conservada.

Según se utiliza en la presente memoria, el porcentaje de homología entre dos secuencias de aminoácidos es equivalente al porcentaje de identidad entre las dos secuencias. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (esto es, % homología = $\text{núm. de posiciones idénticas} / \text{núm. total de posiciones} \times 100$), tomando en consideración el número de huecos, y la longitud de cada hueco, que es necesario introducir para un alineamiento óptimo de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se pueden completar utilizando métodos convencionales conocidos en la técnica.

En algunas realizaciones, se pueden diseñar anticuerpos de la invención para que incluyan modificaciones en la región Fc, típicamente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, tales como la vida media, la fijación del complemento, la unión al receptor de Fc, y/o la citotoxicidad celular dependiente del antígeno. Además, se puede modificar químicamente un anticuerpo de la invención (p. ej., se pueden anclar uno o más radicales químicos al anticuerpo) o se pueden modificar para alterar su glicosilación, de nuevo para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo.

Por ejemplo, la región Fc se puede alterar reemplazando al menos un residuo de aminoácido seleccionado entre los residuos de aminoácido 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 y 322 (la numeración de los residuos en la región Fc es la del índice EU de Kabat) por un residuo de aminoácido diferente de manera que el anticuerpo tenga una afinidad alterada para un ligando efector pero conserve la capacidad de unión al antígeno del anticuerpo parental. El ligando efector para el cual se altera la afinidad puede ser, por ejemplo, un receptor de Fc o el componente C1 del complemento. Este enfoque se describe con mayor detalle, p. ej., en las Patentes de los Estados Unidos 5.624.821 y 5.648.260.

Otra modificación de los anticuerpos de la presente memoria que es contemplada por la invención es la pegilación. Un anticuerpo puede ser pegilado, por ejemplo, para incrementar la vida media biológica (p. ej., en suero) del anticuerpo. Para pegar un anticuerpo, se hace reaccionar típicamente el anticuerpo, o fragmento del mismo con polietilenglicol (PEG), tal como un derivado éster o aldehído reactivo de PEG, en condiciones en las cuales uno o más grupos PEG se anclan al anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Preferiblemente, la pegilación se lleva a cabo por medio de una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula de PEG reactiva (o un polímero soluble en agua reactivo análogo). Según se utiliza en la presente memoria, se pretende que el término "polietilenglicol" incluya cualquiera de las formas de PEG que haya sido utilizada para derivatizar otras proteínas, tales como mono(Cl-CIO)alcoxi- o ariloxi-polietilenglicol o polietilenglicol-maleimida. En ciertas realizaciones, el anticuerpo que se va a pegar es un anticuerpo aglicosilado. Los métodos para pegar proteínas son conocidos en la técnica y se pueden aplicar a los anticuerpos de la invención.

En realizaciones preferidas, la presente descripción proporciona anticuerpos anti-VAP-1 completamente humanos específicos 8C10, 8A4, 3F10, 4B3 y 5F12. En otras realizaciones preferidas, la presente descripción proporciona anticuerpos anti-VAP-1 completamente humanos recombinantes, tales como 8C10, 8A4, 3F10, 4B3 y 5F12 recombinantes. En r8C10 (BTT-1023) recombinante, la cadena pesada consiste en la secuencia de aminoácidos representada en el SEQ ID NO: 47 y la cadena ligera consiste en la secuencia de aminoácidos representada en el SEQ ID NO: 48.

TABLA 1. Secuencias de aminoácidos anti-VAP-1 humanas

SEQ ID NO	Descripción de la secuencia
1	Consenso CDR1 cadena pesada
2	Consenso CDR2 cadena pesada
3	Consenso CDR3 cadena pesada
4	CDR1 cadena pesada 8C10
5	CDR1 cadena pesada 8A4

ES 2 540 566 T3

SEQ ID NO	Descripción de la secuencia
6	CDR1 cadena pesada 3F10
7	CDR1 cadena pesada 5F12
8	CDR1 cadena pesada 4B3
9	CDR2 cadena pesada 8C10
10	CDR2 cadena pesada 8A4
11	CDR2 cadena pesada 3F10
12	CDR2 cadena pesada 5F12
13	CDR2 cadena pesada 4B3
14	CDR3 cadena pesada 8C10
15	CDR3 cadena pesada 8A4
16	CDR3 cadena pesada 3F10
17	CDR3 cadena pesada 5F12
18	CDR3 cadena pesada 4B3
19	Región variable cadena pesada 8C10
20	Región variable cadena pesada 8A4
21	Región variable cadena pesada 3F10
22	Región variable cadena pesada 5F12
23	Región variable cadena pesada 4B3
24	Consenso CDR1 cadena ligera
25	Consenso CDR2 cadena ligera
26	Consenso CDR3 cadena ligera
27	CDR1 cadena ligera 8C10
28	CDR1 cadena ligera 8A4
29	CDR1 cadena ligera 3F10
30	CDR1 cadena ligera 5F12
31	CDR1 cadena ligera 4B3
32	CDR2 cadena ligera 8C10
33	CDR2 cadena ligera 8A4
34	CDR2 cadena ligera 3F10
35	CDR2 cadena ligera 5F12
36	CDR2 cadena ligera 4B3
37	CDR3 cadena ligera 8C10
38	CDR3 cadena ligera 8A4
39	CDR3 cadena ligera 3F10

SEQ ID NO	Descripción de la secuencia
40	CDR3 cadena ligera 5F12
41	CDR3 cadena ligera 4B3
42	Región variable cadena ligera 8C10
43	Región variable cadena ligera 8A4
44	Región variable cadena ligera 3F10
45	Región variable cadena ligera 5F12
46	Región variable cadena ligera 4B3
47	Cadena pesada r8C10 recombinante
48	Cadena ligera r8C10 recombinante

Los anticuerpos anti-VAP-1 completamente humanos se preparan preferiblemente inmunizando ratones en los que se han inactivado los genes de inmunoglobulina de ratón nativa y se han remplazado funcionalmente por todo o parte del repertorio de genes de inmunoglobulina humana. Tales ratones se inmunizan con antígeno VAP-1 y a continuación se generan hibridomas productores de anticuerpos humanos a partir de los ratones utilizando procedimientos normales. Las células de hibridoma clonadas que producen anticuerpos monoclonales que son reactivos con el antígeno VAP-1 se identifican a continuación y se expanden para producir anticuerpos monoclonales completamente humanos purificados.

Los modos alternativos para elaborar un anticuerpo humano incluyen transferir la especificidad de un anticuerpo de animal a una inmunoglobulina humana. Por ejemplo, los ratones se inmunizan con antígeno VAP-1 y a continuación se generan hibridomas productores de anticuerpo a partir de ratones utilizando procedimientos normales. Las células de hibridoma clonadas que producen anticuerpos monoclonales que son reactivos con el antígeno VAP-1 se identifican a continuación y se expanden para producir anticuerpos monoclonales purificados. Se determinan las secuencias de ADNc de las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras y se identifican las regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Las secuencias de aminoácidos de las CDR de las cadenas pesadas y ligeras se utilizan para remplazar las CDR coincidentes de un anticuerpo humano, transfiriendo de ese modo la especificidad del anticuerpo anti-VAP-1 de roedor a un anticuerpo humano. El anticuerpo anti-VAP-1 resultante es completamente humano en el sentido de que, aunque las secuencias de aminoácidos de las CDR originales derivan de roedores, las mismas secuencias de aminoácidos son susceptibles de ser generadas en un anticuerpo derivado de ser humano y no pueden ser definidas con exactitud como específicas de roedores.

Para generar hibridomas productores de anticuerpos monoclonales humanos de la invención, se pueden aislar esplenocitos y/o células de los ganglios linfáticos de ratones inmunizados y se pueden fusionar a una línea celular inmortalizada apropiada, tal como una línea de células de mieloma de ratón. Los hibridomas resultantes se pueden escrutar para determinar la producción de anticuerpos específicos de antígenos. Por ejemplo, se pueden fusionar suspensiones de una sola célula de linfocitos esplénicos de ratones inmunizados a un sexto del número de células de mieloma de ratón no secretoras P3X63-Ag8.653 (ATCC, CRL 1580) con PEG al 50%. Las células se cultivan en placa aproximadamente 2×10^5 en placas de microtitulación de fondo plano, seguido de una incubación de dos semanas en medio selectivo que contiene Clone Serum fetal al 20%, medio acondicionado "653" al 18%, Origen al 5% (IGEN), L-glutamina 4 mM, piruvato de sodio 1 mM, HEPES 5 mM, 2-mercaptoetanol 0,055 mM, 50 unidades/ml de penicilina, 50 mg/ml de estreptomina, 50 mg/ml de gentamicina y IX HAT (Sigma; el HAT se añade 24 horas después de la fusión). Después de aproximadamente dos semanas, las células se pueden cultivar en medio en el que se ha remplazado HAT por HT. A continuación se pueden escrutar los pocillos individuales por medio de ELISA para determinar los anticuerpos IgM e IgG monoclonales humanos. Una vez que se produce el crecimiento intensivo del hibridoma, el medio se puede observar normalmente después de 10-14 días. Los hibridomas secretores de anticuerpo se pueden volver a cultivar en placa, escrutar de nuevo, y si todavía son positivos para IgG humana, se pueden subclonar los anticuerpos monoclonales al menos dos veces mediante dilución limitante. Los subclones estables se pueden cultivar de nuevo in vitro para generar pequeñas cantidades de anticuerpo en el medio de cultivo de tejido para la caracterización. Para purificar anticuerpos monoclonales humanos, se pueden desarrollar los hibridomas seleccionados en dos matraces de agitación de dos litros para la purificación del anticuerpo monoclonal. Los sobrenadantes se pueden filtrar y concentrar antes de la cromatografía de afinidad con proteína A-Sepharose (Pharmacia, Piscataway, NJ.). La IgG eluida se puede verificar mediante electroforesis en gel y cromatografía de alto rendimiento para garantizar la pureza. La disolución tampón se puede cambiar por PBS, y la concentración se puede determinar por medio de DO280 utilizando un coeficiente de extinción de 1,43. Los anticuerpos monoclonales se pueden dividir en alícuotas y almacenar a -80°C .

Los anticuerpos completamente humanos también se pueden producir a partir de bibliotecas de presentación en fagos, que utilizan fagos modificados genéticamente para presentar y producir proteínas de anticuerpos humanos sobre la superficie del fago recombinante. Los anticuerpos de cadena sencilla con una elevada afinidad y especificidad para una diana dada se seleccionan mediante escrutinio y las secuencias de anticuerpos se pueden aislar a continuación del fago para producir un anticuerpo completamente humano recombinante. Tales métodos de presentación en fagos para aislar anticuerpos humanos están establecidos en la técnica. Los anticuerpos monoclonales completamente humanos de acuerdo con la presente invención también se pueden preparar utilizando ratones SCID en los que se han reconstituido células inmunitarias humanas de manera que se puede generar una respuesta de anticuerpos humanos después de la inmunización. Tales ratones describen, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos 5.476.996 y 5.698.767.

Cuando se desea, se puede aislar el ADN que codifica las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo y se pueden fusionar al ADN que codifica cualquier región constante humana, o humana modificada deseada con el fin de producir un constructo de ADN que pueda ser insertado en un vector de expresión y transfectado a un anfitrión de expresión adecuado para producir un anticuerpo completamente humano recombinante. De este modo, los anticuerpos de acuerdo con la presente invención también pueden ser producidos en un transfectoma de células anfitrionas utilizando, por ejemplo, una combinación de mecanismos de ADN recombinante y métodos de transfección génica como es bien sabido en la técnica.

Por ejemplo, para expresar los anticuerpos, o fragmentos de anticuerpo de los mismos, se pueden obtener los ADN que codifican las cadenas ligeras y pesadas completas o parciales, mediante mecanismos de biología molecular convencionales (p. ej., amplificación por PCR o clonación de ADNc utilizando un hibridoma que expresa el anticuerpo de interés) y se pueden insertar los ADN en vectores de expresión de manera que los genes estén conectados operativamente a secuencias de control de la transcripción y la traducción. En este contexto, se pretende que el término "conectado operativamente" signifique que un gen de un anticuerpo está ligado en un vector de manera que las secuencias de control de la transcripción y la traducción dentro del vector sirven para su función pretendida de regulación de la transcripción y la traducción del gen del anticuerpo. El vector de expresión y las secuencias de control de la expresión se seleccionan para que sean compatibles con la célula anfitriona de expresión utilizada. El gen de la cadena ligera del anticuerpo y el gen de la cadena pesada del anticuerpo se pueden insertar en vectores separados o, más típicamente, se insertan ambos genes en el mismo vector de expresión. Los genes de anticuerpos se insertan en el vector de expresión mediante métodos convencionales (p. ej., ligación de sitios de restricción complementarios en el fragmento del gen del anticuerpo y el vector, o ligación de extremos romos si no se encuentran presentes sitios de restricción). Las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas de los anticuerpos descritos en la presente memoria se pueden utilizar para crear genes de anticuerpos completos de cualquier isotipo de anticuerpo insertándolos en vectores de expresión que ya codifican regiones constantes de la cadena pesada y regiones constantes de la cadena ligera del isotipo deseado de manera que el segmento VH está conectado operativamente al segmento o los segmentos constantes de la cadena pesada (CH) dentro del vector y el segmento VK está conectado operativamente al segmento constante de la cadena ligera (CL) dentro del vector. Adicionalmente o alternativamente, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido señal que facilita la secreción de la cadena de anticuerpo desde una célula anfitriona. El gen de la cadena de anticuerpo se puede clonar en el vector de manera que el péptido señal está conectado en marco al extremo amino del gen de la cadena de anticuerpo. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo (esto es, un péptido señal de una proteína distinta de una inmunoglobulina).

Además de los genes de cadenas de anticuerpos, los vectores de expresión recombinantes de la invención portan secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de cadenas de anticuerpos en una célula anfitriona. Se pretende que el término "secuencia reguladora" incluya promotores, intensificadores y otros elementos de control de la expresión (p. ej., señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o la traducción de los genes de las cadenas de anticuerpos, como es bien sabido en la técnica. Los expertos en la técnica apreciarán que el diseño del vector de expresión, incluyendo la selección de las secuencias reguladoras, puede depender de factores tales como la elección de la célula anfitriona que se va a transformar, el nivel de expresión de la proteína deseada, etc. Las secuencias reguladoras preferidas para la expresión de células anfitrionas de mamífero incluyen elementos virales que dirigen niveles elevados de expresión de proteína en células de mamífero, tales promotores y/o intensificadores derivados de citomegalovirus (CMV), Virus de simios 40 (SV40), adenovirus, (p. ej., el promotor tardío principal de adenovirus (AdMLP) y polioma. Alternativamente, se pueden utilizar secuencias reguladoras no virales, tales como el promotor de ubiquitina o el promotor de β -globina. Aún más, los elementos reguladores compuestos por secuencias de diferentes fuentes, tales como el sistema promotor SRalpha, contienen secuencias del promotor temprano de SV40 y la repetición terminal larga del virus de la leucemia de células T humana de tipo 1.

Además de los genes de las cadenas de anticuerpos y de las secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinantes de la invención pueden portar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células anfitrionas (p. ej., orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. Como es bien sabido en la técnica, el gen marcador seleccionable facilita la selección de células anfitrionas en las cuales se ha introducido el vector. Por ejemplo, típicamente el gen marcador seleccionable confiere resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, a una célula anfitriona en la cual se ha introducido el vector. Los genes marcadores seleccionables preferidos incluyen el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) (para su uso en células anfitrionas dhfr- con selección/amplificación por metotrexato) y el gen neo (para la selección por G418).

Para la expresión de las cadenas ligeras y pesadas, los vectores de expresión que codifican las cadenas pesadas y ligeras son transfectados a una célula anfitriona por medio de mecanismos convencionales. Se pretende que las diversas formas del término "transfección" incluyan una amplia variedad de mecanismos comúnmente utilizados para la introducción de ADN exógeno en una célula anfitriona procariota o eucariota, p. ej., electroporación, precipitación con fosfato de calcio, y transfección con DEAE-dextrano. Aunque teóricamente es posible expresar los anticuerpos de la invención en células anfitrionas procariotas o eucariotas, la expresión de anticuerpos en células eucariotas, y muy preferiblemente células anfitrionas de mamífero, es la más preferida debido a que tales células eucariotas, y en particular las células de mamífero, son más propensas que las células procariotas a ensamblar y secretar un anticuerpo adecuadamente plegado e inmunológicamente activo. Se ha hecho referencia a que la expresión procariótica de los genes de anticuerpos es ineficaz para la producción de elevados rendimientos de anticuerpo activo.

Las células anfitrionas de mamífero preferidas para expresar los anticuerpos recombinantes de la invención incluyen células de Ovario de Hámster Chino (células CHO) (incluyendo células CH dhfr- conocidas en la técnica), células de mieloma NSO, células COS y células SP2. Cuando los vectores de expresión recombinante que codifican los genes de anticuerpos se introducen en células anfitrionas de mamífero, los anticuerpos se producen cultivando las células anfitrionas durante un período de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células anfitrionas o, más preferiblemente, la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el cual se desarrollan las células anfitrionas. Los anticuerpos pueden ser recuperados del medio de cultivo utilizando métodos de purificación de proteínas convencionales.

Un aspecto adicional de la presente descripción es proporcionar una molécula de ADN que codifica una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-VAP-1 completamente humano, que comprende una primera secuencia de ADN seleccionada del grupo que consiste en los SEQ ID NO: 49 a 53, y sus variantes de secuencia conservativa, y/o una segunda secuencia de ADN seleccionada del grupo que consiste en los SEQ ID NO: 54 a 58, y sus variantes de secuencia conservativa, y/o una tercera secuencia de ADN seleccionada del grupo que consiste en los SEQ ID NO: 59 a 63, y sus variantes de secuencia conservativa, codificando dichas secuencias de ADN las regiones CDR 1 a 3, respectivamente. De acuerdo con un aspecto concreto, la presente descripción proporciona una molécula de ADN que codifica una región variable de la cadena pesada y que comprende una secuencia de ADN seleccionada del grupo que consiste en los SEQ ID NO: 64 a 68 y sus variantes de secuencia conservativa.

Otro aspecto adicional más de la presente descripción es proporcionar una molécula de ADN que codifica una región variable de la cadena ligera de un anticuerpo anti-VAP-1 completamente humano, que comprende una primera secuencia de ADN seleccionada del grupo que consiste en los SEQ ID NO: 69 a 73, y sus variantes de secuencia conservativa, y/o una segunda secuencia de ADN seleccionada del grupo que consiste en los SEQ ID NO: 74 a 78, y sus variantes de secuencia conservativa, y/o una tercera secuencia de ADN seleccionada del grupo que consiste en los SEQ ID NO: 79 a 83, y sus variantes de secuencia conservativa, codificando dichas secuencias de ADN las regiones CDR 1 a 3, respectivamente. De acuerdo con un aspecto concreto, la presente descripción proporciona una molécula de ADN que codifica una región variable de la cadena pesada y que comprende una secuencia de ADN seleccionada del grupo que consiste en los SEQ ID NO: 84 a 88, y sus variantes de secuencia conservativa.

En una realización, la presente descripción proporciona moléculas de ADN que codifican anticuerpos anti-VAP-1 completamente humanos recombinantes, tales como 8C10, 8A4, 3F10, 4B3 y 5F12 recombinantes. En r8C10 (BTT-1023) recombinante, la cadena pesada está codificada por ADN que comprende la secuencia de polinucleótidos representada en el SEQ ID NO: 89 y la cadena ligera está codificada por ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada en el SEQ ID NO: 90.

TABLA 2. Secuencias de nucleótidos anti-VAP-1 completamente humanas

SEQ ID NO	Descripción de la secuencia
49	CDR1 cadena pesada 8C10
50	CDR1 cadena pesada 8A4
51	CDR1 cadena pesada 3F10
51	CDR1 cadena pesada 5F12
53	CDR1 cadena pesada 4B3
54	CDR2 cadena pesada 8C10
55	CDR2 cadena pesada 8A4

SEQ ID NO	Descripción de la secuencia
56	CDR2 cadena pesada 3F10
57	CDR2 cadena pesada 3F12
58	CDR2 cadena pesada 4B3
59	CDR3 cadena pesada 8C10
60	CDR3 cadena pesada 8A4
61	CDR3 cadena pesada 3F10
62	CDR3 cadena pesada 5F12
63	CDR3 cadena pesada 4B3
64	Región variable cadena pesada 8C10
65	Región variable cadena pesada 8A4
66	Región variable cadena pesada 3F10
67	Región variable cadena pesada 5F12
68	Región variable cadena pesada 4B3
69	CDR1 cadena ligera 8C10
70	CDR1 cadena ligera 8A4
71	CDR1 cadena ligera 3F10
72	CDR1 cadena ligera 5F12
73	CDR1 cadena ligera 4B3
74	CDR2 cadena ligera 8C10
75	CDR2 cadena ligera 8A4
76	CDR2 cadena ligera 3F10
77	CDR2 cadena ligera 5F12
78	CDR2 cadena ligera 4B3
79	CDR3 cadena ligera 8C10
80	CDR3 cadena ligera 8A4
81	CDR3 cadena ligera 3F10
82	CDR3 cadena ligera 5F12
83	CDR3 cadena ligera 4B3
84	Región variable cadena ligera 8C10
85	Región variable cadena ligera 8A4
86	Región variable cadena ligera 310
87	Región variable cadena ligera 5F12
88	Región variable cadena ligera 4B3
89	Cadena pesada r8C10 recombinante

SEQ ID NO	Descripción de la secuencia
90	Cadena ligera r8C10 recombinante

La presente invención proporciona adicionalmente vectores de expresión que comprenden las secuencias de nucleótidos que codifican el presente anticuerpo. Los vectores de expresión adecuados incluyen vectores que contienen elementos importantes para la expresión y secreción de proteínas en células anfitrionas de mamífero. El vector puede comprender ADN que codifica cadenas pesadas o cadenas ligeras humanas, o ambas. Se puede utilizar el mismo vector para la expresión de cadenas tanto pesadas como ligeras o, alternativamente, se pueden utilizar diferentes vectores que contienen cadenas pesadas o ligeras.

En una realización de acuerdo con la presente invención, el vector de expresión comprende la región constante de la cadena pesada de IgG4 humana, modificada para reducir la unión a FcγRI y la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) sustituyendo el residuo de aminoácido leucina 235 por alanina, como se describe en la Patente de los Estados Unidos 5.624.821. La numeración de residuos de la región Fc es la del índice EU de Kabat.

La presente invención todavía proporciona adicionalmente células anfitrionas transfectadas con vectores de expresión de acuerdo con la presente invención. Se puede utilizar cualquier sistema de célula anfitriona/vector apropiado para la expresión de las secuencias de ADN que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo completamente humano. Se pueden utilizar sistemas bacterianos, p. ej. Escherichia coli, y otros sistemas microbianos, en particular para la expresión de fragmentos de anticuerpos tales como fragmentos Fab y F(ab')₂, y especialmente fragmentos Fv y fragmentos de anticuerpo de cadena sencilla p. ej. Fv de cadena sencilla. Se pueden utilizar sistemas de expresión de células anfitrionas eucariotas, p. ej. plantas, levaduras o mamíferos o plantas o animales transgénicos para la producción de productos de anticuerpos más grandes, incluyendo moléculas de anticuerpos completas, y/o si se requieren productos glicosilados. Las células anfitrionas de mamífero adecuadas incluyen células CHO (ovario de hámster Chino) y líneas celulares de mieloma o hibridoma como se ha expuesto anteriormente. Las células anfitrionas preferidas son las células CHO.

Un aspecto adicional de la presente invención es proporcionar un método para producir anticuerpos anti-VAP-1 completamente humanos recombinantes por medio de un proceso que comprende transfectar una célula anfitriona con un vector de expresión que comprende secuencias de ADN que codifican las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo completamente humano de acuerdo con la presente invención bajo el control de promotores y señales de secreción adecuados, y propagar dicha célula anfitriona en condiciones en las que cada cadena es expresada, y aislar dicho anticuerpo anti-VAP-1 completamente humano expresado y ensamblado o los derivados biológicamente reactivos del mismo del cultivo. Los métodos generales por medio de los cuales se pueden construir vectores, los métodos de transfección y los métodos de cultivo son bien conocidos en la técnica.

La presente invención proporciona adicionalmente una composición farmacéutica que comprende un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable y, como ingrediente activo, un anticuerpo anti-VAP-1 completamente humano de acuerdo con la presente invención. La composición de la presente invención contiene anticuerpos anti-VAP-1 completamente humanos de acuerdo con la presente invención en cantidades suficientes para ejercer un efecto antagónico (completo o parcial) sobre la unión de VAP-1 nativa del paciente a los ligandos biológicos de VAP-1 en pacientes que necesitan semejante antagonismo, y específicamente a ligandos de VAP-1 presentados sobre leucocitos.

Las cantidades y los regímenes de administración de los anticuerpos anti-VAP-1 completamente humanos de acuerdo con la presente invención pueden ser determinados fácilmente por los expertos normales en la técnica clínica de tratamiento de trastornos relacionados con la inflamación. Generalmente, la dosificación del tratamiento con anticuerpos anti-VAP-1 completamente humanos variará dependiendo de consideraciones tales como: la edad, el género y la salud general paciente que se vaya a tratar; de la clase de tratamiento concurrente, si lo hubiera; de la frecuencia del tratamiento y de la naturaleza del efecto deseado; del grado de lesión del tejido; de la duración de los síntomas; y de otras variables que deben ser ajustadas por el médico individual. Se puede administrar una dosis deseada en una o más aplicaciones para obtener los resultados deseados. Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención se pueden proporcionar en formas de dosificación unitarias.

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención se pueden administrar en cualquier portador farmacológico apropiado para la administración. Se pueden administrar en cualquier forma que provoque efectos profilácticos, paliativos, preventivos o curativos de afecciones médicas mediadas por VAP en pacientes humanos o animales.

Las composiciones farmacéuticas de los anticuerpos anti-VAP-1 completamente humanos de acuerdo con la presente invención para la administración parenteral y tópica incluyen disolventes, suspensiones y emulsiones acuosos o no acuosos estériles. Los ejemplos de los disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceite vegetal, aceite de pescado, y ésteres orgánicos inyectables. Los portadores acuosos incluyen agua, disoluciones de agua-alcohol, incluyendo vehículos parenterales salinos y en medios tamponados incluyendo

disolución de cloruro de sodio, disolución de dextrosa de Ringer, disolución de dextrosa más cloruro de sodio, disolución de Ringer que contiene lactosa, o aceites fijados. Los vehículos intravenosos incluyen reponedores de fluidos y nutrientes, reponedores de electrolitos, tales como aquellos basados en dextrosa de Ringer. Las composiciones acuosas de acuerdo con la invención pueden comprender agentes tamponadores adecuados, tales como fosfatos de sodio y potasio, tampones de citrato, acetato, carbonato o glicina dependiendo del intervalo de pH elegido como diana. El uso de cloruro de sodio como agente para el ajuste de la tonicidad también resulta útil. Las composiciones pueden incluir otros excipientes, tales como agentes estabilizantes o conservantes. Los excipientes estables incluyen tensioactivos (Polysorbate 20 y 80, poloxámero 407), polímeros (polietilenglicoles, povidonas), carbohidratos (sacarosa, manitol, glucosa, lactosa), alcoholes (sorbitol, glicerol propilenglicol, etilenglicol), proteínas adecuadas (albúmina), aminoácidos adecuados (glicina, ácido glutámico), ácidos grasos (etanolamina), antioxidantes (ácido ascórbico, cisteína, etc.), agentes quelantes (sales de EDTA, histidina, ácido aspártico) o iones metálicos (Ca, Ni, Mg, Mn). Entre los agentes conservantes útiles se encuentran alcohol bencílico, clorobutanol, cloruro de benzalconio y posiblemente parabenos.

La composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención se puede proporcionar en forma concentrada o en forma de polvo para reconstituir a demanda. En tales casos, se pueden utilizar formulaciones de polvo para disolución para excipientes de inyección/infusión mencionados anteriormente. En el caso de la liofilización, se prefieren ciertos crioprotectores, incluyendo polímeros (povidonas, polietilenglicol, dextrano), azúcares (sacarosa, glucosa, lactosa), aminoácidos (glicina, arginina, ácido glutámico) y albúmina. Si se añade disolución para reconstitución al envase, ésta puede consistir, p. ej., en agua pura para inyectables o disolución de cloruro de sodio o disoluciones de dextrosa o glucosa.

La composición de la invención es adecuada para diagnosticar o tratar cualquier afección que implique una reacción inflamatoria en la que la adherencia de VAP-1 juega un papel en la mediación de la transmigración y la infiltración de los leucocitos desde la sangre al sitio de la inflamación. De este modo, la composición es útil para el diagnóstico o tratamiento de artritis inflamatorias y enfermedades del tejido conectivo tales como artropatías reactivas, artropatías postinfecciosas, poliartropatías inflamatorias, trastornos sistémicos del tejido conectivo, espondilopatías inflamatorias, miositis, sinovitis, enfermedad de Reiter, artritis reumatoide seropositiva, artritis reumatoide, enfermedad reumatoide extraarticular, artropatías psoriásicas y enteropáticas, artritis juvenil, artritis, poliarteritis nodosa y afecciones relacionadas, vasculopatías necrotizantes, dermatopolimiositis, esclerosis sistémica, enfermedades con implicación sistémica del tejido conectivo, espondilitis anquilosante y otras espondiloartropatías inflamatorias. Además, enfermedades inflamatorias intestinales tales como la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa, las dermatosis tales como los trastornos bulosos, la dermatitis, los trastornos papuloescamosos, el eritema, el líquen escleroso y atrófico, craurosis vulvar, el lupus eritematoso discoide, la morfea, el pénfigo, el pénfigoide, la dermatitis herpetiforme, la dermatitis atópica, la dermatitis de contacto alérgica, la dermatitis de contacto irritante, la dermatitis de contacto, la psoriasis, el eritema multiforme, enfermedades inflamatorias tales como la esclerosis múltiple, la neuropatía inflamatoria, la miopatía inflamatoria, la encefalomielitis diseminada aguda, la vasculitis del sistema nervioso central, el síndrome de Sjögren, la diabetes, el lupus eritematoso generalizado, el asma y la enfermedad inflamatoria del hígado, la enfermedad de Graves y la tiroiditis, la aterosclerosis, la inflamación del ojo incluyendo uveitis, iritis, iridociclitis, la hepatitis alcohólica, el trasplante con aloinjerto, el trasplante con xenoinjerto, la glomerulonefritis, la lesión por reperfusión y las afecciones inflamatorias agudas después del infarto de miocardio y el ictus pueden ser adecuadas para el diagnóstico o el tratamiento por medio de la composición de la invención.

Los anticuerpos anti-VAP-1 completamente humanos terapéuticamente útiles de acuerdo con la presente invención se pueden conjugar, químicamente o mediante ingeniería genética, con otros agentes, que proporcionan el direccionamiento de los anticuerpos al sitio deseado de acción. Alternativamente, se pueden conjugar otros compuestos, químicamente o por medio de ingeniería genética, con los anticuerpos de acuerdo con la presente invención, con el fin de intensificar o proporcionar otras propiedades adicionales a los anticuerpos, especialmente propiedades, que intensifican la capacidad de los anticuerpos para promover el alivio de los efectos nocivos mediados por la unión a VAP-1.

Los anticuerpos anti-VAP-1 completamente humanos de acuerdo con la presente invención pueden ser marcados, químicamente o mediante ingeniería genética, para proporcionar anticuerpos detectables. Tales anticuerpos marcados serán herramientas útiles para la formación de imágenes de los sitios de inflamación en seres humanos, especialmente para la formación de imágenes inmunoescintográficas in vivo de los sitios de inflamación. Este tipo de formación de imágenes puede remplazar el método de formación de imágenes de leucocitos más engorroso y costoso utilizado en la actualidad. Con el propósito de tomar imágenes, será preferible el uso de fragmentos de anticuerpos frente al enfoque de utilización de anticuerpos completos para la terapia anti-inflamatoria y los fragmentos derivados de anticuerpos completamente humanos deber ser aún más segura que sus equivalentes quiméricos o de ratón.

Los presentes anticuerpos se pueden utilizar para disminuir o tratar la inflamación, in vivo, en el organismo humano, mediante la administración, a un paciente humano que necesite semejante tratamiento, de niveles eficaces del anticuerpo anti-VAP-1 completamente humano de acuerdo con la presente invención. Se pretende que el término "tratamiento" o "tratar" incluya la administración de anticuerpos anti-VAP-1 completamente humanos a un sujeto con fines que pueden incluir la profilaxis, el alivio, la prevención o la curación de trastornos mediados por eventos de

adherencia de VAP-1. Los anticuerpos anti-VAP-1 concretos adecuados para tal fin son anticuerpos anti-VAP-1 completamente humanos recombinantes purificados de la presente invención.

Por "nivel eficaz" de un anticuerpo anti-VAP-1 completamente humano se quiere significar un nivel en el que los efectos nocivos de los eventos mediados por VAP-1, como mínimo, mejoran. Una cantidad eficaz del anticuerpo de la presente invención es aquella que es suficiente para bloquear, o bloquear parcialmente, la unión endotelial de los leucocitos con el fin de inhibir la infiltración de los leucocitos a los sitios inflamatorios, donde semejante infiltración es nociva o no deseada. Las cantidades y los regímenes de administración de los anticuerpos anti-VAP-1 completamente humanos pueden ser determinados fácilmente por los expertos en la técnica clínica de tratamiento de trastornos relacionados con la inflamación. Preferiblemente, los anticuerpos anti-VAP-1 completamente humanos de acuerdo con la presente invención se proporcionan intravascularmente a intervalos que oscilan entre una vez a la semana y una vez cada tres meses a dosis en el intervalo de 0,01 a 20 mg/kg, más preferiblemente en el intervalo de 0,1 a 10 mg/kg, muy preferiblemente de 0,5 a 5 mg/kg. Alternativamente, los anticuerpos anti-VAP-1 completamente humanos de acuerdo con la presente invención se proporcionan subcutáneamente a intervalos que oscilan entre una vez a la semana y una vez cada tres meses a dosis en el intervalo de 0,1 a 20 mg/kg, más preferiblemente en el intervalo de 0,2 a 10 mg/kg, muy preferiblemente de 0,5 a 5 mg/kg.

Ejemplos

Ejemplo 1

Aislamiento de hibridomas que expresan anticuerpo monoclonal anti-VAP-1 humano

Se utilizó la cepa de ratón transgénica para inmunoglobulina humana (HuMAb Mouse®; Medarex Inc.) para desarrollar células de hibridoma que expresaban anticuerpo monoclonal anti-VAP-1 humano. HuMAb Mouse® contiene miniloci del gen de inmunoglobulina humana que codifican secuencias de inmunoglobulina de cadena pesada (μ y γ) y de cadena ligera κ no reordenadas, junto con las mutaciones elegidas como diana que inactivan los loci de la cadena μ y κ endógenas (véase p. ej., Lonberg, et al. (1994) Nature 368(6474): 856-859). Por consiguiente, los ratones mostraron una expresión reducida de IgM o κ de ratón, y en respuesta a la inmunización, los transgenes de la cadena pesada y ligera humanas introducidos experimentan un cambio de clase y una mutación somática para generar anticuerpos monoclonales IgG κ humanos de alta afinidad. La preparación y el uso de ratones HuMAb, y las modificaciones genómicas llevadas a cabo por los ratones, se describen p. ej. en las Patentes de los Estados Unidos 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.789.650; 5.877.397; 5.661.016; 5.814.318; 5.874.299; y 5.770.429; todas de Lonberg y Kay; la Patente de los Estados Unidos 5.545.807 de Surani et al; Publicaciones PCT WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 y WO 99/45962, todas de Lonberg y Kay; y Publicación PCT WO 01/14424 de Korman et al.

Cuando se inmunizan con VAP-1 humana recombinante (rhVAP-1), este ratón transgénico produce anticuerpos IgG específicos humanos contra VAP-1 humana.

El esquema de inmunización fue el siguiente: los ratones fueron inmunizados mediante múltiples inyecciones intraperitoneales y subcutáneas de rhVAP-1 purificada a partir de células CHO transfectadas establemente con un plásmido de expresión que contenía ADNc de VAP-1 humana y que expresaba VAP-1 humana (Smith et al., J. Exp. Med. (1998) 188:17-27) mezclada con coadyuvante completo de Freund seguido de rhVAP-1 mezclada con coadyuvante incompleto de Freund o rhVAP-1 mezclada con coadyuvante Ribi. Las muestras de suero de los ratones inmunizados se analizaron para determinar el estado inmunitario controlado por un ELISA de captura de anticuerpo utilizando rhVAP-1 inmovilizada y Fluorometric Microvolume Assay Technology (FMAT) utilizando células CHO transfectadas establemente con un plásmido de expresión que contenía ADNc de VAP-1 humana y que expresaba VAP-1 humana. Se administraron inyecciones de refuerzo finales de rhVAP-1 intravenosamente e intraperitonealmente antes de la esplenotomía.

Los hibridomas que expresaban el anticuerpo monoclonal anti-VAP-1 humano se obtuvieron fusionando células de mieloma P3x63Ag8.653 (ATCC CRL 1580) con esplenocitos de ratones inmunizados como antes utilizando polietilenglicol (PEG) como fusionógeno. Los sobrenadantes de hibridoma se escrutaron inicialmente por medio de ELISA para determinar la presencia de anticuerpos IgG humanos con una cadena ligera kappa. Las células positivas para IgG humana se escrutaron a continuación mediante ELISA sobre rhVAP-1 y mediante FMAT para determinar la unión a VAP-1 expresada sobre la superficie de células CHO transfectadas establemente con un plásmido de expresión que contiene un ADNc de VAP-1 humana. Se seleccionaron cinco clones de hibridoma IgG1 anti-VAP-1 humana, a saber 5F12, 4B3, 3F10, 8A4 y 8C10.

Ejemplo 2

Propiedades de unión a VAP-1 de los anticuerpos 5F12, 4B3, 3F10, 8A4 y 8C10 completamente humanos

Se utilizó un análisis inmunofluorométrico resuelto en el tiempo para examinar cuantitativamente la unión de 5F12, 4B3, 3F10, 8A4 y 8C10 a rhVAP-1. Se recubrió una placa de microtitulación con rhVAP-1 y a continuación se bloqueó con disolución de albúmina de suero bovino. Con posterioridad se añadió una cantidad de anticuerpo entre 2 y 4320 ng/ml para la unión a rhVAP-1 y el anticuerpo unido se detectó por medio de un anti-anticuerpo humano de

ratón conjugado con europio (Perkin Elmer Inc.). La marca se detectó midiendo la fluorescencia resuelta con el tiempo (contador multi marca Victor³, Perkin Elmer Inc.) a 615 nm. Los recuentos de fluorescencia se correspondían directamente con cuándo anticuerpo se había unido a su diana. Los datos de las muestras se analizaron a continuación en comparación con la curva patrón de referencia. Los datos muestran que 5F12, 4B3, 3F10, 8A4 y 8C10 se unen a rhVAP-1 y las afinidades (Kd) se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Unión de mAb 5F12, 4B3, 3F10, 8A4 y 8C10 a rhVAP-1

mAb	Kd (nM)
8C10	0,21
3F10	0,25
4B3	0,31
8A4	0,28
5F12	0,65

Ejemplo 3

Preparación de ADNc, clonación y secuenciación de las regiones variables de los anticuerpos 5F12, 4B3, 3F10, 8A4 y 8C10 completamente humanos

Con el fin de construir anticuerpos recombinantes, se aislaron los ADNc que codificaban las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras humanas de los anticuerpos obtenidos en el Ejemplo 1 y se clonaron en vectores plasmídicos para el análisis de la secuencia.

Los clones de ADNc de las regiones variable de la cadena pesada (V_H) y variable de la cadena ligera (V_L) de la inmunoglobulina (Ig) humana se obtuvieron de las células de hibridoma que expresaban los anti-VAP-1 5F12, 4B3, 3F10, 8A4 y 8C10 de la siguiente manera. El ARN total se preparó a partir de 5×10^6 células de hibridoma utilizando el kit RNeasy de Qiagen. Los ADNc de V_L y V_H se prepararon mediante transcripción inversa de ARN seguido del procedimiento de "amplificación rápida de los extremos de ADNc (RACE)" utilizando "el kit de amplificación de ADNc SMART RACE" y el "Advantage-HF 2 PCR kit" de alta fidelidad de BD Biosciences Clontech. Los productos amplificados por PCR se purificaron a continuación, se clonaron en el vector pCR4-TOPO TA (Invitrogen) y se transformaron en la cepa de E. coli, TOP10 (Invitrogen). Los ADN de la Miniprep para los clones plasmídicos de V_L y V_H para cada uno de 5F12, 4B3, 3F10, 8A4 y 8C10 se secuenciaron y las secuencias de nucleótidos y de proteínas correspondientes deducidas se muestran en las Figuras 1 a 6.

Ejemplo 4

Construcción de un vector de expresión de mamífero para expresar mAb r8C10 recombinante

Se insertaron las regiones variables de 8C10 en un vector de expresión de mamífero apropiado que contenía regiones constantes de las cadenas pesadas y ligeras apropiadas, como se describe más abajo, con el fin de producir un anticuerpo r8C10 recombinante funcional (denominado BTT-1023) en células CHO.

Se sabe que la región Fc de un anticuerpo determina la capacidad de los complejos de anticuerpo/antígeno para dirigir las respuestas inmunitarias. El propósito era producir anticuerpos terapéuticos que bloquearan la unión de los leucocitos al endotelio vascular y no reclutaran ninguna función efectora. Por lo tanto se utilizó en el vector de expresión la región constante de la cadena pesada de la IgG4 humana, modificada para reducir la unión de FcγRI y la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) sustituyendo el aminoácido leucina 235 por alanina, como se describe en la patente de los Estados Unidos 5624821. Los ADNc de V_L y V_H de 8C10 se amplificaron para que contuvieran sitios de clonación apropiados y una secuencia consenso de Kozak óptima en el extremo 5' utilizando PCR Supermix (Invitrogen). Se diseñaron cebadores de PCR directos e inversos para que tuvieran sitios de restricción apropiados para la clonación. Los productos de la PCR, que incluyen las secuencias señal de V_L y V_H nativas respectivamente, se purificaron y se clonaron en un vector plasmídico que portaba una región constante de la cadena ligera kappa humana y una cadena pesada gamma 4 humana que contenía las mutaciones serina 228 por prolina y leucina 235 por alanina y se denominó pICO-g4PA(VAP1.8C10), generando plásmidos que después se transformaron en células de E. coli TOP10. Las regiones V_L y V_H del plásmido se secuenciaron para confirmar la integridad de los productos de la PCR clonados.

La cadena ligera de 8C10 se amplificó mediante PCR para que contuviera un sitio de clonación *HindIII* y una secuencia consenso de Kozak óptima en el extremo 5', y un sitio de clonación *EcoRI* en el extremo 3', utilizando el plásmido pICO-g4PA(VAP1.8C10) como molde y PCR Supermix. El producto de la PCR, que incluye la secuencia señal de la cadena ligera de 8C10 nativa, se digirió con *HindIII* y *EcoRI*, se purificó y se clonó en el vector de

expresión pEE12.4, que se obtuvo de Lonza Biologies, en los sitios *HindIII* y *EcoRI*, generando el plásmido 2116. El plásmido 2116 se transformó células de *E. coli* competentes DH5 α Max Efficiency (Invitrogen Inc.).

La cadena pesada de 8C10 se amplificó mediante PCR para que contuviera un sitio de clonación *HindIII* y una secuencia consenso de Kozak óptima en el extremo 5', y un sitio de clonación *EcoRI* en el extremo 3', utilizando el plásmido pCO-g4PA(VAP1.8C10) como molde y PCR Supermix. El producto de la PCR, que incluye la secuencia señal de la cadena pesada de 8C10 nativa, se digirió con *HindIII* y *EcoRI*. EL fragmento que contenía la cadena pesada de 8C10 se purificó y se clonó en el vector de Lonza pEE6.4, que se obtuvo de Lonza Biologies, en los sitios *HindIII* y *EcoRI*, generando el plásmido 2117. El plásmido 2117 se transformó en células competentes DH5 α Max Efficiency. Los plásmidos 2116 y 2117 se digirieron con *Sall* y *NotI*, y el fragmento más grande de cada producto digerido se ligó utilizando ADN ligasa de T4 dando como resultado el plásmido 2118 [2118-pEE12.4-VAP1(8C10)]. El plásmido 2118 se transformó en células competentes DH5 α Max Efficiency. El ADN que codificaba la cadena pesada y ligera completas se secuenció para confirmar la exactitud y la integridad de la secuencia.

Ejemplo 5

Expresión del anticuerpo BTT-1023 completamente humano recombinante en células CHO

Se produjo el anticuerpo BTT-1023 completamente humano a partir de células CHO como sigue. El ADN del plásmido 2118-pEE12.4-VAP1(8C10) se linealizó con *PvuI*. El ADN se transfectó por electroporación en células CHOK1SV obtenidas de Lonza Biologies. Las células se cultivaron a continuación en placa a 50 μ L/pocillo en placas de 96 pocillos (2,5 x 10³ células/pocillo) en medio post-transfección de CHO (Número de Catálogo Núm. 04-0119, Gibco Invitrogen Inc.) definidas químicamente (DC) (CHO DC libre de L-glutamina + 1X suplemento de GS (glutamina sintetasa) + 2,16 mg/L de timidina). A continuación las placas se alimentaron 24 horas después con 150 μ L/pocillo de medio de selección CHO DC (CHO DC libre de L-glutamina + 1X suplemento GS + 2,16 mg/L de timidina + MSX 66,6 μ M (metionina sulfoximina) o MSX 133,3 μ M) dando como resultado una concentración de MSX global final 50 μ M o 100 μ M. Los niveles de producción de anticuerpo por las colonias resistentes a MSX se midieron mediante un ELISA sándwich de IgG humana. Las colonias que producían elevados niveles de anticuerpo se seleccionaron para determinar la expansión en medio de expansión de CHO DC (CHO DC libre de L-glutamina + 1X suplemento de GS + 2,16 mg/L de timidina + MSX 50 μ M o MSX 100 μ M), primero a placas de 24 pocillos, después a matraces T. Las células se expandieron en matraces oscilantes antes de la preparación de un banco de células de transfectoma (TCB) en 5 viales. Se seleccionó la línea celular 15B7 a partir de las placas de MSX 50 μ M y se mantuvo en medio de expansión de CHO DC que contenía MSX 50 μ M. Se produjo anticuerpo cultivando las células CHO transfectadas como antes para generar medio acondicionado a partir del cual se pudo purificar BTT-1023 utilizando técnicas convencionales para purificar anticuerpos monoclonales a partir de sobrenadante de cultivo.

Ejemplo 6

Propiedades de unión del anticuerpo BTT-1023 completamente humano recombinante

Se utilizó un análisis inmunofluorométrico resuelto en el tiempo para examinar cuantitativamente la unión de BTT-1023 a rhVAP-1. Se recubrió una placa de microtitulación con rhVAP-1 y a continuación se bloqueó con disolución de albúmina de suero bovino. Con posterioridad se añadió una cantidad de BTT-1023 entre 2 y 4320 ng/ml para la unión a VAP-1 y se detectó el BTT-1023 unido por medio de un anti-anticuerpo humano de ratón conjugado con europio (Perkin Elmer Inc.). La marca se detectó midiendo la fluorescencia resuelta en el tiempo (contador multimarca Victor³, Perkin Elmer Inc.) a 615 nm. Los recuentos de fluorescencia se correspondían directamente con cuánto BTT-1023 se había unido a su diana. Los datos de las muestras se analizaron a continuación en comparación con una curva patrón de referencia. Los datos demuestran que BTT-1023 se une a VAP-1 humana recombinante con una afinidad (Kd) de 0,38 nM.

Se utilizó un análisis de unión directa en tiempo real utilizando un análisis de resonancia de plasmón superficial de Biacore para analizar la cinética de unión de rhVAP-1 a BTT-1023. La proteína G' biotinilada (Sigma) inmovilizada sobre un chip recubierto con estreptavidina (Biacore AB) se utilizó para capturar BTT-1023 a partir de la fase móvil. Cada ronda consistió en dos fases sucesivas: una inyección de mAb BTT-1023 y una inyección de analito de unión a ligando (rhVAP-1). Se utilizaron cantidades constantes de rhVAP-1 como analito para la concentración saturante de los mAb (ligandos). Los experimentos se llevaron a cabo utilizando un equipo BIAlite (Biacore AB) y los datos se analizaron utilizando el soporte lógico de Biacore. Los datos demuestran que la VAP-1 humana recombinante se une a BTT-1023 con una afinidad (Kd) de 0,13 nM.

La unión del BTT-1023 completamente humano a VAP-1 humana se analizó por medio de tinción por inmunofluorescencia y citometría de flujo. Para la citometría de flujo, se utilizaron células transfectadas de una línea de células endoteliales de rata (células Ax) que expresaba ADNc de VAP-1 humana (Smith et al., J. Ex. Med. (1998) 188:17-27). Éstas se hicieron crecer en matraces de 175 cm³ en medio RPMI 1640 (Sigma) con un suplemento de FCS (suero de ternera fetal) al 20%, L-glutamina 2 mM, piruvato de Na 1 mM, β -ME (beta-mercaptoetanol) 10 μ M, aminoácidos no esenciales al 1%, 100 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomycin y 0,75 mg/ml de GeneticinaTM. Con el fin de liberar las células, éstas se lavaron dos veces con PBS (solución salina tamponada con fosfato) y se incubaron en 10 ml de Tampón de Disociación Celular (Gibco BRL) durante 3 min a 37°C. Después de

la adición de 10 ml de medio, las células se sedimentaron (5 min, 1000 g, a la temperatura ambiente), se resuspendieron en tampón de lavado [PBS, BSA (albúmina de suero bovino) al 0,1% (p/v), NaN_3 al 0,1% v/v] a 10^6 células/ml y se mantuvieron sobre hielo.

5 La suspensión celular (100 μl /pocillo) se transfirió a placas de 96 pocillos, las células se sedimentaron (4 min, 1000 g, 10°C) y se añadieron alícuotas de 100 μl de disolución de anticuerpo a los pocillos. Después de una incubación de 30 min sobre hielo, las células se lavaron tres veces con 150 μl de tampón de lavado/pocillo y a continuación se incubaron con 100 μl de anti-IgG humana (específica de Fc, Sigma) conjugado con FITC (isotiocianato de fluoresceína) de 39 $\mu\text{g}/\text{ml}$ durante 30 minutos sobre hielo. Finalmente, las células se lavaron como antes y se fijaron añadiendo 100 μl de Tampón de Lavado con formaldehído al 1% (v/v) y se mantuvieron a 4°C hasta su análisis en un citómetro de flujo. Las muestras de control se tiñeron con anticuerpo secundario anti-IgG humana conjugado con FITC solo.

Todas las muestras de la citometría de flujo se analizaron en un FACScan™ (Becton Dickinson). Para cada muestra, se recogieron los datos para un mínimo de 10.000 eventos acotados y se calculó el canal medio geométrico de fluorescencia utilizando el soporte lógico Lysys II.

15 BTT-1023 se unió específicamente a VAP-1 humana como se muestra mediante la tinción de las células Ax transfectadas que expresan VAP-1 sobre su superficie (Figura 7).

Ejemplo 7

Características funcionales de BTT-1023

Se utilizó un análisis de trans migración in vitro para someter a ensayo la capacidad funcional de BTT-1023 para inhibir la trans migración de leucocitos a través de una monocapa endotelial. Se hizo crecer una monocapa de células endoteliales de rata Ax, transfectadas con el fin de expresar VAP-1 humana recombinante sobre su superficie, en la cámara superior de un aparato Transwell (Becton Dickinson). Las células mononucleares de sangre periférica humana recién aisladas se colocaron en las cámaras de más arriba y se permitió que migraran hacia el péptido quimioatrayente de monocitos fMLP (N-formil-metionil-leucil-fenilalanina, 100 nM) a las cámaras de más abajo durante 2 horas. Las monocapas se trataron con BTT-1023 o con BTT-1008, un anticuerpo de control negativo sin unión con una región constante humana (Kirton et al., Eur. J. Immunol. (2005) 35:3119-30) o con BTT-1002, un mAb anti-VAP-1 quimérico de control positivo que se sabe que bloquea la adherencia y la trans migración mediadas por VAP-1. Las células que migraron a través de la monocapa se recogieron de la cámara de más abajo y se contaron microscópicamente. BTT-1023 redujo significativamente la migración de las células a través de la capa de células endoteliales a 10 ng ml^{-1} , y bloqueó la migración a $1 \mu\text{g ml}^{-1}$. El anticuerpo BTT-1008 de control negativo no tuvo efecto a $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ mientras el BTT-1002 de control positivo también bloqueó la trans migración completamente a $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ como se observa en la Figura 8.

Ejemplo 8

35 Propiedades farmacocinéticas mejoradas del anticuerpo BTT-1023 completamente humano recombinante en comparación con el anticuerpo quimérico BTT-1002

Se administraron 25 mg/kg de BTT-1023 a dos titis hembra (primates no humanos), mediante inyección intravenosa en embolada. Se recogieron muestras de sangre para el análisis de la concentración de BTT-1023 10 minutos, 1, 3, 6, 24, 48, 72 y 144 horas después de la dosificación.

40 Un análisis inmunofluorométrico resuelto en el tiempo para la cuantificación de la concentración de analito (BTT-1002 o BTT-1023) en suero de titi utiliza un anticuerpo policlonal de conejo específico de analito conjugado con biotina como captador sobre una placa de microtitulación recubierta con estreptavidina. Tales anticuerpos policlonales se elaboraron por medio de inmunización repetida de los conejos con BTT-1002 o BTT-1023, recogida de suero y purificación por afinidad de los anticuerpos policlonales anti-BTT-1002 o anti-BTT-1023 resultantes. La detección de analito unido se realizó utilizando un anticuerpo secundario conjugado con europio. La marca se detectó midiendo la fluorescencia resuelta en el tiempo (contador multimarca Victor³, Perkin Elmer Inc.) a 615 nm. Los recuentos de fluorescencia se correspondían directamente con cuánto analito estaba presente en la muestra. Los datos de las muestras se analizaron a continuación en comparación con una curva patrón de referencia.

50 Se determinaron los parámetros farmacocinéticos utilizando el análisis no compartimental. Cuando se compararon con los datos derivados de un estudio similar realizado con BTT-1002, en el que se administraron intravenosamente 40 mg/kg a cada uno de los dos titis hembra, el anticuerpo para VAP-1 completamente humano muestra mejores propiedades farmacocinéticas con un perfil de concentración en suero mejorado a lo largo del tiempo (AUC) y una vida media de eliminación prolongada (Tabla 4).

Tabla 4. Propiedades farmacocinéticas de BTT-1023 en comparación con BTT-1002

Dosis (mg/kg)	AUC _(0-último) (µg*h/mL)	AUC _(0-∞) (µg*h/mL)	T _½ (h)	V _d (ml/kg)
25 de BRR-1023	33200	55100	120	71
25 de BTT-1023	20600	23900	53	69
40 de BTT-1002	19100*	19100*	25*	75*

*media de n=2

Ejemplo 9

10 Composiciones farmacéuticas de los anticuerpos completamente humanos

Ejemplos de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-VAP-1 completamente humano de acuerdo con la presente invención, adecuada para la administración parenteral, administrada como una solución para inyectable o para infusión o en forma de producto concentrado para semejante disolución.

	Cantidad porcentual de ingrediente con respecto a 1 ml de anticuerpo anti-VAP-1	0,1 - 10%
15	Cloruro de sodio o cloruro de potasio	0,5 - 1,5%
	Hidrogenofosfato disódico dihidratado	0,1 - 2%
	Dihidrogenofosfato de sodio o potasio	0,1 - 2%
	Sacarosa	0,5 - 10%
	Polysorbate 20 u 80	0,01 - 1%
20	Agua para inyectables	hasta 1 ml
	Cantidad porcentual de ingrediente con respecto a 1 ml de anticuerpo anti-VAP-1	0,1 - 10%
	Cloruro de sodio	0,5 - 1,5%
	EDTA / DTPA	0,01 - 1,5%
	Manitol	0,1 - 5 %
25	Polysorbate 20 u 80	0,01 - 1 %
	Citrato de sodio en forma de dihidrato	0,5 - 5%
	Agua para inyectables	hasta 1 ml

Ejemplo 10

Eficacia de anticuerpos completamente humanos en modelos in vivo de inflamación

30 Eficacia del tratamiento con anticuerpo para VAP-1 completamente humano en la artritis inducida por colágeno en mono rhesus

Se evalúa el efecto de los anticuerpos completamente humanos en el modelo de artritis inducida por colágeno (CIA) en el mono rhesus cuyo objeto es reunir datos de la utilidad del anticuerpo BTT 1023 en indicaciones artríticas.

35 Se seleccionan para el estudio monos rhesus adultos, negativos en términos de MHC A26, que tienen una incidencia de CIA de 99%, inmunizados con colágeno de tipo II bovino. Se dividen diez animales en dos grupos de cinco animales. Se induce la artritis inyectando 3-5 mg de colágeno bovino en coadyuvante completo de Freund en 10 aplicaciones en el dorso del animal. Utilizando este enfoque, la artritis es clínicamente evidente a las 3 - 5 semanas de la inmunización y dura normalmente 7-9 semanas.

40 El tratamiento intravenoso de cuatro semanas con los anticuerpos completamente humanos a dosis entre 1 y 50 mg/kg dos veces por semana se inicia cuando se detecta un nivel de CRP > 20 mg/l en dos registros

consecutivos. La disolución de vehículo se administra a los animales de control. Se evalúa el estado de los animales utilizando una puntuación clínica global (0 = sin síntomas clínicos de artritis, 0,5 = fiebre ($> 0,5^{\circ}\text{C}$), 1 = apatía, movilidad reducida y pérdida de apetito, 2 = pérdida de peso, extremidades y/o articulaciones calientes, dolor pero sin hinchazón de tejidos blandos (STS), 3 = enrojecimiento moderado y STS de las articulaciones, flexibilidad normal de las extremidades, 4 = enrojecimiento grave y STS de las articulaciones, sin rigidez de la articulación, 5 = artritis tan grave que está indicada la eutanasia), y puntuación de la gravedad de CIA (la gravedad de la hinchazón de los tejidos blandos, flexibilidad y crepitación puntuadas en una escala de - a +++: - ninguna, $\pm$ dudosa, + moderada, ++ grave, +++ extrema). Todos estos parámetros dan como resultado una puntuación clínica global de la gravedad de la CIA que es una escala semi-cuantitativa.

- 10 Eficacia de los anticuerpos para VAP-1 completamente humanos en el tratamiento de la artritis inducida por anticuerpos contra el colágeno en ratón con VAP-1 humanizada

Se puede evaluar la eficacia de los anticuerpos completamente humanos sobre la artritis inducida por anticuerpos contra el colágeno en ratones transgénicos que expresan VAP-1 humana sobre el endotelio. Se induce una artritis que progresa rápidamente inyectando un cóctel de anticuerpos seguido de lipopolisacárido intraperitoneal tres días más tarde. Se administran dosis intravenosas de 3, 10 o 30 mg kg^{-1} del anticuerpo completamente humano a los ratones los días 1, 3 y 7. Los animales de control reciben vehículo. Se puede demostrar una reducción de la enfermedad artrítica, como evidencian las reducciones estadísticamente significativas de la puntuación artrítica en comparación con los controles.

Eficacia del tratamiento con anticuerpo para VAP-1 en un modelo de psoriasis de ratón humanizado

- 20 El reciente establecimiento y la validación de un modelo de xenotransplante humanizado han proporcionado una herramienta valiosa para incrementar la comprensión de esta enfermedad y para someter a ensayo nuevas terapias con fármacos (Nickoloff BJ. Expert Opin. Investig. Drugs. (1999) 8:393-401).

En este modelo, se transplantan biopsias de piel de grosor completo, sin lesión procedentes de pacientes psoriásicos a ratones con inmunodeficiencia combinada grave (SCID) anestesiados de aproximadamente 7-9 semanas de edad, como se ha descrito previamente (Wrone-Smith T. et al. J. Clin. Invest. (1996) 98:1878-1887). Se permite que los animales se recuperen de la cirugía durante al menos 2-3 semanas antes de la inducción de la enfermedad. Se aíslan células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) a partir de una muestra de sangre tomada en la biopsia y se activan con el superantígeno SEB (enterotoxina B Estafilocócica). La inyección de las PBMC activadas, intravenosamente o intradérmicamente en el xenoinjerto, induce la enfermedad.

- 30 El anticuerpo para VAP-1 completamente humano o el vehículo se administran intravenosamente o subcutáneamente. Son posibles regímenes de dosificación tanto profilácticos como terapéuticos de diferente duración. Además, se pueden inyectar intravenosamente células T humanas marcadas después del tratamiento con anticuerpo para VAP-1 completamente humano con el fin de investigar el efecto sobre la infiltración celular con más detalle.

35 Al final del período de tratamiento, los ratones se sacrifican y los injertos se escinden junto con piel circundante del ratón y se fijan en formalina o se congelan instantáneamente en nitrógeno. Se realizan la histología y la inmunohistoquímica con el fin de puntuar los cambios patológicos como cambios en el grosor de la epidermis, infiltración celular, y expresión de las moléculas de adherencia. Se puede demostrar una reducción en la enfermedad psoriásica, como evidencian las reducciones estadísticamente significativas en la puntuación en comparación con los controles.

Eficacia del anticuerpo para VAP-1 completamente humano en el tratamiento de la inflamación del hígado resultante de la administración de CCl_4 al ratón con VAP-1 humanizada

El efecto del anticuerpo para VAP-1 completamente humano sobre la inflamación del hígado y la fibrosis se evalúa en un modelo murino de fibrosis del hígado resultante de la administración de CCl_4 . Se inyectan 0,25 $\mu\text{l/g}$ de CCl_4 ip dos veces por semana durante 12 semanas a ratones transgénicos que expresan VAP-1 humana en el endotelio. Se desarrollan una inflamación del hígado y unas cicatrices considerables a lo largo de 12 semanas, pero, al cesar las inyecciones de CCl_4 , las cicatrices se resuelven completamente. La eficacia del anticuerpo completamente humano administrado i.v. o i.p. a dosis entre 1 y 25 mg/kg dos veces por semana en la prevención de la lesión y la resolución de las fibrosis existentes utilizando este modelo se investiga por medio de la puntuación de los cambios patológicos e histológicos en el hígado. Se puede demostrar una reducción de la enfermedad, como evidencian las reducciones estadísticamente significativas en la puntuación en comparación con los controles.

Eficacia del tratamiento con anticuerpo para VAP-1 en un modelo de infarto de miocardio agudo en conejo anestesiado

Se realiza una toracotomía izquierda en conejos blancos New Zealand ventilados mecánicamente anestesiados. El corazón se expone y se aísla la arteria coronaria izquierda (LCA) y se ocluye. El anticuerpo para VAP-1 completamente humano se administra intravenosamente 25 minutos después del inicio de la oclusión. Cinco minutos después de la administración del anticuerpo, la oclusión se elimina y a continuación se reperfunde la zona

hasta durante 6 horas. El animal se sacrifica por medio de una sobredosis del anestésico utilizado y el corazón se retira y se enjuaga con solución salina. De nuevo se ocluye la LCA y se perfunde Azul Monastral o de Evans a través del corazón, coloreando el miocardio, pero dejando la zona en riesgo sin colorear. El corazón se congela y el ventrículo izquierdo se corta en secciones finas. Se determinan las secciones cortadas totales y la zona en riesgo utilizando un sistema de análisis por imágenes. Las secciones se incuban a continuación con una disolución de cloruro de trifeníltetrazolio al 1% (TTC) en solución salina tamponada con fosfato seguido de incubación en formalina tamponada neutra al 10%. El miocardio viable se colorea de color rojo mediante incubación con TTC y la zona infartada se determina de ese modo midiendo la zona de tejido no teñida y se expresa como el porcentaje de la zona en riesgo determinada. Se puede demostrar una reducción del daño tisular, como evidencian las reducciones estadísticamente significativas en el porcentaje de la zona en riesgo en comparación con los controles.

Eficacia del tratamiento con anticuerpo para VAP-1 en la artritis inducida por mBSA en conejos

Se mezcla albúmina de suero bovino metilada (mBSA) disuelta en solución salina fisiológica con un volumen igual de coadyuvante completo de Freund, y se prepara una emulsión. Se inmunizan ratones blancos New Zealand mediante inyección intradérmica de la emulsión dos veces, con una diferencia de catorce días. Aproximadamente 10 días después de la segunda inmunización, se recoge suero de los animales, y se administra una inyección intradérmica de disolución de mBSA. Los animales que muestran reacciones cutáneas positivas se seleccionan, y se dividen al azar en grupos de tratamiento basándose en los títulos en suero de IgG anti-mBSA.

Catorce días después de la segunda inmunización se administra intravenosamente o subcutáneamente anticuerpo para VAP-1 o vehículo, justo antes de la inyección de disolución de mBSA en la cavidad de la articulación de la rodilla derecha. En la rodilla izquierda de cada animal se inyecta solución salina fisiológica. Se administran inyecciones de anticuerpo para VAP-1 o de control negativo una vez o dos veces por semana a lo largo de todo el estudio.

Desde el día de la inducción (día 0), se observan el comportamiento de los conejos y la apariencia externa mediante inspección y palpación diaria y se registran los pesos corporales a intervalos especificados a lo largo de todo el estudio. Se evalúa la hinchazón de la rodilla en momentos puntuales determinados de antemano comparando el diámetro de las rodillas inflamada (derecha) y no inflamada (izquierda).

Al final de la parte experimental del estudio (día 21) los animales se sacrifican. Se recoge fluido sinovial para la determinación del número total de glóbulos blancos de la sangre y el contenido de proteína. La membrana sinovial de cada animal se disecciona de las articulaciones de la rodilla y se divide longitudinalmente en dos especímenes en el lugar de la patella. Uno se congela profundamente en nitrógeno líquido para la determinación del anticuerpo para VAP-1 y la expresión de VAP-1, y los otros especímenes de la membrana sinovial y los tejidos de la articulación de la rodilla residual se fijan en formalina tamponada neutra al 10% para la tinción con hematoxilina y eosina (HE), y ácido fosfotúngstico-hematoxilina (PTAH). Las secciones teñidas con HE se evalúan para determinar las reacciones inflamatorias, y las secciones teñidas con PTAH se evalúan para determinar el grado de depósito de fibrina sobre la superficie de la membrana sinovial. Se puede demostrar una reducción en la enfermedad artrítica, como evidencian las reducciones estadísticamente significativas en la puntuación en comparación con los controles.

En conclusión, estos ejemplos demuestran que los anticuerpos anti-VAP-1 completamente humanos conservaban las propiedades de reconocimiento de VAP-1 específicas de los anticuerpos anti-VAP-1 (Ejemplo 2 y 6), bloqueaban la trans migración de leucocitos a través del endotelio dependiente de VAP-1 (Ejemplo 7) y tenían mejores propiedades farmacocinéticas en comparación con los anticuerpos monoclonales anti-VAP-1 anteriores (Ejemplo 8).

LISTA DE SECUENCIAS

5 <110> BTT BioTie Therapies Corp.
 <112> Smith, David John
 <113> vainio, Petri
 <114> Mikkola, Jari
 <115> Vuorio, PÄivi
 <116> vainio, Jani
 10 <120> Anticuerpos monoclonales anti-VAP-1 completamente humanos novedosos
 <130> 2062101PC
 <160> 90
 15 <170> PatentIn versión 3.2
 <210> 1
 <211> 5
 20 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 25 <222> (1)..(1)
 <223> S, N o R
 <220>
 30 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (2)..(2)
 <223> Y o S
 <220>
 35 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (3)..(3)
 <223> A, G o W
 <220>
 40 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (4)..(4)
 <223> M o I
 <220>
 45 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (5)..(5)
 <223> H o S
 <400> 1
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5
 50 <210> 2
 <211> 17
 <212> PRT
 55 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (1)..(1)
 60 <223> V, A o N
 <220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (2)..(2)
 <223> I o L

5 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (3)..(3)
 <223> W, G o K

10 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (4)..(4)
 <223> F, Q, V o Y

15 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (5)..(5)
 <223> D o G

20 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (7)..(7)
 <223> S, G o I

25 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (8)..(8)
 <223> N, E, Y o no aminoácido

30 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (9)..(9)
 <223> E, K o T

35 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (10)..(10)
 <223> Y, D o N

40 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (11)..(11)
 <223> Y o H

45 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (12)..(12)
 <223> V o A

50 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (16)..(16)
 <223> K o R

55 <400> 2
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Ser Val Xaa
 1 5 10 15

Gly

<210> 3
 <211> 14

60 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (1)..(1)
 <223> D o E
 5
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (2)..(2)
 <223> A, G, K, P o Y
 10
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (3)..(3)
 <223> W, F, G o N
 15
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (4)..(4)
 <223> F, G o no aminoácido
 20
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (5)..(5)
 <223> G, S o no aminoácido
 25
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (6)..(6)
 <223> G o no aminoácido
 30
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (7)..(7)
 <223> T o no aminoácido
 35
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (8)..(8)
 <223> Y o no aminoácido
 40
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (9)..(9)
 <223> E, F o no aminoácido
 45
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (10)..(10)
 <223> F, G, S, V o W
 50
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (11)..(11)
 <223> Y o G
 55
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (12)..(12)
 <223> F o I
 60
 <400> 3
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Tyr
 1 5 10
 <210> 4
 <211> 5
 65

```

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4
Ser Tyr Ala Met His
5 1 5

<210> 5
<211> 5
<212> PRT
10 <213> Homo sapiens

<400> 5
Asn Tyr Trp Met Ser
1 5

15 <210> 6
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20 <400> 6
Ser Tyr Ala Met His
1 5

<210> 7
<211> 5
25 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7
Arg Ser Gly Ile His
1 5

30 <210> 8
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

35 <400> 8
Ser Tyr Gly Met His
1 5

<210> 9
<211> 17
40 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9
Val Ile Trp Phe Asp Gly Ser Asn Glu Asn Tyr Val Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

45 Gly

<210> 10
<211> 17
<212> PRT
50 <213> Homo sapiens

<400> 10
Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val Arg
1 5 10 15

Gly

```

<210> 11
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5
 <400> 11
 Val Leu Trp Phe Asp Gly Ser Asn Glu Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
 10
 <210> 12
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 12
 Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ile Tyr Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
 15
 <210> 13
 <211> 16
 <212> PRT
 20 <213> Homo sapiens
 <400> 13
 Ala Ile Gly Val Gly Gly Gly Thr Tyr His Val Asp Ser Val Lys Gly
 1 5 10 15
 25 <210> 14
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 30 <400> 14
 Asp Ala Trp Ser Tyr Phe Asp Tyr
 1 5
 <210> 15
 <211> 14
 35 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 15
 Asp Tyr Phe Gly Ser Gly Thr Tyr Phe Phe Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10
 40 <210> 16
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 45 <400> 16
 Asp Gly Trp Gly Tyr Phe Asp Tyr
 1 5
 50 <210> 17
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 17

Glu Lys Asn Trp Gly Ile Asp Tyr
 1 5
 <210> 18
 <211> 11
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 18
 Asp Pro Gly Phe Gly Glu Val Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10
 10 <210> 19
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15 <400> 19
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Phe Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Trp Phe Asp Gly Ser Asn Glu Asn Tyr Val Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Ala Trp Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115
 20 <210> 20
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 20

ES 2 540 566 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 Ile Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
 50 55 60
 Arg Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Tyr Phe Gly Ser Gly Thr Tyr Phe Phe Tyr Phe Asp Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Phe Ser Ser
 115 120

<210> 21
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 21
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Leu Trp Phe Asp Gly Ser Asn Glu Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Gly Trp Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 22
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 22

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

<210> 23
<211> 119
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 23
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val His Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Pro Val Ser Ser Tyr
20 25 30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Gly Val Gly Gly Gly Thr Tyr His Val Asp Ser Val Lys
50 55 60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Gly Asp Met Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Asp Pro Gly Phe Gly Glu Val Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 24
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<222> (5)..(5)
 <223> G o S

5 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (6)..(6)
 <223> I o V

10 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (8)..(8)
 <223> S o R

15 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (9)..(9)
 <223> S o no aminoácido

20 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (10)..(10)
 <223> A, F, W o Y

25 <400> 24
 Arg Ala Ser Gln Xaa Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Leu Ala
 1 5 10

30 <210> 25
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

35 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (1)..(1)
 <223> D o G

40 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (4)..(4)
 <223> S o N

45 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (5)..(5)
 <223> L o R

50 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (6)..(6)
 <223> A, E o Q

55 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (7)..(7)
 <223> S, T o R

60 <400> 25
 Xaa Ala Ser Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5

<210> 26
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (3)..(3)
 <223> F, Y o R
 5
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (4)..(4)
 <223> N, G o S
 10
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (5)..(5)
 <223> S o N
 15
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (6)..(C)
 <223> Y, F, W o S
 20
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (8)..(8)
 <223> L o R
 25
 <400> 26
 Gln Gln xaa xaa xaa xaa Pro xaa Thr
 1 5
 30
 <210> 27
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 27
 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Arg Ala Leu Ala
 1 5 10
 35
 <210> 28
 <211> 11
 <212> PRT
 40 <213> Homo sapiens
 <400> 28
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10
 45
 <210> 29
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 50
 <400> 29
 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Arg Ala Leu Ala
 1 5 10
 <210> 30
 <211> 11
 55 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 30
 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
 1 5 10
 60
 <210> 31

<211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 31
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Phe Leu Ala
 1 5 10
 <210> 32
 <211> 7
 10 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 32
 Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
 1 5
 15 <210> 33
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 20 <400> 33
 Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
 1 5
 25 <210> 34
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 34
 Asp Ala Ser Asn Leu Glu Arg
 30 1 5
 <210> 35
 <211> 7
 <212> PRT
 35 <213> Homo sapiens
 <400> 35
 Gly Ala Ser Ser Leu Gln Ser
 1 5
 40 <210> 36
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 45 <400> 36
 Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
 1 5
 <210> 37
 <211> 9
 50 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 37
 Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
 1 5
 55 <210> 38
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 60

<400> 38
 Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr
 1 5

5 <210> 39
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 39
 Gln Gln Phe Asn Ser Phe Pro Leu Thr
 1 5

15 <210> 40
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20 <400> 40
 Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg Thr
 1 5

25 <210> 41
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30 <400> 41
 Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Leu Thr
 1 5

<210> 42
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 42
 Val Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Gly Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

35 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu
 85 90 95

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

40 <210> 43
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 43

ES 2 540 566 T3

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
85 90 95

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

<210> 44

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

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

<210> 45

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 45

ES 2 540 566 T3

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 Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30

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

Tyr Gly Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 46

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 46

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

Asp Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

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

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

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

<210> 47

<211> 463

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

ES 2 540 566 T3

Met Glu Phe Gly Leu Asn Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Asp
 1 5 10 15
 Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
 20 25 30
 Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45
 Phe Ser Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Phe Asp Gly Ser Asn Glu Asn Tyr Val
 65 70 75 80
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 85 90 95
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ala Trp Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 115 120 125
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 130 135 140
 Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
 145 150 155 160
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 165 170 175
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 180 185 190
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 195 200 205

ES 2 540 566 T3

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
 210 215 220
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
 225 230 235 240
 Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Ala Gly Gly Pro Ser Val
 245 250 255
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 260 265 270
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
 275 280 285
 Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 290 295 300
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 305 310 315 320
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 325 330 335
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
 340 345 350
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 355 360 365
 Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 370 375 380
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 385 390 395 400
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 405 410 415
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 420 425 430
 Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 435 440 445
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 450 455 460

<210> 48

<211> 236

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

ES 2 540 566 T3

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15
Leu Pro Gly Ala Arg Cys Val Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser
20 25 30
Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
35 40 45
Gln Gly Ile Ser Arg Ala Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
50 55 60
Gly Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val
65 70 75 80
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
85 90 95
Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
100 105 110
Phe Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
115 120 125
Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
130 135 140
Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
145 150 155 160
Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
165 170 175
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
180 185 190
Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
195 200 205
Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
210 215 220
Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 49
<211> 15
5 <212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 49
10 agctatgccca tgcac 15

<210> 50
<211> 15
<212> ADN
15 <213> Homo sapiens

<400> 50
aactattgga tgagc 15

ES 2 540 566 T3

	<210> 51		
	<211> 15		
	<212> ADN		
	<213> Homo sapiens		
5	<400> 51		
	agctatgcca tgcac	15	
	<210> 52		
10	<211> 15		
	<212> ADN		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 52		
15	cggctctggca tacac	15	
	<210> 53		
	<211> 15		
	<212> ADN		
20	<213> Homo sapiens		
	<400> 53		
	agctatggaa tgcac	15	
25	<210> 54		
	<211> 51		
	<212> ADN		
	<213> Homo sapiens		
30	<400> 54		
	gttatatggt ttgatggaag taatgaaaac tatgtagact ccgtgaaggg c		51
	<210> 55		
	<211> 51		
35	<212> ADN		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 55		
	aacataaagc aagatggaag tgagaagtac tatgtggact ctgtgagggg c		51
40	<210> 56		
	<211> 51		
	<212> ADN		
	<213> Homo sapiens		
45	<400> 56		
	gtttatggt ttgatggaag taatgaagac tatgcagact ccgtgaaggg c		51
	<210> 57		
	<211> 51		
50	<212> ADN		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 57		
55	gttatatggt atgatggaat ttataagtac tatgcagact ccgtgaaggg c		51
	<210> 58		
	<211> 48		
	<212> ADN		
60	<213> Homo sapiens		
	<400> 58		
	gctattggtg ttggtggtgg cacataccat gtagattccg tgaagggc		48
65	<210> 59		
	<211> 24		

ES 2 540 566 T3

	<212> ADN		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 59		
5	gatgcctgga gctactttga ctac	24	
	<210> 60		
	<211> 42		
	<212> ADN		
10	<213> Homo sapiens		
	<400> 60		
	gattactttg gttcggggac ttatttcttc tactttgact ac	42	
15	<210> 61		
	<211> 24		
	<212> ADN		
	<213> Homo sapiens		
20	<400> 61		
	gatggctggg gatactttga ctac	24	
	<210> 62		
	<211> 24		
25	<212> ADN		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 62		
30	gagaagaact ggggaattga ctac	24	
	<210> 63		
	<211> 33		
	<212> ADN		
	<213> Homo sapiens		
35	<400> 63		
	gatcctgggt tcggggaggt ctactttgac tat	33	
	<210> 64		
40	<211> 351		
	<212> ADN		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 64		
	caggtgcaac tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc	60	
	tcctgtgcag cgtctggatt caccttcttt agctatgcca tgcactgggt ccgccagact	120	
	ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtttg atggaagtaa tgaaaactat	180	
	gtagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat	240	
	ctgcaaatga acaccctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatgcc	300	
45	tggagctact ttgactactg gggccagga accctgggtca ccgtctctc a	351	
	<210> 65		
	<211> 369		
	<212> ADN		
50	<213> Homo sapiens		
	<400> 65		

ES 2 540 566 T3

	gaggtgcagc tggaggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctgggggggc cctgagactc	60
	tcctgtgcag cctctggatt cttttcagc aactattgga tgagctgggt ccgccaggct	120
	ccagggaaaag ggctggagtg ggtggccaac ataaagcaag atggaagtga gaagtactat	180
	gtggactctg tgaggggccc attcaccgtc tccagagaca acgccaagaa ctactgtat	240
	ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagggattac	300
	tttggttcgg ggacttattt cttctacttt gactactggg gccagggaac cctggtcacc	360
	ttctcctca	369
	<210> 66	
	<211> 351	
5	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 66	
	caggtgcagc tggaggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggagggc cctgagactc	60
	tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagc agctatgccg tgactgggt ccgccaggct	120
	ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt ttatggtttg atggaagtaa tgaagactat	180
	gcagactccg tgaagggccc attcaccatc tccagagaca actccaagaa cacgctgtat	240
	ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatggc	300
10	tggggatact ttgactactg gggccagggg accctgggtc ccgtctctc a	351
	<210> 67	
	<211> 351	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
15	<400> 67	
	caggtgcagc tggaggagtc tgggggagac gtggtccagc ctgggagggc cctgagactc	60
	tcctgtgcag cgtctggatt cagtttcagc cggctctggc tacttggtt ccgccaggct	120
	ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg atggaattta taagtactat	180
	gcagactccg tgaagggccc attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat	240
	ctgcaaatga acagcctgag ggccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagagaag	300
20	aactggggaa ttgactactg gggccagggg accctgggtc ccgtctctc a	351
	<210> 68	
	<211> 357	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
25	<400> 68	
	gaggttcagc tgggtgcagtc tgggggaggc ttggtacatc cggggggggc cctgagactc	60
	tcctgtgcag gctctggatt ccccgtcagc agctatggaa tgactgggt tcgccaggct	120
	ccaggaaaag gtctggagtg ggtatcagct attggtgttg gtggtggcac ataccatgta	180
	gattccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaactc cttgtatctt	240
	caaatgaaca gcctgagagc cggggacatg gctgtgtatt actgtgcaag agatcctggg	300
	ttcggggagg tctactttga ctattggggc cagggaaacc tggtcaccgt ctctca	357
	<210> 69	
30	<211> 33	
	<212> ADN	

	<213> Homo sapiens	
	<400> 69	
5	cgggcaagtc agggcattag cagggttta gcc	33
	<210> 70	
	<211> 33	
	<212> ADN	
10	<213> Homo sapiens	
	<400> 70	
	agggccagtc agagtgttag cagctactta gcc	33
	<210> 71	
15	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 71	
20	cgggcaagtc agggcattag cagagcttta gcc	33
	<210> 72	
	<211> 33	
	<212> ADN	
25	<213> Homo sapiens	
	<400> 72	
	cgggcgagtc aggtattag cagctggtta gcc	33
30	<210> 73	
	<211> 36	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
35	<400> 73	
	agggccagtc agagtgttag cagcagcttc ttagcc	36
	<210> 74	
40	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 74	
45	gatgcctcca gtttgaaag t	21
	<210> 75	
	<211> 21	
	<212> ADN	
50	<213> Homo sapiens	
	<400> 75	
	gatgcatcca acagggccac t	21
	<210> 76	
55	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 76	
60	gatgcctcca atttgaaag a	21
	<210> 77	
	<211> 21	
	<212> ADN	
65	<213> Homo sapiens	

	<400> 77 ggtgcatcca gtttcaaag t	21
5	<210> 78 <211> 21 <212> ADN <213> Homo sapiens	
10	<400> 78 ggtgcatcca gcagggccac t	21
15	<210> 79 <211> 27 <212> ADN <213> Homo sapiens	
20	<400> 79 caacagtta atagttaccc ttcact	27
25	<210> 80 <211> 27 <212> ADN <213> Homo sapiens	
30	<400> 80 cagcagcgta gcaactggcc gctcact	27
35	<210> 81 <211> 27 <212> ADN <213> Homo sapiens	
40	<400> 81 caacagtta atagttccc gctcact	27
45	<210> 82 <211> 27 <212> ADN <213> Homo sapiens	
50	<400> 82 caacagtata atagttaccc tcggacg	27
55	<210> 83 <211> 27 <212> ADN <213> Homo sapiens	
	<400> 83 cagcagtatg gtagctcacc gctcact	27
	<210> 84 <211> 321 <212> ADN <213> Homo sapiens	
	<400> 84	

	gtcatccagt tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc	60
	atcacttgcc gggcaagtca gggcattagc agggctttag cctgggtatca gcagaaacca	120
	gggaaaggct ctaagctcct gatctatgat gcctccagtt tggaaagtgg ggtcccatca	180
	aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct	240
	gaagattttg caacttatta ctgtcaacag ttttaatagtt accctctcac tttcggcgga	300
	gggaccaagg tggagatcaa a	321
	<210> 85	
	<211> 321	
5	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 85	
	gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc	60
	ctctcctgca gggccagtc gaagtgttagc agctacttag cctgggtacca acagaaacct	120
	ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc	180
	aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct	240
	gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggccgctcac tttcggcgga	300
	gggaccaagg tggagatcaa a	321
10	<210> 86	
	<211> 321	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
15	<400> 86	
	gccatccagt tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc	60
	atcacttgcc gggcaagtca gggcattagc agagctttag cctgggtatca gcagaaacca	120
	gggaaagctc ctaagctcct gatctatgat gcctccaatt tggaaagagg ggtcccatca	180
	aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcaacct	240
	gaggattttg caacttatta ctgtcaacag ttttaatagtt tcccgcctcac tttcggcgga	300
	gggaccaagg tggagatcaa a	321
20	<210> 87	
	<211> 321	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
25	<400> 87	
	gacatccaga tgacccagtc tccatcctca ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc	60
	atcacttgct gggcgagtc ggggtattagc agctgggttag cctgggtatca gcagaaacca	120
	gagaaagccc ctaagtccct gatctatggt gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca	180
	aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct	240
	gaagattttg caacttatta ctgccaacag tataatagtt accctcggac gttcggccaa	300
	gggaccaagg tggaaatcaa a	321
	<210> 88	
30	<211> 324	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 88	

ES 2 540 566 T3

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga tagagccacc 60
ctctccctgca gggccagtcga gagggttagc agcagcttct tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtggt gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagtatggta gctcaccgct cactttcggc 300
ggagggacca aggtggagat caaa 324

<210> 89
<211> 1392
5 <212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 89
atggagtttg ggctgaactg ggttttcctc gttgctcttt taagagatgt ccagtgtcag 60
gtgcaactgg tggagttctg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtccct gagactctcc 120
tgtgcagcgt ctggattcac cttcttttagc tatgccatgc actgggtccg ccagactcca 180
ggcaaggggc tggagtggtt ggcagttata tggtttgatg gaagtaatga aaactatgta 240
gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 300
caaatgaaca ccctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgagag agatgcctgg 360
10 agctactttg actactgggg ccagggaacc ctggtcaccg tctcctcagc tagcaccaag 420
ggcccatccg tcttccccct ggcgcctctc tccaggagca cctccgagag cacagccgcc 480
ctgggctgcc tggtaaggga ctacttcccc gaaccggtga cgggtgctgt gaactcaggc 540
gccctgacca gcggcgtgca cacttccccg gctgtcctac agtcctcagg actctactcc 600
ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc agcttgggca cgaagaccta cacctgcaac 660
gtagatcaca agcccagcaa caccaagggt gacaagagag ttgagtccaa atatggtccc 720
ccatgcccac catgcccagc acctgagttc gcggggggac catcagttct cctgttcccc 780
ccaaaaccca aggacactct catgatctcc cggacccttg aggtcacgtg cgtggtggtg 840
gacgtgagcc aggaagaccc cgagggtccg ttcaactggt acgtggatgg cgtggaggtg 900
cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagttcaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 960
gtcctcaccg tcttgacca ggactggctg aacggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 1020
aacaagggc tcccgtctct catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga 1080
gagccacagg tgtacaccct gccccatcc caggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc 1140
ctgacctgcc tggtaaaagg cttctacccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 1200
gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 1260
ttcctctaca gcaggctaac cgtggacaag agcaggtggc aggaggggaa tgtcttctca 1320
tgctccgtga tgcattgagg tctgcacaac cactacacac agaagagcct ctccctgtct 1380
ctgggtaaat ga 1392

<210> 90
<211> 711
15 <212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 90

ES 2 540 566 T3

atggacatga ggggtccccgc tcagctcctg gggcttctgc tgctctggct cccaggtgcc	60
agatgtgtca tccagttgac ccagttctcca tcttccctgt ctgcatctgt aggagacaga	120
gtcaccatca cttgccgggc aagtcagggc attagcaggg ctttagcctg gtatcagcag	180
aaaccagggg aaggtcctaa gctcctgac tatgatgcct ccagtttgga aagtggggtc	240
ccatcaaggt tcagcggcag tggatctggg acagatttca ctctcaccat cagcagcctg	300
cagcctgaag attttgcaac ttattactgt caacagttta atagttacc tctcactttc	360
ggcggagggg ccaaggtgga gatcaaactg acggtggctg caccatctgt cttcatcttc	420
ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac	480
ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aaggtggata acgcccctca atcgggtaac	540
tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc	600
ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat	660
cagggcctga gctcgcccgt cacaaagagc ttcaacaggg gagagtgtta g	711

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo anti-VAP-1 o un fragmento de unión a VAP-1 del mismo, caracterizado porque es completamente humano y comprende un polipéptido de la cadena pesada representado en el SEQ ID NO: 47 o su variante de secuencia conservativa, y un polipéptido de la cadena ligera representado en el SEQ ID NO: 48 o su variante de secuencia conservativa;
- en donde el anticuerpo anti-VAP-1 o un fragmento de unión a VAP-1 del mismo muestran un perfil de concentración en suero mejorado en el tiempo (AUC) y una vida media de eliminación prolongada por encima de la de un anticuerpo anti-VAP-1 quimérico denominado BTT-1002.
- 10 2. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho fragmento de anticuerpo es un Fab, Fab', F(ab')₂, Fv o Fv de cadena sencilla.
3. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo recombinante.
- 15 4. Un vector de expresión que codifica el anticuerpo de la reivindicación 1, que comprende una secuencia de ácido nucleico representada en el SEQ ID NO 89, o su variante de secuencia conservativa, o una secuencia de nucleótidos representada en el SEQ ID NO 90, o su variante de secuencia conservativa.
5. Una célula anfitriona o un organismo no humano que comprende un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 4.
6. Un método para producir un anticuerpo anti-VAP-1 completamente humano, que comprende las etapas de
 - 20 a) transformar una célula anfitriona adecuada con al menos un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 4,
 - b) cultivar dicho anfitrión en condiciones que favorecen la expresión, y
 - c) purificar los anticuerpos completamente humanos ensamblados a partir del medio de cultivo.
- 25 7. Un anticuerpo anti-VAP-1 completamente humano de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso como medicamento o para su uso *in vivo* como agente de diagnóstico.
8. Un método de diagnóstico *in vitro* que comprende un anticuerpo anti-VAP-1 completamente humano de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 30 9. El uso de un anticuerpo anti-VAP-1 completamente humano de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento de un trastorno inflamatorio mediado por VAP-1 seleccionado del grupo que consiste en artritis y enfermedades del tejido conectivo, enfermedades inflamatorias intestinales, dermatosis, esclerosis múltiple, neuropatía inflamatoria, miopatía inflamatoria, encefalomiелitis diseminada aguda, vasculitis del sistema nervioso central, síndrome de Sjogren, diabetes, lupus eritematoso generalizado, asma, enfermedad inflamatoria del hígado, enfermedad de Graves y tiroiditis.
- 35 10. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-VAP-1 completamente humano de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 40 11. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10 para el tratamiento o el diagnóstico de un trastorno inflamatorio mediado por VAP-1 seleccionado del grupo que consiste en artritis y enfermedades del tejido conectivo, enfermedades inflamatorias intestinales, dermatosis, esclerosis múltiple, neuropatía inflamatoria, miopatía inflamatoria, encefalomiелitis diseminada aguda, vasculitis del sistema nervioso central, síndrome de Sjogren, diabetes, lupus eritematoso generalizado, asma, enfermedad inflamatoria del hígado, enfermedad de Graves y tiroiditis.
- 45 12. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 11, en donde dichas artritis y enfermedades del tejido conectivo se seleccionan del grupo que consiste en artropatías reactivas, artropatías postinfecciosas, poliartropatías inflamatorias, trastornos sistémicos del tejido conectivo, espondiloartropatías inflamatorias, miositis, sinovitis, enfermedad de Reiter, artritis reumatoide seropositiva, artritis reumatoide, enfermedad reumatoide extraarticular, artropatías psoriásicas y enteropáticas, artritis juvenil, artritis, poliarteritis nodosa y afecciones relacionadas, vasculopatías necrotizantes, dermatopolimiositis, esclerosis sistémica, implicación sistémica del tejido conectivo, espondilitis anquilosante y espondilopatías inflamatorias.
- 50 13. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 12, en donde dicha enfermedad intestinal inflamatoria se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa.

14. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 12, en donde dichas dermatosis se seleccionan del grupo que consiste en trastornos bulosos, dermatitis, trastornos papuloescamosos, eritema, líquen escleroso y atrófico, craurosis vulvar, lupus eritematoso discoide, morfea, pénfigo, penfigoide, dermatitis herpetiforme, dermatitis atópica, dermatitis de contacto alérgica, dermatitis de contacto irritante, dermatitis de contacto, psoriasis, eritema multiforme.

5

15. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 12, en donde dicho trastorno inflamatorio se selecciona del grupo que consiste en aterosclerosis, inflamación del ojo incluyendo uveitis, iritis, iridociclitis, hepatitis alcohólica, trasplante con aloinjerto, trasplante con xenoinjerto, glomerulonefritis, lesión por reperfusión y afecciones inflamatorias agudas después de infarto de miocardio e ictus.

10

8C10 V_L

```

1 V I Q L T Q S P S S L S A S V G D R V T
1 gtcattccagttgacccagtcctccatccctcctgtctgcatctgtaggagacagagtcacc
21 I T C R A S Q G I S R A L A W Y Q Q K P
61 atcacttgccgggcaagtcagggcatttagcagggctttagcctgggtatcagcagaaacca
41 G K G P K L L I Y D A S S L E S G V P S
121 gggaaagggtcctaagctcctgatctatgatgcctccagtttggaagtggtgccatca
61 R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
181 aggttcagcggcagtggtatctgggacagatttcactctcaccatcagcagcctgcagcct
81 E D F A T Y Y C Q Q F N S Y P L T F G G
241 gaagattttgcaacttattactgtcaacagtttaatagtaccctctcactttcggcgga
101 G T K V E I K
301 gggaccaagggtggagatcaaa

```

Fig. 1A

8C10 V_H

```

1 Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L
1 caggtgcaactgggtggagtctgggggagggcgtgggtccagcctgggaggtccctgagactc
21 S C A A S G F T F F S Y A M H W V R Q T
61 tcctgtgcagcgtctggattcaccttcttttagctatgccatgcactgggtccgccagact
41 P G K G L E W V A V I W F D G S N E N Y
121 ccaggcaaggggtggagtgggtggcagtttatatgggttgatggaagtaataaaaactat
61 V D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y
181 gttagactccgtgaagggccgattcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtat
81 L Q M N T L R A E D T A V Y Y C A R D A
241 ctgcaaatgaacaccctgagagccgaggacacggctgtgtattactgtgcgagagatgcc
101 W S Y F D Y W G Q G T L V T V S S
301 tggagctactttgactactggggccaggggaaccctgggtcaccgtctcctca

```

Fig. 1B

8A4 V_L

```

1 E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T
1 gaaattgtgttgacacagtcctccagccaccctgtctttgtctccaggggaaagagccacc
21 L S C R A S Q S V S S Y L A W Y Q Q K P
61 ctctcctgcagggccagtcagagtgtagcagctacttagcctggtaccaacagaaacct
41 G Q A P R L L I Y D A S N R A T G I P A
121 ggccaggctcccaggctcctcatctatgatgcatccaacagggccactggcatcccagcc
61 R F S G S G S G T D F T L T I S S L E P
181 aggttcagtgccagtggtctgtggacagacttcactctcaccatcagcagcctagagcct
81 E D F A V Y Y C Q Q R S N W P L T F G G
241 gaagattttgcagtttattactgtcagcagcgtagcaactggccgctcactttcggcgga
101 G T K V E I K
301 gggaaccaaggtggagatcaaa

```

Fig. 2A

8A4 V_H

```

1 E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L
1 gaggtgcagctggtggagtcctgggggaggcttggtccagcctggggggtccctgagactc
21 S C A A S G F I F S N Y W M S W V R Q A
61 tcctgtgcagcctctggattcattttcagtaactattggatgagctgggtccgccaggct
41 P G K G L E W V A N I K Q D G S E K Y Y
121 ccagggaaaggctggagtggtggccaacataaagcaagatggaagtgagaagtactact
61 V D S V R G R F T V S R D N A K N S L Y
181 gtggactctgtgaggggcccattcaccgtctccagagacaacgccaagaactcactgtat
81 L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R D Y
241 ctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggctgtgtattactgtgcgagggattac
101 F G S G T Y F F Y F D Y W G Q G T L V T
301 tttaggttcggggacttattttcttctactttgactactggggccagggaaccctggtcacc
121 F S S
361 ttctcctca

```

Fig. 2B

3F10 V_L

```

1 A I Q L T Q S P S S L S A S V G D R V T
1 gccatccagttgacccagtcctccatcctccctgtctgcatctgtaggagacagagtcacc
21 I T C R A S Q G I S R A L A W Y Q Q K P
61 atcacttgccgggcaagtcagggcattagcagagctttagcctgggtatcagcagaaacca
41 G K A P K L L I Y D A S N L E R G V P S
121 gggaaagctcctaagctcctgatctatgatgcctccaatttggaagaggggtcccatca
61 R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
181 aggttcagcggcagtggtatctgggacagatttcactctcaccatcagcagcctgcaacct
81 E D F A T Y Y C Q Q F N S F P L T F G G
241 gaggattttgcaacttattactgtcaacagtttaatagtttcccgctcactttcggcgga
101 G T K V E I K
301 gggaccaaggtggagatcaaa

```

Fig. 3A

3F10 V_H

```

1 Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L
1 caggtgcagctggtggagtcctgggggagggcgtgggtccagcctgggaggtccctgagactc
21 S C A A S G F T F S S Y A M H W V R Q A
61 tcctgtgcagcgtctggattcaccttcagtagctatgccatgcactgggtccgccaggct
41 P G K G L E W V A V L W F D G S N E D Y
121 ccaggcaaggggctggagtggtggcagttttatggtttgatggaagtaatgaagactat
61 A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y
181 gcagactccgtgaagggccgattcaccatctccagagacaactccaagaacacgctgtat
81 L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R D G
241 ctgcaaataaacagcctgagagccgaggacacggctgtgtattactgtgcgagagatggc
101 W G Y F D Y W G Q G T L V T V S S
301 tggggatactttgactactggggccagggaaccctgggtaccgctcctca

```

Fig. 3B

5F12 V_L

```

1 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T
1  gacatccagatgacccagtcctccatcctcactgtctgcatctgtaggagacagagtcacc
21 I T C R A S Q G I S S W L A W Y Q Q K P
61 atcacttgtcgggqgagtcagggatttagcagctgggttagcctgggtatcagcagaaacca
41 E K A P K S L I Y G A S S L Q S G V P S
121 gagaaagcccctaagtcctgatctatgggtgcatccagtttgcaaagtggggtcccatca
61 R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
181 aggttcagcggcagtggtctgggacagatttcactctcaccatcagcagcctgcagcct
81 E D F A T Y Y C Q Q Y N S Y P R T F G Q
241 gaagattttgcaacttattactgccaacagtataatagttaccctcggacgttcgggcaa
101 G T K V E I K
301 gggaccaaggtggaaatcaaa

```

Fig. 4A

5F12 V_H

```

1 Q V Q L V D S G G D V V Q P G R S L R L
1  cagggtgcagctgggtggactctgggggagacgtgggtccagcctgggaggtccctgagactc
21 S C A A S G F S F S R S G I H W V R Q A
61 tcctgtgcagcgtctggattcagtttcagtcgggtctggcatacactgggtccgcccaggct
41 P G K G L E W V A V I W Y D G I Y K Y Y
121 ccaggcaaggggctggagtgggtggcagttatatgggtatgatggaattttataagtactat
61 A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y
181 gcagactccgtgaagggccgattcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtat
81 L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R E K
241 ctgcaaataaacagcctgagggccgaggacacggctgtgtattactgtgcgagagagaag
101 N W G I D Y W G Q G T L V T V S S
301 aactggggaattgactactggggccagggaaccctggtcaccgtctcctca

```

Fig. 4B

4B3 V_L

```

1 E I V L T Q S P G T L S L S P G D R A T
1 gaaattgtgttgacgcagtcctccaggcacccctgtctttgtctccaggggatagagccacc
21 L S C R A S Q S V S S S F L A W Y Q Q K
61 ctctcctgcagggccagtcagagtgttagcagcagcttcttagcctgggtaccagcagaaa
41 P G Q A P R L L I Y G A S S R A T G I P
121 cctggccaggctcccaggctcctcatctatgggtgcatccagcagggccactggcatccca
61 D R F S G S G S G T D F T L T I S R L E
181 gacaggttcagtggcagtggtctgggacagacttcactctcaccatcagcagactggag
81 P E D F A V Y Y C Q Q Y G S S P L T F G
241 cctgaagattttgcagtgattactgtcagcagtatggtagctcaccgctcactttcggc
101 G G T K V E I K
301 ggagggaccaaggtggagatcaaa

```

Fig. 5A

4B3 V_H

```

1 E V Q L V Q S G G G L V H P G G S L R L
1 gaggttcagctggtgcagtcctgggggaggttggtacatccgggggggtccctgagactc
21 S C A G S G F P V S S Y G M H W V R Q A
61 tcctgtgcaggctctggattcccgcgcagtagctatggaatgcactgggttcgccaggct
41 P G K G L E W V S A I G V G G G T Y H V
121 ccaggaaaaggtctggagtgggtatcagctattgggtgttggtgggtggcacataccatgta
61 D S V K G R F T I S R D N A K N S L Y L
181 gattccgtgaagggccgattcaccatctccagagacaatgccaagaactccttgatctt
81 Q M N S L R A G D M A V Y Y C A R D P G
241 caaatgaacagcctgagagccggggacatggctgtgtattactgtgcaagagatcctggg
101 F G E V Y F D Y W G Q G T L V T V S S
301 ttccggggaggctctactttgactattggggccaggggaaccctgggtcacctctctca

```

Fig. 5B

Secuencias V_H

```

      1                               50
8C10.VH (1) QVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTFSYAMHWVRQAPGKGLEWVAV
8A4.VH (1) EVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTFSNYWMSVRQAPGKGLEWVAN
3F10.VH (1) QVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTFSYAMHWVRQAPGKGLEWVAV
5F12.VH (1) QVQLVDSGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTFSRSGLHWVRQAPGKGLEWVAV
4B3.VH (1) EVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTFSYAMHWVRQAPGKGLEWVSA
Consenso (1) QVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTFSYAMHWVRQAPGKGLEWVAV

      51                               100
8C10.VH (51) IWFDGSNENYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNTLRAEDTAVYYCARD
8A4.VH (51) IKQDSSEKYYVDSVGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRADTAVYYCARDY
3F10.VH (51) IWFDGSNEDYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRADTAVYYCARDG
5F12.VH (51) IWFDSEIKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRADTAVYYCARDK
4B3.VH (51) IGVGSG-TYIVDSKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRADTAVYYCARDP
Consenso (51) IWFDGS YYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRADTAVYYCARD

      101                               123
8C10.VH (101) W-----SYFDYWGQGTLVTVSS
8A4.VH (101) TSGSYFFYPDIWGQGLVAVPSS
3F10.VH (101) W-----GYFDYWGQGTLVTVSS
5F12.VH (101) N-----WGLDYWGQGTLVTVSS
4B3.VH (100) GFG---EVYFDYWGQGTLVTVSS
Consenso (101) W YFDYWGQGTLVTVSS

```

Fig. 6A

CDR1

```

      31
8C10.VH (31) SYAMH
8A4.VH (31) NYWMS
3F10.VH (31) SYAMH
5F12.VH (31) RSAMH
4B3.VH (31) SYAMH
Consenso (31) SYAMH

```

Fig. 6B

CDR2

```

      50                               66
8C10.VH (50) VIWFDGSNENYVDSVKGR
8A4.VH (50) NIKQDSSEKYYVDSVGR
3F10.VH (50) VIWFDGSNEDYADSVKGR
5F12.VH (50) VIWFDSEIKYYADSVKGR
4B3.VH (50) AIGVGS-G-TYIVDSVKGR
Consenso (50) VIWFDGS YYVDSVKGR

```

Fig. 6C

CDR3

		99	112
8C10.V _H	(99)	DAS-----SYFAY	
8A4.V _H	(99)	DYFGSGTYFFYPAY	
3F10.V _H	(99)	DGE-----GYFAY	
5F12.V _H	(99)	ERN-----WGIAY	
4B3.V _H	(98)	DPGFG---EVYFAY	
Consenso	(99)	D W	YFDY

Fig. 6D

Secuencias V_L

		1	50
8C10.V _L	(1)	VEQLTQSPSSLSASVGRVITITCRASQGISR-ALAWYQQKIGKAPKLLIY	
8A4.V _L	(1)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRNASQVSS-FLAWYQQKIGQAPRLIY	
3F10.V _L	(1)	AEQLTQSPSSLSASVGRVITITCRASQGISR-ALAWYQQKIGKAPKLLIY	
5F12.V _L	(1)	DIQMTQSPSSLSASVGRVITITCRASQGIS-FLAWYQQKPEKA-KSLIY	
4B3.V _L	(1)	EIVLTQSPGTLSPEDRATLSCRASQVSS-FLAWYQQKPGAPRLIY	
Consenso	(1)	EQILTQSPSSLSASVGRVITITCRASQGISS FLAWYQQKPGKAPKLLIY	

		51	100
8C10.V _L	(50)	DASSLSEGVSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSTPLTFG	
8A4.V _L	(50)	DASNRAIGTPANFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQRNWPILTFG	
3F10.V _L	(50)	DASNLREVRFRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSTPLTFG	
5F12.V _L	(50)	GASSLQSGVSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSTPLTFG	
4B3.V _L	(51)	GAASRAIGTDGFGSGSGSGTDFTLTISRREDFATYYCQQVGSSTPLTFG	
Consenso	(51)	DASSL SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSTPLTFG	

		101
8C10.V _L	(100)	GGTKVEIK
8A4.V _L	(100)	GGTKVEIK
3F10.V _L	(100)	GGTKVEIK
5F12.V _L	(100)	GGTKVEIK
4B3.V _L	(101)	GGTKVEIK
Consenso	(101)	GGTKVEIK

Fig. 6E

CDR1

		24
8C10.V _L	(24)	RASQGISR-ALA
8A4.V _L	(24)	RASQSVSS-ALA
3F10.V _L	(24)	RASQGISR-ALA
5F12.V _L	(24)	RASQGISS-ALA
4B3.V _L	(24)	RASQSVSSFLA
Consenso	(24)	RASQGISS FLA

Fig. 6F

CDR2

		51
8C10.V _L	(50)	DASSLES
8A4.V _L	(50)	DASNRAI
3F10.V _L	(50)	DASNLER
5F12.V _L	(50)	QASSLQS
4B3.V _L	(51)	DASSRAI
Consenso	(51)	DASSL S

Fig. 6G

CDR3

		90
8C10.V _L	(89)	QYNSYPLT
8A4.V _L	(89)	QQRSNYPLT
3F10.V _L	(89)	QQYNSYPLT
5F12.V _L	(89)	QQYNSYPLT
4B3.V _L	(90)	QQYGSYPLT
Consenso	(90)	QQFNSYPLT

Fig. 6H

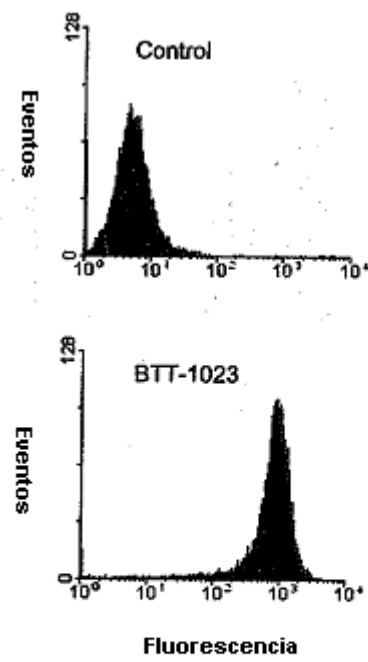


Fig. 7

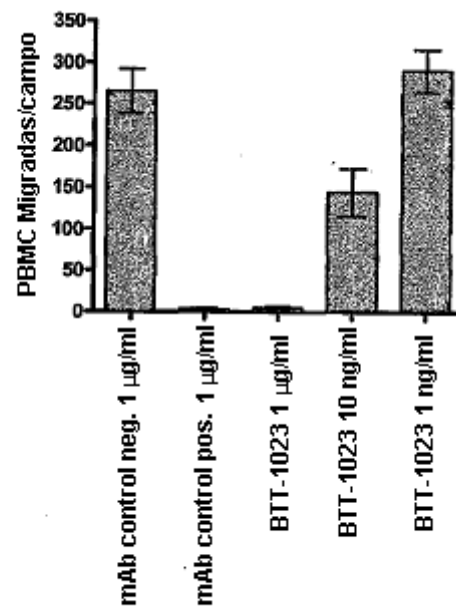


Figura 8