(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 547 475**

(51) Int. CI.:

C07K 16/24 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.04.2008 E 08745931 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.06.2015 EP 2146745**

(54) Título: **Anticuerpo penta-específico**

(30) Prioridad:

17.04.2007 US 912229 P
11.04.2008 US 44132

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.10.2015

(73) Titular/es:

GLAXOSMITHKLINE LLC (100.0%)
Corporation Service Company, 2711 Centreville Road, Suite 400
Wilmington, Delaware 19808, US

(72) Inventor/es:

CLEGG, STEPHANIE JANE;
DOBRZYNSKI, ERIC;
ELLIS, JONATHAN H.;
GERMASCHEWSKI, VOLKER;
GODILLOT, ALEXIS PAUL;
JONAK, ZDENKA LUDMILA;
LEWIS, ALAN P. y
WHITE, JOHN R.

(74) Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

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

Anticuerpo penta-específico

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un anticuerpo que tiene múltiples especificidades. En particular, el anticuerpo de la presente invención se une a y neutraliza cada una de IL-8 humana, Gro-alfa, Gro-beta, Gro-gamma y ENA-78. El anticuerpo puede ser útil en métodos para tratar enfermedades o trastornos caracterizados por un nivel elevado o desequilibrado de una o más de las siguientes proteínas: IL-8 humana, Gro-alfa, Gro-beta, Gro-gamma y ENA-78, particularmente COPD, osteoartritis, artritis reumatoide, artritis erosiva, asma, aterosclerosis, enfermedad inflamatoria del intestino, psoriasis, rechazo de trasplantes, gota, cáncer, lesión pulmonar aguda, enfermedad pulmonar aguda, sepsis, ARDS, enfermedad arterial periférica, esclerosis sistémica, síndrome de insuficiencia respiratoria en recién nacidos, exacerbación del asma y COPD, fibrosis quística, panbronquiolitis difusa, lesión de reperfusión y/o endometriosis con dicho anticuerpo.

Antecedentes de la invención

Los datos e informes publicados indican que los miembros de la subfamilia ELRCXC de quimioquinas CXCL presentan niveles elevados en varias enfermedades. Hay un total de 16 miembros de la familia CXCL. Se ha informado que las quimioquinas están reguladas positivamente en varias enfermedades inflamatorias, incluyendo COPD, donde están elevados los niveles de CXCL1-3, 5 y 8, también conocidas como Gro-α, -β, -γ (Haskill, S., et al. Proc. Natl. Acad. Sci., 1990: 87, 7732-7736), ENA-78 (Wang, D. y Richmond, A., Cytokine Reference. Oppenheim, J.J. y Feldman, M. ed., Academic Press, Londres, 1023-1027, Powerm C.A. et al. Gene., 1994: 151, 333-334) e IL-8 (Iizasa, H. y Matsushima, K., Cytokine Reference. Oppenheim, J.J. y Feldman, M. ed., Academic Press, Londres, 1061-1067, Matsushima, K. et al., J. Exp. Med. 1988: 167, 1883-1893) respectivamente (Am. J. Respir. Crit Care Med., 163: 349-355, 2001, Am. J. Respir. Crit Care Med., 168: 968-975, 2003, Thorax, 57: 590-595, 2002). Se ha postulado que la expresión prolongada y elevada de estas quimioquinas podría estar implicada en el desarrollo de enfermedades tales como COPD, osteoartritis, artritis reumatoide, artritis erosiva, asma, aterosclerosis, enfermedad inflamatoria del intestino, psoriasis, rechazo de trasplantes, gota, cáncer, lesión pulmonar aguda, enfermedad pulmonar aguda, sepsis, ARDS, enfermedad arterial periférica, esclerosis sistémica, síndrome de insuficiencia respiratoria en recién nacidos, exacerbación del asma y COPD, fibrosis quística, panbronquiolitis difusa, lesión de reperfusión o endometriosis. Se sabe que estas quimioquinas CXC estimulan la quimiotaxis de neutrófilos acoplándose a y activando los receptores CXCR1 y/o CXCR2. Por lo tanto, la inhibición de estas quimioquinas puede prevenir que las células inflamatorias se infiltren en el tejido pulmonar, previniendo de esta manera la lesión del tejido. La presente invención se refiere a la inhibición de la activación de los receptores CXCR1 y CXCR2 usando un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a IL-8 humana, Gro-alfa, Gro-beta, Gro-gamma y ENA-78, es decir, un anticuerpo penta-específico.

Compendio de la invención

La presente invención se refiere a un anticuerpo (inmunoglobulina) que tiene múltiples especificidades contenidas dentro de una inmunoglobulina. En particular, el anticuerpo de la presente invención se une a y neutraliza cada una de IL-8 humana, Gro-alfa, Gro-beta, Gro-gamma y ENA-78. El anticuerpo de la presente invención puede ser útil para tratar enfermedades o trastornos caracterizados por un nivel elevado o desequilibrado de una o más de las siguientes proteínas: IL-8 humana, Gro-alfa, Gro-beta, Gro-gamma y ENA-78, particularmente COPD, osteoartritis, artritis reumatoide, artritis erosiva, asma, aterosclerosis, enfermedad inflamatoria del intestino, psoriasis, rechazo de trasplantes, gota, cáncer, lesión pulmonar aguda, enfermedad pulmonar aguda, sepsis, ARDS, enfermedad arterial periférica, esclerosis sistémica, síndrome de insuficiencia respiratoria en recién nacidos, exacerbación del asma y COPD, fibrosis quística, panbronquiolitis difusa, lesión de reperfusión y/o endometriosis con dicho anticuerpo.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un anticuerpo aislado que tiene especificidad por y neutraliza cada una de IL-8 humana, Gro-alfa, Gro-beta, Gro-gamma y ENA-78; de esta manera, el anticuerpo de la presente invención se define como un anticuerpo penta-específico (o pan-ELR). La definición del anticuerpo incluye una porción (o fragmento) de unión a antígenos del anticuerpo tal que la porción (o fragmento) de unión a antígenos se une a IL-8 humana, Gro-alfa, Gro-beta, Gro-gamma y ENA-78. Preferiblemente, el anticuerpo penta-específico de la invención es un anticuerpo monoclonal murino, quimérico, humano o humanizado. Para evitar cualquier duda, no es necesario que el anticuerpo penta-específico de la presente invención se una únicamente a antígenos IL-8, Gro-alfa, Gro-beta, Gro-gamma y ENA-78 humanos, sino que también puede unirse a otras proteínas relacionadas (tales como GCP-2 humana, o incluso puede unirse a ortólogos no humanos de IL-8, Gro-alfa, Gro-beta, Gro-gamma, ENA-78 y GCP-2); en otras palabras, el anticuerpo penta-específico de la presente invención se une mínimamente a IL-8 humana, Gro-alfa, Gro-beta, Gro-gamma y ENA-78.

Preferiblemente, un anticuerpo penta-específico de la presente invención se une a cada una de las IL-8 humana, Gro-alfa, Gro-beta, Gro-gamma y ENA-78 con valores de constante de equilibrio, KD, de menos de 10^{-7} M, más preferiblemente menos de 10^{-8} M y aún más preferiblemente menos de 10^{-9} M, determinados por resonancia de plasmón superficial. Típicamente, la medición de resonancia de plasmón superficial se realiza como se describe a

continuación.

En una realización, el anticuerpo penta-específico se une dentro de un epítopo de KELRCQCIKTYSKP (SEQ ID Nº: 54) de la IL-8 humana.

En una realización, el anticuerpo penta-específico de la presente invención se genera mediante un método que comprende las etapas de usar un protocolo de tipo RIMM (Kilpatrick, K.E., et al. Hybridoma. 1997: 16, 381) usando una mezcla (cóctel) de IL-8 humana, Gro-alfa, Gro-beta, Gro-gamma y ENA-78 junto con una serie de cinco péptidos antigénicos múltiples (MAP), teniendo cada unidad de MAP una secuencia separada de los polipéptidos de los números de identificación: 49-53.

LATELRSQSLQTLQG	SEQ ID Nº: 49
SAKELRSQSIKTYSK	SEQ ID Nº: 50
LRELRSVSLQTTQG	SEQ ID Nº: 51
SPGPHSAQTEVIAT	SEQ ID Nº: 52
ESGPHSANTEIIVK	SEQ ID Nº: 53

Sin limitarse por la teoría, los MAP tienen dos funciones dentro del protocolo de inmunización. En primer lugar, los MAP permiten una presentación múltiple selectiva de una secuencia de aminoácidos diana conocida al sistema inmune del hospedador. En segundo lugar, el aumento de masa, debido a múltiples copias de la secuencia unida mediante un núcleo, tal como, pero sin limitación, a lisina, aumenta la inmunogenicidad de la secuencia por encima de la de péptidos individuales (Francis, J.P., et al., Immunology, 1991: 73; 249, Schott, M.E., et al., Cell. Immuno. 1996: 174: 199-209, Tam, J.P. Proc. Natl. Acad. Sci. 1988: 85; 5409-5413).

Los MAP usados para generar esta invención comprenden múltiples copias de las secuencias diana conservadas (por ejemplo, SEQ ID Nº: 49-53) encontradas con y alrededor de las regiones ELRCXC y GPHCA de quimioquinas diana. En la Figura 1 se representa una serie de MAP ilustrativos.

En una realización, se genera un anticuerpo penta-específico de la presente invención mediante un método que comprende las etapas de:

a. inyectar en un ratón una mezcla de IL-8 humana, Gro-alfa, Gro-beta, Gro-gamma y ENA-78 en adyuvante completo de Freund (cFA);

b. inyectar en el ratón una mezcla de IL-8 humana, Gro-alfa, Gro-beta, Gro-gamma y ENA-78 en adyuvante incompleto de Freund (iFA); y

c. inyectar en el ratón una mezcla de IL-8 humana, Gro-alfa, Gro-beta, Gro-gamma y ENA-78, y una serie de cinco péptidos antigénicos múltiples (MAP), teniendo cada unidad de MAP una secuencia distinta de los polipéptidos con los números de identificación: 49-53 en adyuvante incompleto de Freund;

d. aislar células B del ratón;

e. fusionar las células B con células de mieloma para formar células de hibridoma inmortales que secreten el anticuerpo penta-específico deseado; y

f. aislar el anticuerpo penta-específico del sobrenadante del cultivo del hibridoma.

Si se desea, se puede inyectar opcionalmente en el ratón una mezcla de IL-8 humana, Gro-alfa, Gro-beta, Gro-gamma y ENA-78 y una serie de MAP que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID Nº: 49-53 en PBS entre las etapas c y d.

En otra realización, se genera un anticuerpo penta-específico de la presente invención mediante un método que comprende las etapas de:

a. inyectar en un ratón una serie de cinco péptidos antigénicos múltiples (MAP), teniendo cada unidad de MAP una secuencia distinta de los polipéptidos con los números de identificación: 49-53 (también denominadas en lo sucesivo en este documento la serie de MAP) en adyuvante completo de Freund;

b. inyectar en el ratón la serie de MAP en adyuvante incompleto de Freund;

c. inyectar en el ratón una mezcla de IL-8 humana, Gro-alfa, Gro-beta, Gro-gamma y ENA-78, y la serie de MAP en adyuvante incompleto de Freund;

d. aislar células B del ratón; y

e. fusionar las células B con células de mieloma para formar células de hibridoma inmortales que secreten el anticuerpo penta-específico deseado; y

f. aislar el anticuerpo penta-específico del sobrenadante del cultivo del hibridoma.

Si se desea, se puede inyectar opcionalmente en el ratón una mezcla de IL-8 humana, Gro-alfa, Gro-beta, Gro-gamma y ENA-78, y una serie de MAP que tienen las SEQ ID Nº: 49-53 en PBS entre las etapas c y d.

En una realización, el anticuerpo penta-específico tiene regiones variables de cadena pesada y ligera codificadas por secuencias de nucleótidos que comprenden las secuencias de la SEQ ID Nº: 1 y la SEQ ID Nº: 3, respectivamente, o modificaciones de secuencia conservativas de las mismas.

En una realización, el anticuerpo penta-específico tiene regiones variables de cadena pesada y ligera codificadas por secuencias de nucleótidos que comprenden secuencias de la SEQ ID Nº: 5 y la SEQ ID Nº: 7, respectivamente, o modificaciones de secuencia conservativas de las mismas.

En una realización, el anticuerpo penta-específico tiene una región variable de cadena pesada codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de la SEQ ID Nº: 9, o modificaciones de secuencia conservativas de la misma.

En una realización, el anticuerpo penta-específico tiene regiones variables de cadena pesada y ligera que comprenden las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID Nº: 2 y la SEQ ID Nº: 4, respectivamente, o modificaciones de secuencia conservativas de las mismas.

En una realización, el anticuerpo penta-específico tiene regiones variables de cadena pesada y ligera que comprenden polipéptidos que tienen una identidad de al menos 90%, 95%, 98% o 99% con las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID Nº: 2 y la SEQ ID Nº: 4, respectivamente.

En una realización, el anticuerpo penta-específico tiene regiones variables de cadena pesada y ligera que comprenden las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID Nº: 6 y la SEQ ID Nº: 8, respectivamente, o modificaciones de secuencia conservativas de las mismas.

En una realización, el anticuerpo penta-específico tiene regiones variables de cadena pesada y ligera que comprenden polipéptidos que tienen una identidad de al menos 90%, 95%, 98% o 99% con las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID Nº: 6 y la SEQ ID Nº: 8, respectivamente.

En una realización, el anticuerpo penta-específico tiene regiones variables pesadas y ligeras que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID Nº: 10 y 12, respectivamente, o modificaciones de secuencia conservativas de las mismas.

En una realización, el anticuerpo penta-específico tiene regiones variables de cadena pesada y ligera que comprenden secuencias de polipéptidos que tienen una identidad de al menos 90%, 95%, 98% o 99% con las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID Nº: 10 y 12, respectivamente.

En una realización, el anticuerpo penta-específico comprende al menos una región variable seleccionada entre (i) la SEQ ID Nº: 2, 4, 6, 8, 10 ó 12; o (ii) una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 90%, 95%, 98% o 99% con una cualquiera de las secuencias de aminoácidos de (i) indicadas anteriormente.

En una realización, el anticuerpo penta-específico comprende secuencias de CDR de las SEQ ID Nº: 13, 14, 15, 16, 17 y 18; o una o más de las secuencias de CDR pueden ser modificaciones de secuencia conservativas de las secuencias de las SEQ ID Nº: 13, 14, 15, 16, 17 y 18.

En una realización, la presente invención se refiere a un hibridoma o transfectoma que produce un anticuerpo penta-específico que comprende secuencias de CDR de las SEQ ID Nº: 13, 14, 15, 16, 17 y 18.

En una realización, la presente invención se refiere a una célula eucariota o procariota recombinante que produce un anticuerpo penta-específico que comprende secuencias de CDR de las SEQ ID Nº: 13, 14, 15, 16, 17 y 18.

En una realización, el anticuerpo penta-específico comprende al menos una secuencia de CDR seleccionada entre (i) la SEQ ID Nº: 13, 14, 15, 16, 17 ó 18; o (ii) una modificación de secuencia conservativa de las secuencias indicadas en (i).

En una realización, el anticuerpo penta-específico comprende un polipéptido de la SEQ ID Nº: 15.

En una realización, el anticuerpo penta-específico comprende al menos cuatro secuencias de CDR seleccionadas entre el grupo que consiste en las SEQ ID Nº: 13, 14, 15, 16, 17 y 18; o una o más de las secuencias de CDR pueden ser modificaciones de secuencia conservativas de las secuencias indicadas en las SEQ ID Nº: 13, 14, 15,

16, 17 y 18.

En una realización, el anticuerpo penta-específico comprende regiones variables de cadena pesada y ligera que comprenden las secuencias de aminoácidos de CDR de las SEQ ID Nº: 13, 14 y 15, y las SEQ ID Nº: 16, 17 y 18, respectivamente.

En una realización, el anticuerpo penta-específico comprende secuencias de CDR de las SEQ ID Nº: 19, 20, 21, 22, 23 y 24; o una o más de las secuencias de CDR pueden ser modificaciones de secuencia conservativas de las secuencias indicadas en las SEQ ID Nº: 19, 20, 21, 22, 23 y 24.

En una realización, la presente invención se refiere a un hibridoma o transfectoma que produce un anticuerpo penta-específico que comprende secuencias de CDR de las SEQ ID Nº: 19, 20, 21, 22, 23 y 24.

En una realización, la presente invención se refiere a una célula eucariota o procariota recombinante que produce un anticuerpo penta-específico que comprende secuencias de CDR de las SEQ ID Nº: 19, 20, 21, 22, 23 y 24.

En una realización, el anticuerpo penta-específico comprende al menos una secuencia de CDR seleccionada entre (i) la SEQ ID Nº: 19, 20, 21, 22, 23 ó 24; o (ii) una modificación de secuencia conservativa de las secuencias indicadas en (i).

En una realización, el anticuerpo penta-específico comprende un polipéptido de la SEQ ID Nº: 21.

En una realización, el anticuerpo penta-específico comprende al menos cuatro secuencias de CDR seleccionadas entre el grupo que consiste en: la SEQ ID Nº: 19, 20, 21, 22, 23 y 24; o una o más de las secuencias de CDR pueden ser modificaciones de secuencia conservativas de las secuencias indicadas en las SEQ ID Nº: 19, 20, 21, 22, 23 y 24.

En una realización, el anticuerpo penta-específico comprende regiones variables de cadena pesada y ligera que comprenden las secuencias de aminoácidos de CDR de las SEQ ID Nº: 19, 20 y 21, y la SEQ ID Nº: 22, 23 y 24, respectivamente.

En una realización, el anticuerpo penta-específico comprende secuencias de CDR de las SEQ ID Nº: 25, 26, 27, 28, 29 y 30; o una o más de las secuencias de CDR pueden ser modificaciones de secuencia conservativas de las secuencias indicadas en las SEQ ID Nº: 25, 26, 27, 28, 29 y 30.

En una realización, la presente invención se refiere a un hibridoma o transfectoma que produce un anticuerpo penta-específico que comprende secuencias de CDR de las SEQ ID Nº: 25, 26, 27, 28, 29 y 30.

En una realización, la presente invención se refiere a una célula eucariota o procariota recombinante que produce un anticuerpo penta-específico que comprende secuencias de CDR de las SEQ ID Nº: 25, 26, 27, 28, 29 y 30.

En una realización, el anticuerpo penta-específico comprende al menos una secuencia de CDR seleccionada entre (i) la SEQ ID Nº: 25, 26, 27, 28, 29 ó 30; o (ii) una modificación de secuencia conservativa de las secuencias indicadas en (i).

En una realización, el anticuerpo penta-específico comprende un polipéptido de la SEQ ID Nº: 27.

En una realización, el anticuerpo penta-específico comprende al menos cuatro secuencias de CDR seleccionadas entre el grupo que consiste en: las SEQ ID Nº: 25, 26, 27, 28, 29 y 30; o una o más de las secuencias de CDR pueden ser modificaciones conservativas de las secuencias indicadas en las SEQ ID Nº: 25, 26, 27, 28, 29 y 30.

En una realización, el anticuerpo penta-específico comprende regiones de cadena variable pesada y ligera que comprenden las secuencias de aminoácidos de CDR de las SEQ ID Nº: 25, 26 y 27, y las SEQ ID Nº: 28, 29 y 30, respectivamente.

En una realización, la presente invención se refiere a un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal que tiene una región variable de cadena pesada o ligera codificada por secuencias de nucleótidos que comprenden secuencias de nucleótidos de la SEQ ID Nº: 1, 5 ó 9, o la SEQ ID Nº: 3 ó 7, respectivamente.

En una realización, la presente invención se refiere a un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal que tiene una región variable de cadena pesada o ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID Nº: 2, 6 ó 10, o las SEQ ID Nº: 4, 8 ó 12, respectivamente, y modificaciones de secuencia conservativas de las mismas.

En una realización, la presente invención se refiere a una célula hospedadora eucariota o procariota recombinante que produce un anticuerpo penta-específico que tiene una región variable pesada o ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID Nº: 2, 6 ó 10, o la SEQ ID Nº: 4, 8 ó 12, respectivamente, y modificaciones de secuencia conservativas de las mismas.

En una realización, la presente invención se refiere a un vector de expresión que comprende las secuencias de

nucleótidos que codifican una cadena variable pesada o ligera de un anticuerpo penta-específico que comprende las secuencias de CDR de las SEQ ID Nº: 13, 14 y 15; o las SEQ ID Nº: 16, 17 y 18, respectivamente.

En una realización, la presente invención se refiere a un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de CDR de un anticuerpo penta-específico seleccionado entre la SEQ ID Nº: 13, 14, 15, 16, 17 ó 18.

En una realización, la presente invención se refiere a un vector de expresión que comprende secuencias de nucleótidos que codifican al menos cuatro secuencias de CDR de un anticuerpo penta-específico seleccionado entre el grupo que consiste en las SEQ ID Nº: 13, 14, 15, 16, 17 y 18.

En una realización, la presente invención se refiere a un vector de expresión que comprende secuencias polinucleotídicas de la SEQ ID Nº: 31, 32 ó 33.

En una realización, la presente invención se refiere a un vector de expresión que comprende secuencias polinucleotídicas de las SEQ ID Nº: 34, 35 y 36.

En una realización, la presente invención se refiere a un vector de expresión que comprende al menos cuatro secuencias polinucleotídicas seleccionadas entre el grupo de las SEQ ID Nº: 31, 32, 33, 34, 35 y 36.

En una realización, la presente invención se refiere a un vector de expresión que comprende secuencias de nucleótidos que codifican una cadena variable pesada o ligera de un anticuerpo penta-específico que comprende las secuencias de CDR de las SEQ ID Nº: 19, 20 y 21; o 22, 23 y 24, respectivamente.

En una realización, la presente invención se refiere a un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de CDR de un anticuerpo penta-específico seleccionado entre la SEQ ID Nº: 19, 20, 21, 22, 23 ó 24.

En una realización, la presente invención se refiere a un vector de expresión que comprende las secuencias de nucleótidos que codifican al menos cuatro secuencias de CDR de un anticuerpo penta-específico seleccionado entre el grupo que consiste en las SEQ ID Nº: 19, 20, 21, 22, 23 y 24.

En una realización, la presente invención se refiere a un vector de expresión que comprende secuencias polinucleotídicas de las SEQ ID Nº: 37, 38 y 39.

En una realización, la presente invención se refiere a un vector de expresión que comprende secuencias polinucleotídicas de las SEQ ID Nº: 40, 41 y 42.

En una realización, la presente invención se refiere a un vector de expresión que comprende al menos cuatro secuencias polinucleotídicas seleccionadas entre el grupo de las SEQ ID Nº: 37, 38, 39, 40, 41 y 42.

En una realización, la presente invención se refiere a un vector de expresión que comprende las secuencias de nucleótidos que codifican una cadena variable pesada de un anticuerpo penta-específico que comprende las secuencias de CDR de las SEQ ID Nº: 25, 26 y 27.

En una realización, la presente invención se refiere a un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de CDR de un anticuerpo penta-específico seleccionado entre la SEQ ID Nº: 25, 26 ó 27.

En una realización, la presente invención se refiere a un vector de expresión que comprende secuencias polinucleotídicas de las SEQ ID Nº: 43, 44 y 45.

En una realización, el anticuerpo penta-específico tiene cadenas pesadas y ligeras codificadas por secuencias de nucleótidos que comprenden las secuencias de la SEQ ID Nº: 11 y la SEQ ID Nº: 47, 59, 61 ó 63, respectivamente.

En una realización, el anticuerpo penta-específico tiene cadenas pesadas y ligeras codificadas por secuencias de nucleótidos que comprenden secuencias que tienen una identidad de al menos 90%, 95%, 98% o 99% con las secuencias de la SEQ ID Nº: 11 y la SEQ ID Nº: 47, 59, 61 ó 63, respectivamente.

En una realización, el anticuerpo penta-específico tiene cadenas pesadas y ligeras que comprenden las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID Nº: 46 y la SEQ ID Nº: 48, 60, 62 ó 64, respectivamente.

En una realización, el anticuerpo penta-específico tiene cadenas pesadas y ligeras que comprenden las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID Nº: 46 y la SEQ ID Nº: 48, respectivamente.

En una realización, el anticuerpo penta-específico tiene cadenas pesadas y ligeras que comprenden las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID Nº: 46 y la SEQ ID Nº: 60, respectivamente.

En una realización, el anticuerpo penta-específico tiene cadenas pesadas y ligeras que comprenden las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID Nº: 46 y la SEQ ID Nº: 62, respectivamente.

En una realización, el anticuerpo penta-específico tiene cadenas pesadas y ligeras que comprenden las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID Nº: 46 y la SEQ ID Nº: 64, respectivamente.

En una realización, el anticuerpo penta-específico tiene cadenas pesadas y ligeras que comprenden polipéptidos que tienen una identidad de al menos 90%, 95%, 98% o 99% con las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID Nº: 46 y la SEQ ID Nº: 48, 60, 62 ó 64, respectivamente.

En una realización, la presente invención se refiere a una célula hospedadora eucariota o procariota recombinante que produce un anticuerpo penta-específico que tiene una cadena pesada o ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID Nº: 46 o la SEQ ID Nº: 48, 60, 62 ó 64, respectivamente.

En una realización, la presente invención se refiere a una célula hospedadora eucariota o procariota recombinante que produce un anticuerpo penta-específico que tiene cadenas pesadas y ligeras que comprenden las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID Nº: 46 y la SEQ ID Nº: 48, 60, 62 ó 64, respectivamente.

En una realización, la presente invención se refiere a una célula hospedadora eucariota o procariota recombinante que produce un anticuerpo penta-específico que tiene una cadena pesada o ligera que comprende la secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 90%, 95%, 98% o 99% con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID Nº: 46 o la SEQ ID Nº: 48, 60, 62 ó 64, respectivamente.

En una realización, la presente invención se refiere a una célula hospedadora eucariota o procariota recombinante que produce un anticuerpo penta-específico que tiene cadenas pesadas y ligeras que comprenden las secuencias de aminoácidos que tienen una identidad de al menos 90%, 95%, 98% o 99% con las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID Nº: 46 y la SEQ ID Nº: 48, 60, 62 ó 64, respectivamente.

En una realización, la presente invención se refiere a un vector de expresión que comprende secuencias polinucleotídicas que comprenden secuencias de la SEQ ID Nº: 11 y la SEQ ID Nº: 47, 59, 61 ó 63, respectivamente.

En una realización, la presente invención se refiere a un vector de expresión que comprende secuencias polinucleotídicas que comprenden secuencias que tienen una identidad de al menos 90%, 95%, 98% o 99% con las secuencias de la SEQ ID Nº: 11 y la SEQ ID Nº: 47, 59, 61 ó 63, respectivamente.

En una realización, la presente invención se refiere a un vector de expresión que comprende una secuencia polinucleotídica que comprende una secuencia de la SEQ ID Nº: 11, 47, 59, 61 ó 63.

En una realización, la presente invención se refiere a un vector de expresión que comprende una secuencia polinucleotídica que comprende una secuencia que tiene una identidad de al menos 90%, 95%, 98% o 99% con una secuencia de la SEQ ID Nº: 11, 47, 59, 61 ó 63, respectivamente.

En una realización, la presente invención se refiere a un vector de expresión que comprende secuencias polinucleotídicas que codifican un anticuerpo penta-específico que comprende cadenas pesadas y ligeras que comprenden las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID Nº: 46 y la SEQ ID Nº: 48, 60, 62 ó 64, respectivamente.

En una realización, la presente invención se refiere a un vector de expresión que comprende secuencias polinucleotídicas que codifican un anticuerpo penta-específico que comprende cadenas pesadas y ligeras que comprenden las secuencias de aminoácidos que tienen una identidad de al menos 90%, 95%, 98% o 99% con las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID Nº: 46 y la SEQ ID Nº: 48, 60, 62 ó 64, respectivamente.

En una realización, la presente invención se refiere a un vector de expresión que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID Nº: 46, 48, 60, 62 ó 64.

En una realización, la presente invención se refiere a un vector de expresión que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 90%, 95%, 98% o 99% con las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID Nº: 46, 48, 60, 62 ó 64.

En una realización, la presente invención se refiere a un proceso para producir un anticuerpo penta-específico (inmunoglobulina) en una única célula hospedadora, que comprende las etapas de:

(i) transformar dicha única célula hospedadora con una primera secuencia de ADN que codifica una cadena pesada que comprende el polipéptido de la SEQ ID Nº: 46; y una segunda secuencia de ADN que codifica una cadena ligera que comprende un polipéptido de la SEQ ID Nº: 48, 60, 62 ó 64; y

(ii) expresar dicha primera secuencia de ADN y dicha segunda secuencia de ADN de forma que dichas cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina se produzcan como moléculas separadas en dicha única célula hospedadora transformada;

además, este proceso puede realizarse de tal forma que dicha primera y segunda secuencias de ADN estén presentes en diferentes vectores o dicha primera y segunda secuencias de ADN estén presentes en un único vector.

En una realización, la presente invención se refiere a un proceso para producir un anticuerpo penta-específico (inmunoglobulina) en una única célula hospedadora, que comprende las etapas de:

(i) transformar dicha única célula hospedadora con una primera secuencia de ADN que codifica al menos el dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina que comprende los dominios de CDR de las SEQ ID Nº: 13, 14 y 15; y una segunda secuencia de ADN que codifica al menos el dominio variable de la cadena ligera de inmunoglobulina que comprende los dominios de CDR de las SEQ ID Nº: 16, 17 y 18; y

(ii) expresar dicha primera secuencia de ADN y dicha segunda secuencia de ADN de tal forma que dichas cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina se produzcan como moléculas separadas en dicha única célula hospedadora transformada;

además, este proceso puede realizarse de tal forma que dicha primera y segunda secuencias de ADN estén presentes en vectores diferentes o dicha primera y segunda secuencia de ADN estén presentes en un único vector.

En una realización, la presente invención se refiere a un proceso para producir un anticuerpo penta-específico (inmunoglobulina) en una única célula hospedadora, que comprende las etapas de:

(i) transformar dicha única célula hospedadora con una primera secuencia de ADN que codifica al menos el dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina que comprende los dominios de CDR de las SEQ ID Nº: 19, 20 y 21; y una segunda secuencia de ADN que codifica al menos el dominio variable de la cadena ligera de inmunoglobulina que comprende los dominios de CDR de las SEQ ID Nº: 22, 23 y 24; y

(ii) expresar dicha primera secuencia de ADN y dicha segunda secuencia de ADN de tal forma que dichas cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina se produzcan como moléculas separadas en dicha única célula hospedadora transformada;

este proceso puede realizarse de tal forma que dichas primera y segunda secuencias de ADN estén presentes en diferentes vectores o dichas primera y segunda secuencias de ADN estén presentes en un único vector.

En una realización, la presente invención se refiere a una composición que comprende un anticuerpo penta-específico mencionado anteriormente y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un anticuerpo penta-específico mencionado anteriormente para uso en la prevención y/o tratamiento de COPD, osteoartritis, artritis reumatoide, artritis erosiva, asma, aterosclerosis, enfermedad inflamatoria del intestino, psoriasis, rechazo de trasplantes, gota, cáncer, lesión pulmonar aguda, enfermedad pulmonar aguda, sepsis, ARDS, enfermedad arterial periférica, esclerosis sistémica, síndrome de insuficiencia respiratoria en recién nacidos, exacerbación del asma y COPD, fibrosis quística, panbronquiolitis difusa, lesión de reperfusión y/o endometriosis en un mamífero.

En una realización, el mamífero anterior es un ser humano.

Descripción de las Figuras

La Figura 1 representa una serie ilustrativa de MAP para generar un anticuerpo penta-específico. Para evitar dudas, se ilustran cinco unidades de péptido MAP. Cada unidad contiene una secuencia de aminoácidos idéntica seleccionada entre péptidos lineales de las SEQ ID Nº: 49-53.

La Figura 2 muestra datos de citometría de flujo que comparan los neutrófilos presentes en muestras de BAL. Se presentan las sesiones 1, 2 y 3. Las barras rellenas de color negro muestran los valores basales 5 días antes de la exposición a LPS. Las barras rellenas de color gris ilustran los datos de BAL 6 horas después de la exposición a LPS. El tratamiento con Anticuerpo Quimera (HcLc) inhibió de forma significativa y de forma dependiente de dosis la infiltración de neutrófilos. Las barras sombreadas grises representan datos de 24 horas. (n = 6, *$p \leq 0{,}05$, †$p \leq 0{,}01$, las barras de error representan la desviación típica).

La Figura 3 muestra el análisis hematológico de neutrófilos circulantes totales (recuento celular). La inyección IV de 1 (cuadrados blancos, □) y 10 mg/kg (círculos negros, •) del Anticuerpo Quimera (HcLc) evitó la estimulación por LPS inhalado de neutrófilos circulantes. Tanto el tratamiento con 1 como el tratamiento con 10 mg/kg presentan una reducción significativa en comparación con los NHP tratados con vehículo (†) y el tratamiento con 10 mg/kg también mostró una reducción significativa en comparación con la dosis de 1 mg/kg (*). Los datos se representan como recuento total por μl de sangre (n = 6, *$p \leq 0{,}05$ frente a 1 mg/kg, †$p \leq 0{,}01$ frente a vehículo, las barras de error representan la desviación típica).

La Figura 4 muestra la inhibición de la activación de neutrófilos estimulada por IL-8 humana (aumento de la expresión de CD11b en la superficie). Se pre-incubaron diversas concentraciones de los anticuerpos penta-específicos humanizados con hIL-8 10 nM antes de la adición a neutrófilos humanos purificados. Los datos se expresan como valores medios de 4 donantes diferentes (n = 4). Las barras representan el error típico. Todas las muestras se comparan con neutrófilos purificados estimulados solamente con hIL-8 (sin mAb antes de la adición a neutrófilos purificados). Las construcciones humanizadas H0L10 y H0M0 son más eficaces inhibiendo la expresión

en la superficie de CD11b estimulada por hIL-8.

La Figura 5A muestra la unión de mAb 656.35 de ratón a quimioquinas humanas diana.

La Figura 5B muestra la unión del mAb Anticuerpo Quimera (HcLc) a quimioquinas humanas diana.

La Figura 5C muestra la unión de mAb humanizados a quimioquinas humanas diana.

Descripción Detallada de la Invención

Se entiende que un “anticuerpo penta-específico aislado” o simplemente “anticuerpo penta-específico”, como se usa en este documento, se refiere a un anticuerpo que se une a, y por lo tanto presenta reacción cruzada con IL-8 humana, Gro-alfa, Gro-beta, Gro-gamma y ENA-78, y carece sustancialmente de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas y, además, es una única composición de materia. Para evitar dudas, no es necesario que el anticuerpo penta-específico de la presente invención se una solamente a antígenos IL-8 humana, Gro-alfa, Gro-beta, Gro-gamma y ENA-78, sino que también puede unirse a otras proteínas relacionadas, tales como GCP-2 humana, o incluso puede unirse a ortólogos no humanos de IL-8, Gro-alfa, Gro-beta, Gro-gamma, ENA-78 y GCP-2; en otras palabras, el anticuerpo penta-específico de la presente invención se une mínimamente a IL-8 humana, Gro-alfa, Gro-beta, Gro-gamma y ENA-78. Además, un anticuerpo penta-específico aislado carece sustancialmente de otro material celular y/o compuestos químicos. Un anticuerpo penta-específico, como se usa en este contexto, también incluye fragmentos de unión a antígeno y/o derivados que tienen las características de unión de su anticuerpo penta-específico “parental”. El anticuerpo penta-específico de la presente invención puede comprender dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas, formando la típica molécula de inmunoglobulina simétrica bilateralmente que comprende dos heterodímeros que comprenden, cada uno, una cadena pesada y una cadena ligera. Por consiguiente, el anticuerpo penta-específico de la presente invención puede comprender dos copias del mismo dominio de unión a antígeno formado por la asociación de una cadena pesada con una cadena ligera. El anticuerpo penta-específico de la presente invención, aunque tenga solamente un tipo de dominio de unión, sigue siendo capaz de unirse a, y por lo tanto de tener reacción cruzada con IL-8 humana, Gro-alfa, Gro-beta, Gro-gamma y ENA-78.

Como se usa en este documento, “anticuerpo” también se denomina “inmunoglobulina”.

Como se usa en este documento, “un anticuerpo que tiene reacción cruzada con” significa que el anticuerpo no se une solamente a un antígeno, sino que se une también a otros antígenos.

“Neutralización”, como se usa en este documento, pretende hacer referencia a la inhibición parcial o completa de al menos una actividad biológica de IL-8 humana, Gro-alfa, Gro-beta, Gro-gamma, GCP-2 o ENA-78. Por ejemplo, una de las actividades biológicas de IL-8 humana, Gro-alfa, Gro-beta, Gro-gamma, GCP-2 o ENA-78 es su capacidad de inducir quimiotaxis de neutrófilos.

Una manera de medir la cinética de unión de un anticuerpo es por resonancia de plasmón superficial. La expresión “resonancia de plasmón superficial”, como se usa en este documento, se refiere a un fenómeno óptico que permite el análisis de interacciones bioespecíficas en tiempo real por detección de alteraciones en concentraciones de proteína dentro de una matriz biosensora, por ejemplo, usando el sistema BIAcore (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia y Piscataway, N.J.). Si se desean descripciones adicionales, véase Jonsson, U., et al. (1993) Ann. Biol. Clin. 51:19-26; Jonsson, U., et al. (1991) Biotechniques 11:620-627; Johnsson, B., et al. (1995) J. Mol. Recognit. 8:125-131; y Johnnson, B., et al. (1991) Anal. Biochem. 198:268-277.

El término “epítopo” se refiere a un determinante de proteína capaz de unirse específicamente a un anticuerpo. Los epítopos consisten habitualmente en agrupaciones de superficie químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcares y tienen habitualmente características estructurales tridimensionales específicas así como características de carga específicas.

Un “anticuerpo monoclonal” o mAb (en oposición a anticuerpo policlonal), como se usa en este documento, pretende hacer referencia a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular única. Por ejemplo, un anticuerpo monoclonal de origen murino (anticuerpo monoclonal de ratón) puede prepararse por la tecnología de hibridoma, tal como la metodología de hibridoma convencional de de Kohler y Milstein.

Se pueden obtener células productoras de anticuerpos a partir del sujeto y usarse para preparar anticuerpos monoclonales mediante técnicas convencionales, tales como la técnica de hibridoma descrita originalmente por Kohler y Milstein (1975, Nature 256:495-497) (véase también, Brown et al. (1981) J. Immunol 127:539-46; Brown et al. (1980) J Biol Chem 255:4980-83; Yeh et al. (1976) PNAS 76:2927-31; y Yeh et al. (1982) Int. J. Cancer 29:269-75). La tecnología para producir hibridomas de anticuerpos monoclonales se conoce bien (véase en general R. H. Kenneth, en Monoclonal Antibodies: A New Dimension In Biological Analyses, Plenum Publishing Corp., New York, N.Y. (1980); E. A. Lerner (1981) Yale J. Biol. Med., 54:387-402; M. L. Gefter et al. (1977) Somatic Cell Genet., 3:231-36).

El término “transfectoma”, como se usa en este documento, incluye una célula hospedadora eucariota recombinante

que expresa el anticuerpo, tal como células CHO, células NS/0, células HEK293, células vegetales u hongos, incluyendo células de levadura.

Como se usa en este documento, unión “específica” se refiere a que el anticuerpo se une a un antígeno predeterminado. Típicamente, el anticuerpo se une con una constante de equilibrio, KD, correspondiente a aproximadamente 1 x 10^{-7} M o menor, y se une al antígeno predeterminado con una afinidad correspondiente a una KD que es al menos dos órdenes de magnitud inferior que su afinidad de unión a un antígeno no específico (por ejemplo, BSA, caseína) diferente del antígeno predeterminado o un antígeno muy relacionado. Las expresiones “un anticuerpo que reconoce un antígeno” y “un anticuerpo específico para un antígeno” se usan de forma indistinta en este documento con la expresión “un anticuerpo que se une de forma específica a un antígeno”.

Como se usa en este documento, el término “kd” (seg^{-1}), como se usa en este documento, pretende hacer referencia a la constante de velocidad de disociación de una interacción de anticuerpo-antígeno particular.

El término “ka” (M x seg-1), como se usa en este documento, pretende hacer referencia a la constante de velocidad de asociación de una interacción de anticuerpo-antígeno particular.

El término “KD” (M), como se usa en este documento, pretende hacer referencia a la constante de equilibrio de una interacción de anticuerpo-antígeno particular y se obtiene dividiendo la kd por la ka.

Las “modificaciones de secuencia conservativas” en el caso de secuencias de nucleótidos y de aminoácidos significan cambios que no afectan o alteran de forma significativa a las características de unión del anticuerpo codificado por la secuencia de nucleótidos o que contiene la secuencia de aminoácidos. Tales modificaciones de secuencia conservativas incluyen sustituciones, adiciones y deleciones de nucleótidos y aminoácidos. Se pueden introducir modificaciones en las secuencias mediante técnicas convencionales conocidas en la técnica, tales como mutagénesis dirigida y mutagénesis mediada por PCR. Las sustituciones de aminoácidos conservativas incluyen aquellas en las que el resto aminoacídico se reemplaza por un resto aminoacídico que tiene una cadena lateral similar. En la técnica se han definido bien las familias de restos aminoacídicos que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales ramificadas beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por lo tanto, un resto aminoacídico no esencial previsto en un anticuerpo para el que la secuencia está específicamente descrita se reemplaza preferiblemente por otro resto aminoacídico de la misma familia de cadena lateral. Por lo tanto, en un aspecto, el anticuerpo penta-específico de la presente invención incluye todas las modificaciones de secuencia conservativas de las secuencias de aminoácidos descritas específicamente.

La presente invención también incluye “derivados” de las secuencias de aminoácidos como se han descrito específicamente, donde uno o más de los restos aminoacídicos se han derivatizado, por ejemplo, por acilación o glicosilación, sin afectar o alterar de forma significativa las características de unión del anticuerpo que contiene las secuencias de aminoácidos.

En el caso de los ácidos nucleicos, la expresión “identidad sustancial” indica que dos ácidos nucleicos, o secuencias designadas de los mismos, cuando se alinean de manera óptima y se comparan, son idénticos, con inserciones o deleciones de nucleótidos apropiadas, en al menos aproximadamente 80% de los nucleótidos, habitualmente al menos de aproximadamente 90% a 95 y más preferiblemente al menos de aproximadamente 98% a 99,5% de los nucleótidos. Como alternativa, se dice que hay identidad sustancia cuando los segmentos hibridan en condiciones de hibridación selectivas con el complemento de la cadena.

En el caso de las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos, el término “identidad” indica el grado de identidad entre dos secuencias de ácido nucleico o aminoácidos cuando se alinean de manera óptima y se comparan con inserciones o deleciones apropiadas. Como alternativa, existe identidad sustancial cuando los segmentos de ADN hibridan en condiciones de hibridación selectivas con el complemento de la cadena.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de identidad = nº de posiciones idénticas/nº total de posiciones x 100), teniendo en cuenta el número de huecos y la longitud de cada hueco, que se necesita introducir para el alineamiento óptimo de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede conseguir usando un algoritmo matemático como se describe en los ejemplos no limitantes que se muestran a continuación.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos o de polipéptidos se puede determinar usando el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en http://www.gcg.com), usando una matriz NWSgapdna.CMP y un valor de hueco de 40, 50, 60, 70 u 80 y un valor de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 ó 6. El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos o de aminoácidos también se puede determinar usando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (Comput. Appl. Biosci., 4:11-17 (1988)) que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), usando una tabla de restos de valor PAM120, una penalización de longitud de hueco de 12 y

una penalización de hueco de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se puede determinar usando el algoritmo de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. 48:444-453 (1970)) que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en http://www.gcg.com), usando una matriz Blossom 62 o una matriz PAM250, y un valor de hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6 ó 4 y un valor de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 ó 6.

Un ácido nucleico está "unido de forma funcional" cuando está colocado en relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor o potenciador está unido de forma funcional a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia. Con respecto a la transcripción de secuencias reguladoras, unido de forma funcional significa que las secuencias de ADN que se unen son contiguas y, cuando sea necesario para unir dos regiones codificantes de proteína, contiguas en una fase de lectura. En el caso de las secuencias de cambio, unido de forma funcional indica que las secuencias son capaces de realizar recombinación de cambio.

El término "vector", como se usa en este documento, pretende hacer referencia a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular en el que se pueden ligar segmentos adicionales de ADN. Otro tipo de vector es un vector viral, donde se pueden ligar segmentos adicionales de ADN al genoma viral. Determinados vectores tienen capacidad de replicación autónoma en la célula hospedadora en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores de mamífero episomales). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamífero no episomales) se pueden integrar en el genoma de una célula hospedadora después de la introducción en la célula hospedadora y, por lo tanto, se replican junto con el genoma del hospedador. Además, determinados vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que se unen de forma funcional. Tales vectores se denominan en este documento "vectores de expresión recombinantes" (o simplemente "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante están a menudo en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" se pueden usar de forma indistinta, ya que el plásmido es la forma de vector más comúnmente usada. Sin embargo, la invención pretende incluir otras formas diferentes de vectores de expresión tales como vectores virales (por ejemplo, retrovirus defectuosos en replicación, adenovirus y virus adeno-asociados), que tienen funciones equivalentes.

La expresión "célula hospedadora recombinante" (o simplemente "célula hospedadora"), como se usa en este documento, pretende hacer referencia a una célula en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante. Debe entenderse que tales expresiones pretenden referirse no sólo a la célula objeto particular sino también a la descendencia de dicha célula. Como pueden tener lugar determinadas modificaciones en generaciones sucesivas debido a mutación o influencias ambientales, esta descendencia puede no ser en realidad idéntica a la célula parental, aunque se sigue incluyendo en el alcance de la expresión "célula hospedadora" como se usa en este documento. Las células hospedadoras recombinantes incluyen, por ejemplo, transfectomas, tales como células CHO, células NS/0 y células linfocíticas.

Como se usa en este documento, el término "sujeto" incluye cualquier animal humano o no humano. La expresión "animal no humano" incluye todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, vacas, pollos, anfibios, reptiles, etc.

1. Estructuras de Anticuerpo

Anticuerpos Intactos

Los anticuerpos intactos son habitualmente glicoproteínas heteromultiméricas que comprenden al menos dos cadenas pesadas y dos ligeras. Aparte de IgM, los anticuerpos intactos son glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150 Kda, compuestas por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Típicamente, cada cadena ligera está unida a una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente aunque el número de enlaces disulfuro entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina varía. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro intracatenarios. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V_H) seguido de varias regiones constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable (V_L) y una región constante en su otro extremo; la región constante de la cadena ligera está alineada con la primera región constante de la cadena pesada y el domino variable de cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Las cadenas pesadas de anticuerpos de la mayoría de las especies de vertebrados se pueden asignar a uno de dos tipos denominados Kappa y Lambda basados en la secuencia de aminoácidos de la región constante. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos de la región constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos humanos se pueden asignar a cinco clases diferentes, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. IgG e IgA se pueden subdividir adicionalmente en subclases, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4; e IgA1 e IgA2. Existen variantes de especies en ratón y rata que tienen al menos IgG2a e IgG2b. El dominio variable del anticuerpo confiere especificidad de unión al anticuerpo mostrando determinadas regiones una variabilidad particular y denominándose regiones determinantes de complementariedad (CDR). Las partes más conservadas de la región variable se denominan regiones flanqueantes conservadas (FR). Los dominios variables de cadenas pesadas y ligeras intactas comprenden cada uno cuatro FR conectadas por tres CDR. Las CDR de cada cadena se mantienen muy próximas por las regiones FR y las CDR de la otra cadena contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos.

Las regiones constantes no están implicadas directamente en la unión del anticuerpo al antígeno, pero muestran

diversas funciones efectoras tales como participación en la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpo (ADCC), fagocitosis mediante la unión al receptor de Fcγ, tasa de vida media/aclaramiento mediante el receptor de Fc neonatal (FcRn) y citotoxicidad dependiente de complemento mediante el componente C1q de la cascada del complemento. La región constante de IgG2 humana carece de la capacidad de activar el complemento mediante la vía clásica o de mediar en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo. La región constante de IgG4 carece de la capacidad de activar el complemento por la vía clásica y media solamente de forma débil en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo. Los anticuerpos que esencialmente carecen de estas funciones efectoras se pueden denominar anticuerpos “no líticos”.

Anticuerpos humanos

Los anticuerpos humanos se pueden producir mediante varios métodos conocidos por el especialista en la técnica. Los anticuerpos humanos se pueden obtener mediante método del hibridoma usando líneas celulares de mieloma humano o heteromieloma de ratón-humano, véase Kozbor J. Immunol 133, 3001, (1984) y Brodeur, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, págs. 51-63 (Marcel Dekker Inc, 1987). Los métodos alternativos incluyen el uso de bibliotecas de fagos o ratones transgénicos, utilizando ambos repertorios de región V humana (véase Winter G, (1994), Annu. Rev. Immunol 12,433-455, Green LL (1999), J. Immunol. methods 231, 11-23).

Ahora se dispone de varias cepas de ratones transgénicos en las que su loci de inmunoglobulina de ratón se ha reemplazado por segmentos génicos de inmunoglobulina humana (véase Tomizuka K, (2000) PNAS 97,722-727; Fishwild D.M (1996) Nature Biotechnol. 14,845-851, Mendez MJ, 1997, Nature Genetics, 15,146-156). Después de la exposición al antígeno, tales ratones son capaces de producir un repertorio de anticuerpos humanos de los que se pueden seleccionar los anticuerpos de interés.

De interés particular es el sistema Trimera™ (véase Eren R et al, (1998) Immunology 93:154-161) en el que se transplantan linfocitos humanos en ratones irradiados, el Sistema de Anticuerpo de Linfocitos Seleccionado (SLAM, véase Babcook et al, PNAS (1996) 93:7843-7848) en el que linfocitos humanos (o de otras especies) se pasan de forma eficaz por un procedimiento de generación de anticuerpos in vitro agrupado de forma masiva seguido por un procedimiento de dilución limitante y selección deconvulado y el Xenomouse II™ (Abgenix Inc). Está disponible una estrategia alternativa en Morphotek Inc que usa la tecnología Morphodoma™.

Se puede usar la tecnología de presentación en fagos para producir anticuerpos humanos (y fragmentos de los mismos), véase McCafferty; Nature, 348, 552-553 (1990) y Griffiths AD *et al* (1994) EMBO 13:3245-3260. De acuerdo con esta técnica, se clonan genes de dominio V de anticuerpo en fase en un gen de proteína de revestimiento principal o menor de un bacteriófago filamentoso tal como M13 o fd y se presentan (habitualmente con la ayuda de un fago auxiliar) como fragmentos de anticuerpo funcionales sobre la superficie de la partícula de fago. Las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo dan como resultado la selección del gen que codifica el anticuerpo que muestra estas propiedades. La técnica de presentación en fagos se puede usar para seleccionar anticuerpos con especificidad de antígeno de bibliotecas hechas de células B humanas tomadas de individuos que padecen una enfermedad o trastorno descrito anteriormente o, como alternativa, de donantes humanos no inmunizados (véase Marks; J. Mol. Bio. 222,581-597, 1991). Cuando se desea un anticuerpo humano intacto que comprende un dominio Fc, es necesario volver a clonar el fragmento procedente de la presentación en fagos en un vector de expresión de mamífero que comprende las regiones constantes deseadas y establecer líneas celulares de expresión estable.

Puede usarse la técnica de maduración por afinidad (Marks; Bio/technol 10,779-783 (1992)) para mejorar la afinidad de unión, donde la afinidad del anticuerpo humano primario se mejora sustituyendo de forma secuencial las regiones V de cadena H y L por variantes de origen natural y seleccionando basándose en las afinidades de unión mejoradas. Ahora también están disponibles variantes de esta técnica tales como “impresión de epítopo”, véase el documento WO 93/06213. Véase también Waterhouse; Nucl. Acids Res 21, 2265-2266 (1993).

Anticuerpos Quiméricos y Humanizados

El uso de anticuerpos no humanos intactos en el tratamiento de enfermedades o trastornos humanos conlleva los problemas ahora bien establecidos de la posible inmunogenicidad especialmente después de la administración repetida del anticuerpo, es decir, el sistema inmune del paciente puede reconocer el anticuerpo intacto no humano como no propio y generar una respuesta neutralizadora. Además de desarrollar anticuerpos completamente humanos (véase anteriormente), se han desarrollado diversas técnicas a lo largo de los años para superar esos problemas e implican generalmente reducir la composición de secuencias de aminoácidos no humanas en el anticuerpo terapéutico intacto mientras se conserva una relativa facilidad de obtener anticuerpos no humanos a partir de un animal inmunizado, por ejemplo, ratón, rata o conejo. En general, se han usado dos estrategias para conseguir esto. La primera son anticuerpos quiméricos que comprenden generalmente un dominio variable no humano (por ejemplo, de roedor tal como ratón) fusionado con una región constante humana. Como el sitio de unión al antígeno de un anticuerpo se localiza en las regiones variables, el anticuerpo quimérico conserva su afinidad de unión por el antígeno pero adquiere las funciones efectoras de la región constante humana y, por lo tanto, es capaz de realizar funciones efectoras tales como las descritas *supra*. Los anticuerpos quiméricos se producen típicamente usando métodos de ADN recombinante. El ADN que codifica los anticuerpos (por ejemplo, ADNc) se aísla y

secuencia usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que pueden unirse específicamente a genes que codifican las regiones variables de cadena H y L del anticuerpo de la invención. Las células de hibridoma sirven como una fuente típica de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN se coloca en vectores de expresión que después se introducen por transfección en células hospedadoras tales como *E.Coli*, células COS, células CHO o células de mieloma que no producirían de otro modo proteína inmunoglobulina para obtener las síntesis del anticuerpo. El ADN se puede modificar sustituyendo las regiones constantes H y L no humanas (por ejemplo, murinas) correspondientes por las secuencias codificantes de cadenas L y H humanas, véase, por ejemplo Morrison; PNAS 81, 6851 (1984). Por tanto, en otra realización de la invención se proporciona un anticuerpo quimérico que comprende un dominio V_H que tiene la secuencia: SEQ ID Nº:2, 6 ó 10 y un dominio V_L que tiene una secuencia: SEQ ID Nº: 4, 8, ó 12 fusionado con una región constante human (que puede ser de un isotipo de IgG, por ejemplo, IgG1) .

La segunda estrategia implica la generación de anticuerpos humanizados, donde el contenido no humano del anticuerpo se reduce humanizando las regiones variables. Han ganado popularidad dos técnicas para la humanización. La primera es la humanización por injerto de CDR. Las CDR construyen bucles próximos al extremo N del anticuerpo donde forman una superficie montada en un armazón proporcionado por las regiones flanqueantes. La especificidad de unión a antígeno del anticuerpo se define principalmente por la topografía y por las características químicas de la superficie de su CDR. Estas características se determinan, a su vez, por la conformación de las CDR individuales, por la disposición relativa de las CDR y por la naturaleza y la disposición de las cadenas laterales de los restos que constituyen las CDR. Se puede conseguir una gran disminución en la inmunogenicidad injertando solamente las CDR de anticuerpos (anticuerpos “donadores”) no humanos (por ejemplo, murinos) en una región flanqueante humana adecuada (“región flanqueante aceptora”) y regiones constantes (véase Jones *et al* (1986) Nature 321,522-525 y Verhoeyen M *et al* (1988) Science 239, 1534-1536). Sin embargo, el injerto de CDR *per se* puede no dar como resultado la retención completa de las propiedades de unión a antígeno y se ha observado frecuentemente que algunos restos de región flanqueante del anticuerpo donador necesitan conservarse (lo que se denomina algunas veces “mutaciones de fondo”) en la molécula humanizada si se tiene que recuperar una afinidad de unión a antígenos significativa (véase Queen C *et al* (1989) PNAS 86, 10,029-10,033, Co, M *et al* (1991) Nature 351, 501-502). En este caso se pueden elegir regiones V humanas que muestran la mayor homología de secuencia (típicamente un 60% o mayor) con el anticuerpo donador no humano de una base de datos para proporcionar la región flanqueante (FR) humana. La selección de FR humanas puede hacerse de un consenso humano o de anticuerpos humanos individuales. Cuando es necesario se sustituyen restos clave del anticuerpo donador en la región flanqueante aceptora humana para conservar conformaciones de CDR. Se puede usar el modelado por ordenador del anticuerpo para ayudar a identificar tales restos estructuralmente importantes, véase el documento WO 99/48523.

Alternativamente, se puede conseguir la humanización mediante un proceso de “revestimiento”. Un análisis estadístico de regiones variables de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina humana y de ratón únicas demostró que los patrones precisos de restos expuestos son diferentes en anticuerpos humanos y murinos, y la mayoría de las posiciones de superficie individuales tienen una fuerte preferencia por un pequeño número de restos diferentes (véase Padlan E.A. *et al*; (1991) Mol. Immunol. 28, 489-498 y Pedersen J.T. *et al* (1994) J. Mol. Biol. 235; 959-973). Por lo tanto, es posible reducir la inmunogenicidad de una Fv no humana sustituyendo restos expuestos en sus regiones flanqueantes que difieran de los observados habitualmente en anticuerpos humanos. Como la antigenicidad de proteínas se puede correlacionar con la accesibilidad de superficie, la sustitución de los restos de superficie puede ser suficiente para hacer que la región variable de ratón sea “invisible” al sistema inmune humano (véase también Mark G.E. *et al* (1994) en *Handbook of Experimental Pharmacology vol.113: The pharmacology of monoclonal Antib*odies, Editorial Springer-Verlag, páginas 105-134). Este procedimiento de humanización se denomina “revestimiento”, ya que solamente se altera la superficie del anticuerpo, los restos de soporte permanecen sin alterar. En el documento WO 04/006955 se expone una estrategia alternativa adicional.

Otras estrategias alternativas adicionales incluyen las indicadas en el documento WO 04/006955 y el procedimiento de HumaneeringTM (Kalobios) que usa sistemas de expresión bacterianos y produce anticuerpos que están próximos a la línea germinal humana según la secuencia (Alfenito-M Advancing Protein Therapeutics Enero 2007, San Diego, California). Otra estrategia de humanización implica seleccionar regiones flanqueantes aceptoras humanas basándose en la similitud estructural de regiones CDR humanas a las regiones CDR de anticuerpo de ratón donador lugar de la homología entre otras regiones del anticuerpo tales como regiones flanqueantes. Este proceso se conoce también como Superhumanisation™ (Evogenix Inc.; Hwang et al (2005) Methods 36:35-42).

Será evidente para los especialistas en la técnica que el término “procedente” pretende definir no sólo la fuente en el sentido de que es el origen *físico* del material, sino también para definir el material que es estructuralmente idéntico al material pero que no se origina a partir de la fuente de referencia. Por lo tanto, “los restos observados en el anticuerpo donador” no se tienen que haber purificado necesariamente del anticuerpo donador.

Fragmentos de Anticuerpo

En determinadas realizaciones de la invención se proporciona un anticuerpo terapéutico que es un fragmento de unión a un antígeno. Tales fragmentos pueden ser fragmentos de unión a antígeno funcionales de anticuerpos intactos y/o humanizados y/o quiméricos tales como fragmentos Fab, Fd, Fab', $F(ab')_2$, Fv o ScFv de los anticuerpos

descritos *supra*. Los fragmentos que carecen de la región constante carecen de la capacidad de activar el complemento por la vía clásica o de mediar en la citotoxicidad celular dependiente de un anticuerpo. Tales fragmentos se producen tradicionalmente por la digestión proteolítica de anticuerpos intactos por, por ejemplo, digestión con papaína (véase, por ejemplo, el documento WO 94/29348) pero se pueden producir directamente a partir de células hospedadoras transformadas recombinantemente. Para la producción de ScFv, véase Bird *et al* ; (1988) Science, 242, 423-426. Además, los fragmentos de anticuerpo se pueden producir usando una diversidad de técnicas de ingeniería genética como se describe a continuación.

Parece ser que los fragmentos Fv tienen menor energía de interacción en sus dos cadenas laterales que los fragmentos Fab. Para estabilizar la asociación de los dominios V_H y V_L, se han asociado a péptidos (Bird *et al*, (1988) Science 242, 423-426, Huston *et al*, PNAS, 85, 5879-5883), puentes disulfuro (Glockshuber *et al*, (1990) Biochemistry, 29, 1362-1367) y mutaciones de “bultos en huecos” (“knob in hole”) (Zhu *et al* (1997), Protein Sci., 6, 781-788). Se pueden producir fragmentos ScFv por métodos bien conocidos por los especialistas en la técnica, véase Whitlow *et al* (1991) Methods companion Methods Enzymol, 2, 97-105 y Huston *et al* (1993) Int. Rev. Immunol 10, 195-217. Se pueden producir ScFv en células bacterianas tales como *E. coli*, pero se producen más típicamente en células eucariotas. Una desventaja de ScFv es la monovalencia del producto, que impide una avidez aumentada debido a la unión polivalente y su vida media corta. Los intentos para superar esos problemas incluyen $(ScFv')_2$ bivalentes producidos a partir de ScFV que contiene una cisteína C-terminal adicional por acoplamiento químico (Adams *et al* (1993) Can. Res 53, 4026-4034 y McCartney *et al* (1995) Protein Eng. 8, 301-314) o por dimerización específica de sitio espontánea de ScFv que contiene un resto de cisteína C-terminal desapareado (véase Kipriyanov *et al* (1995) Cell. Biophys 26, 187-204). Como alternativa, se puede forzar el ScFv a formar multímeros acortando el enlazador peptídico a una longitud comprendida entre 3 y 12 restos para formar “diacuerpos”, véase Holliger *et al* PNAS (1993), 90, 6444-6448. De forma adicional, la reducción del enlazador puede dar como resultado trímeros de ScFV (“triacuerpos”, véase Kortt *et al* (1997) Protein Eng, 10, 423-433) y tetrámeros (“tetracuerpos”, véase Le Gall *et al* (1999) FEBS Lett, 453, 164-168). También se puede conseguir la construcción de moléculas de ScFV bivalentes por fusión genética con motivos dimerizantes de proteína para formar “minianticuerpos” (véase Pack *et al* (1992) Biochemistry 31, 1579-1584) y “minicuerpos” (véase Hu *et al* (1996), Cancer Res. 56, 3055-3061). También se pueden producir tándems de ScFv-Sc-Fv ($(ScFV)_2$) uniendo dos unidades de ScFv por un tercer enlazador peptídico, véase Kurucz *et al* (1995) J. Immol. 154, 4576-4582. Se pueden producir diacuerpos biespecíficos por la asociación no covalente de dos productos de fusión de cadena única que consisten en un dominio V_H de un anticuerpo conectado con un enlazador corto al dominio V_L del otro anticuerpo, véase Kipriyanov *et al* (1998), Int. J. Can 77,763-772. La estabilidad de tales diacuerpos biespecíficos se puede mejorar mediante la introducción de puentes disulfuro o mutaciones de “bultos en huecos” como se describe *supra* o por medio de la formación de diacuerpos de cadena única (ScDb) donde dos fragmentos híbridos de ScFv se conectan por un enlazador peptídico, véase Kontermann *et al* (1999) J. Immunol. Methods 226 179-188. Están disponibles moléculas biespecíficas tetravalentes, por ejemplo, fusionando un fragmento ScFv al dominio CH3 de una molécula de IgG o a un fragmento Fab por la región bisagra, véase Coloma *et al* (1997) Nature Biotechnol. 15, 159-163. Como alternativa, se han creado moléculas biespecíficas tetravalentes por la fusión de diacuerpos de cadena única biespecíficos (véase Alt *et al*, (1999) FEBS Lett 454, 90-94). También se pueden formar moléculas biespecíficas tetravalentes menores por la dimerización de tándems de ScFv-ScFv con un enlazador que contiene un motivo hélice-bucle-hélice (minianticuerpos DiBi, véase Muller *et al* (1998) FEBS Lett 432, 45-49) o una molécula de cadena única que comprende cuatro dominios variables de anticuerpo (V_H y V_L) en una orientación que evita el apareamiento intramolecular (diacuerpo en tándem, véase Kipriyanov *et al*, (1999) J. Mol. Biol. 293, 41-56). Se pueden crear fragmentos biespecíficos de $F(ab')_2$ por acoplamiento químico de fragmentos Fab’ o por heterodimerización por cremalleras de leucina (véase Shalaby *et al*, (1992) J. Exp. Med. 175, 217-225 y Kostelny *et al* (1992), J. Immunol. 148, 1547-1553). También están disponibles los denominados anticuerpos de dominio basados en dominios V_H o V_L aislados (Domantis Ltd.), véanse los documentos US 6.248.516; US 6.291.158; US 6.172.197.

Anticuerpos heteroconjugados

Los anticuerpos heteroconjugados son derivados que también constituyen una realización de la presente invención. Los anticuerpos heteroconjugados se componen de dos anticuerpos unidos de forma covalente formados usando cualquier método de entrecruzamiento conveniente. Véase el documento US 4.676.980.

Otras modificaciones

Los anticuerpos de la presente invención también pueden incorporar cualquier otra modificación en las regiones constantes. Por ejemplo, se sabe que la glicosilación de anticuerpos en posiciones conservadas en sus regiones constantes tiene un efecto profundo en la función del anticuerpo, particularmente el funcionamiento efector tal como se ha descrito anteriormente; véase, por ejemplo, Boyd *et al* (1996), Mol. Immunol. 32, 1311-1318. Se contemplan variantes de glicosilación de los anticuerpos terapéuticos de la presente invención donde se añaden, sustituyen, delecionan o modifican uno o más restos de carbohidrato. La introducción de un motivo asparagina-X-serina o asparagina-X-treonina crea un sitio posible para la unión enzimática de restos de carbohidrato y puede usarse, por lo tanto, para manipular la glicosilación de un anticuerpo. En Raju *et al* (2001) Biochemistry 40, 8868-8876 la sialilación terminal de una inmunoadhesina TNFR-IgG se aumentó por un proceso de regalactosilación y/o resialilación usando beta-1,4-galactosiltransferasa y/o alfa-2,3-sialiltransferasa. Se cree que el aumento de la sialización terminal aumenta la vida media de la inmunoglobulina. Los anticuerpos, en común con la mayoría de las glicoproteínas, se

producen típicamente en la naturaleza, como una mezcla de glicoformas. Esta mezcla es particularmente evidente cuando los anticuerpos se producen en células eucariotas, particularmente de mamífero. Se han desarrollado una diversidad de métodos para fabricar glicoformas definidas, véase Zhang *et al* Science (2004), 303, 371, Sears *et al*, Science, (2001) 291, 2344, Wacker *et al* (2002) Science, 298 1790, Davis *et al* (2002) Chem. Rev. 102, 579, Hang *et al* (2001) Acc. Chem. Res 34, 727. Por lo tanto, la invención se refiere a una pluralidad de anticuerpos terapéuticos (que pueden ser del isotipo de IgG, por ejemplo, IgG1) como se describe en este documento que comprenden un número definido (por ejemplo, 7 o menos, por ejemplo, 5 o menos, tal como dos o una sola) glicoforma(s) de dichos anticuerpos.

Los derivados de acuerdo con la invención también incluyen anticuerpos terapéuticos de la invención acoplados a un polímero no proteico, tal como polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol o polioxialquileno. La conjugación de proteínas a PEG es una técnica establecida para aumentar la vida media de las proteínas, así como para reducir la antigenicidad y la inmunogenicidad de las proteínas. El uso de PEGilación con diferentes pesos moleculares y estilos (lineal o ramificado) se ha investigado con anticuerpos intactos así como con fragmentos Fab', véase Koumenis I.L. *et al* (2000) Int. J. Pharmaceut. 198:83-95. Una realización particular comprende un fragmento de unión a antígeno de la invención sin las funciones efectoras de a) activación de complemento por la vía clásica; y b) mediación en la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo; (tal como un fragmento Fab o un scFv) acoplado a PEG. Se cree que la interacción entre la región Fc de un anticuerpo y diversos receptores Fc (FcγR) media en las funciones efectoras del anticuerpo, que incluyen citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), fijación de complemento, fagocitosis y vida media/aclaramiento del anticuerpo. Se pueden realizar diversas modificaciones de la región Fc de los anticuerpos de la invención dependiendo de la propiedad efectora deseada. En particular, regiones constantes humanas que carecen esencialmente de las funciones de a) activación de complemento por la vía clásica; y b) mediación en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo incluyen la región constante de IgG4, la región constante de IgG2 y las regiones constantes de IgG1 que contienen mutaciones específicas tales como, por ejemplo, en las posiciones 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 y/o 322 descritas en los documentos EP 0307434 (documento WO 8807089), EP 0629 240 (documento WO 9317105) y WO 2004/014953. Se han descrito de forma separada mutaciones en los restos 235 ó 237 en el dominio CH2 de la región constante de cadena pesada (numeración Kabat; sistema de índice EU) para reducir la unión a FcγRI, FcγRII y FcγRIII y, por lo tanto, reducir la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) (Duncan et al. Nature 1988, 332; 563-564; Lund et al. J. Immunol. 1991, 147; 2657-2662; Chappel et al. PNAS 1991, 88; 9036-9040; Burton y Woof, Adv. Immunol. 1992, 51;1-84; Morgan et al., Immunology 1995, 86; 319-324; Hezareh et al., J. Virol. 2001, 75 (24); 12161-12168). Además, algunos informes también han descrito la implicación de algunos de estos restos en el reclutamiento o en la mediación en la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) (Morgan et al., 1995; Xu et al., Cell. Immunol. 2000; 200:16-26; Hezareh et al., J. Virol. 2001, 75 (24); 12161-12168). Por lo tanto, los restos 235 y 237 se han mutado a restos de alanina (Brett et al. Immunology 1997, 91; 346-353; Bartholomew et al. Immunology 1995, 85; 41-48; y documento WO 9958679) para reducir tanto los efectos mediados por complemento como los mediados por FcγR. Los anticuerpos que comprenden estas regiones constantes se pueden denominar anticuerpos "no líticos".

Se puede incorporar un epítopo de unión a receptor de tipo silvestre en el anticuerpo para aumentar la vida media en suero; véase el documento US 5.739.277.

Hay cinco receptores de Fcγ humanos reconocidos actualmente, FcγR (I), FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa y FcRn neonatal. Shields *et al*, (2001) J. Biol. Chem 276, 6591-6604 demostraron que una serie común de restos de IgG1 está implicada en la unión de todos los FcγR, mientras que FcγRII y FcγRIII utilizan sitios diferentes fuera de esta serie común. Un grupo de restos de IgG1 disminuyó la unión a todos los FcγR cuando se alteró a alanina: Pro-238, Asp-265, Asp-270, Asn-297 y Pro-239. Todos están en el dominio CH2 de IgG y se agrupan cerca de la bisagra que une CH1 y CH2. Mientras que FcγRI solamente utiliza la serie común de restos de IgG1 para la unión, FcγRII y FcγRIII interaccionan con restos diferentes además de la serie común. La alteración de algunos restos redujo la unión solamente a FcγRII (por ejemplo, Arg-292) o FcγRIII (por ejemplo, Glu-293). Algunas variantes mostraron unión mejorada a FcγRII o FcγRIII pero no afectaron a la unión al otro receptor (por ejemplo, Ser-267Ala mejoró la unión a FcγRII pero no se vio afectada la unión a FcγRIII). Otras variantes mostraron unión mejorada a FcγRII o FcγRIII con reducción de la unión al otro receptor (por ejemplo, Ser-298Ala mejoró la unión a FcγRIII y disminuyó la unión a FcγRII). Para FcγRIIIa, las variantes de IgG1 de mejor unión tenían sustituciones de alanina combinadas en Ser-298, Glu-333 y Lys-334. Se cree que el receptor FcRn neonatal está implicado en la protección de moléculas de IgG de la degradación y, por lo tanto, la mejora de la vida media en suero y la transcitosis a través de tejidos (véase Junghans R.P (1997) Immunol. Res 16. 29-57 y Ghetie *et al* (2000) Annu. Rev. Immunol. 18, 739-766). Se determinó que los restos de IgG1 humana que interactúan directamente con FcRn humano incluyen Ile253, Ser254, Lys288, Thr307, Gln311, Asn434 y His435.

El anticuerpo terapéutico de la invención puede incorporar cualquiera de las anteriores modificaciones de región constante.

2. Métodos de producción

Los anticuerpos de la presente invención se pueden producir en organismos transgénicos tales como cabras (véase Pollock *et al* (1999), J. Immunol. Methods 231:147-157), pollos (véase Morrow KJJ (2000) Genet. Eng. News 20:1-

55), ratones (véase Pollock *et al ibid*) o plantas (véase Doran PM, (2000) Curr. Opinion Biotechnol. 11, 199-204, Ma JK-C (1998), Nat. Med. 4; 601-606, Baez J *et al*, BioPharm (2000) 13: 50-54, Stoger E *et al*; (2000) Plant Mol. Biol. 42:583-590). También se pueden producir anticuerpos por síntesis química. Sin embargo, los anticuerpos de la invención se producen típicamente usando la tecnología de cultivo celular recombinante bien conocida por los especialistas en la técnica. Se aísla un polinucleótido que codifica el anticuerpo y se inserta en un vector replicable tal como un plásmido para la clonación adicional (amplificación) o expresión en una célula hospedadora. Un sistema de expresión útil es un sistema de glutamato sintetasa (tal como el comercializado por Lonza Biologics), particularmente cuando la célula hospedadora es CHO o NS0 (véase a continuación). El polinucleótido que codifica el anticuerpo se aísla de forma rápidamente y se secuencia usando procedimientos convencionales (por ejemplo, sondas oligonucleotídicas). Los vectores que se pueden usar incluyen plásmidos, virus, fagos, transposones o minicromosomas, siendo los plásmidos una realización típica. En general, tales vectores incluyen adicionalmente una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y secuencias de terminación de la transcripción unidas de forma funcional en el polinucleótido de cadena ligera y/o pesada para facilitar la expresión. Se pueden insertar polinucleótidos que codifican las cadenas ligera y pesada en vectores separados e introducirse (por ejemplo, por transformación, transfección, electroporación o transducción) en la misma célula hospedadora de forma simultánea o de forma secuencial o, si se desea, tanto la cadena pesada como la cadena ligera se pueden insertar en el mismo vector antes de tal introducción.

Será inmediatamente evidente para los especialistas en la técnica que debido a la redundancia del código genético también están disponibles polinucleótidos alternativos a los descritos en este documento que codificarán los polipéptidos de la invención.

Secuencia señal

Los anticuerpos de la presente invención pueden producirse como una proteína de fusión con una secuencia señal heteróloga que tiene un sitio de escisión específico en el extremo N de la proteína madura. La secuencia señal debe reconocerse y procesarse por la célula hospedadora. En el caso de células hospedadoras procariotas, la secuencia señal puede ser una fosfatasa alcalina, penicilinasa o líderes de enterotoxina II térmicamente estables. Para la secreción en levaduras, las secuencias señal pueden ser un líder de invertasa de levadura, el líder del factor α o líderes de fosfatasa ácida; véase, por ejemplo, el documento WO 90/13646. En sistemas de células de mamífero, se dispone de líderes secretores virales tales como la señal gD de herpes simplex y una secuencia señal de inmunoglobulina nativa (tal como la cadena pesada de Ig humana). Típicamente la secuencia señal se une en una fase de lectura a un polinucleótido que codifica el anticuerpo de la invención.

Origen de replicación

Los orígenes de replicación son bien conocidos en la técnica siendo pBR322 adecuado para la mayoría de bacterias gram-negativas, el plásmido 2μ para la mayoría de las levaduras y diversos orígenes virales tales como SV40, polioma, adenovirus, VSV o BPV para la mayoría de las células de mamífero. Generalmente, el origen del componente de replicación no es necesario para vectores de expresión de mamífero integrados, a menos que se requiera la propagación del vector en *E. coli*. Sin embargo, puede usarse el ori de SV40 ya que contiene el promotor temprano.

Marcador de selección

Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos o a otras toxinas, por ejemplo ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina o (b) complementan deficiencias auxotróficas o suministran nutrientes no disponibles en el medio complejo o (c) combinaciones de ambas cosas. El esquema de selección puede implicar detener el crecimiento de las células hospedadoras que no contienen el vector o vectores. Las células que se han transformado de forma satisfactoria con los genes que codifican el anticuerpo terapéutico de la presente invención sobreviven debido, por ejemplo a la resistencia a fármacos conferida por el marcador de selección coadministrado. Un ejemplo es el sistema de selección de DHFR- en el que se generan transformantes en cepas hospedadoras de DHFR negativas (véase, por ejemplo, Page y Sydenham 1991 Biotechnology 9: 64-68). En este sistema, el gen de DHFR se coadministra con secuencias polinucleotídicas de anticuerpo de la invención y después se seleccionan las células DHFR positivas por retirada de nucleósido. Si se desea, también se emplea el inhibidor de DHFR metotrexato para seleccionar los transformantes con amplificación del gen de la DHFR. Por medio de la unión funcional del gen de la DHFR a las secuencias codificantes de anticuerpo de la invención o derivados funcionales de las mismas, la amplificación del gen de la DHFR tiene como resultado la amplificación concomitante de las secuencias de anticuerpo deseadas de interés. Las células de CHO son una línea celular particularmente útil para esta selección de DHFR/metotrexato y en la técnica están bien establecidos métodos para amplificar y seleccionar células hospedadoras usando el sistema DHFR; véase Kaufman R.J. et al J. Mol. Biol. (1982) 159, 601-621, como revisión, véase Werner RG, Noe W, Kopp K, Schluter M," Appropriate mammalian expression systems for biopharmaceuticals", Arzneimittel-Forschung. 48(8):870-80, 1998 Aug. Otro ejemplo es el sistema de expresión de glutamato sintetasa (Lonza Biologics). Un gen de selección adecuado para uso en levadura es el gen trp1; véase Stinchcomb *et al* Nature 282, 38, 1979.

Promotores

Los promotores adecuados para expresar los anticuerpos de la invención se unen de forma funcional al ADN/polinucleótido que codifica el anticuerpo. Los promotores para hospedadores procariotas incluyen el promotor de phoA, sistemas promotores de Beta-lactamasa y de lactosa, fosfatasa alcalina, promotores de triptófano e híbridos tales como Tac. Los promotores adecuados para la expresión en células de levadura incluyen 3-fosfoglicerato quinasa y otras enzimas glicolíticas, por ejemplo enolasa, gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato de descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa 6 fosfatoisomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa y glucoquinasa, entre otras. Los promotores de levadura inducibles incluyen alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, metalotioneína y enzimas responsables del metabolismo de nitrógeno o la utilización de maltosa/galactosa, entre otras.

Los promotores para la expresión en sistemas de células de mamífero incluyen promotores de ARN polimerasa II, incluyendo promotores virales tales como polioma, virus de la viruela aviar y adenovirus (por ejemplo adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus (en particular, el promotor del gen temprano inmediato), retrovirus, virus de la hepatitis B, actina, promotor del virus del sarcoma de Rous (RSV) y el promotor temprano o tardío del virus de simio 40, y promotores no virales tales como EF-1alfa (Mizushima y Nagata Nucleic Acids Res 1990 18(17):5322, entre otros. La elección del promotor puede basarse en la compatibilidad adecuada con la célula hospedadora usada para la expresión.

Elemento potenciador

Cuando sea apropiado, por ejemplo, para la expresión en eucariotas superiores, pueden incluirse elementos potenciadores adicionales en lugar de o además de los encontrados localizados en los promotores descritos anteriormente. Las secuencias potenciadoras de mamíferos adecuadas incluyen elementos potenciadores de globina, elastasa, albúmina, fetoproteína, metaliotionina e insulina. Como alternativa, se puede utilizar un elemento potenciador de un virus de célula eucariota tal como el potenciador de SV40, el potenciador temprano del citomegalovirus, el potenciador del polioma, el potenciador baculoviral o el locus de IgG2a murino (véase el documento WO 04/009823). Aunque estos potenciadores típicamente se localizan en el vector en un sitio cadena arriba del promotor, también pueden localizarse en cualquier sitio, por ejemplo dentro de la región no traducida o cadena abajo de la señal de poliadenilación. La elección y colocación del potenciador puede basarse en la compatibilidad adecuada con la célula hospedadora usada por la expresión.

Poliadenilación/Terminación

En sistemas eucariotas, las señales de poliadenilación se unen funcionalmente a polinucleótidos que codifican el anticuerpo de esta invención. Estas señales típicamente se colocan en posición 3' de la fase de lectura abierta. En los sistemas de mamífero, ejemplos no limitantes de las señales incluyen las derivadas de hormonas de crecimiento, el factor de elongación 1-alfa y genes virales (por ejemplo, de SV40) o repeticiones terminales largas retrovirales. En sistemas de levadura, los ejemplos no limitantes de señales de poliadenilación/terminación incluyen las derivadas de los genes de la fosforglicerato quinasa (PGK) y la alcohol de deshidrogenasa 1 (ADH). En los sistemas procariotas, las señales de poliadenilación típicamente no son necesarias y en su lugar es habitual emplear secuencias terminadoras más cortas y más definidas. La elección de secuencias de poliadenilación/terminación puede basarse en una compatibilidad adecuada con la célula hospedadora usada para la expresión.

Otros métodos/elementos para mejorar el rendimiento

Además de lo anterior, otras características que pueden emplearse para mejorar los rendimientos incluyen elementos de remodelación de cromatina, modificación de intrones y modificación de codones específicos para células hospedadoras. El uso de codones del anticuerpo de esta invención puede modificarse para acomodar desviaciones de codones de la célula hospedadora para aumentar la transcripción y/o el rendimiento del producto (por ejemplo Hoekema A et al Mol Cell Biol 1987 7(8):2914-24). La elección de los codones puede basarse en la compatibilidad adecuada con la célula hospedadora usada para la expresión.

Células hospedadoras

Las células hospedadoras adecuadas para la clonación o expresión de vectores que codifican anticuerpos de la invención son, por ejemplo, células procariotas, levaduras o células eucariotas superiores. Las células procariotas adecuadas incluyen eubacterias, por ejemplo, enterobacterias tales como *Escherichia* por ejemplo. *E. coli* (por ejemplo ATCC 31.446; 31.537; 27.325), *Enterobacter, Erwinia, Klebsiella Proteus, Salmonella,* por ejemplo*, Salmonella typhimurium*, Serratia, por ejemplo, *Serratia marcescans* y *Shigella*, así como bacilos tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (véase el documento DD 266 710), Pseudomonas tales como *P. aeruginosa* y *Streptomyces*. De las células hospedadoras de levadura se contemplan *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces* (por ejemplo ATCC 16.045; 12.424; 24178; 56.500), *yarrowia* (EP402, 226), *Pichia Pastoris* (EP183.070, véase también Peng *et al* J.Biotechnol. 108 (2004) 185-192), *Candida, Trichoderma reesia* (EP244, 234*), Penicillin, Tolypocladium* y hospedadores *Aspergillus* tales como *A. nidulans* y *A. niger.*

Aunque la invención contempla específicamente células hospedadoras procariotas y de levadura, sin embargo, típicamente las células hospedadoras de la presente invención son células de vertebrados. Las células hospedadoras de vertebrados adecuadas incluyen células de mamífero tales como COS-1 (ATCC Nº CRL 1650) COS-7 (ATCC CRL 1651), línea de riñón embrionario humano 293, PerC6 (Crucell), células de riñón de cría de hámster (BHK) (ATCC CRL.1632), BHK570 (ATCC NO: CRL 10314), 293 (ATCC NO.CRL 1573), células de ovario de hámster chino CHO (por ejemplo CHO-K1, ATCC NO: CCL 61, la línea celular DHFR-CHO tal como DG44 (véase Urlaub *et al*, (1986) ibid), particularmente las líneas celulares CHO adaptadas para el cultivo suspensión, células de sertoli de ratón, células de riñón de mono, células de riñón de mono verde africano (ATCC CRL-1587), células HELA, células de riñón canino (ATCC CCL 34), células de pulmón humano (ATCC CCL 75), Hep G2 y células de mieloma o linfoma, por ejemplo, NS0 (véase el documento US 5.807.715), Sp2/0, Y0.

De esta manera, en una realización de la invención se proporciona una célula hospedadora transformada de manera estable que comprende un vector que codifica una cadena pesada y/o cadena ligera del anticuerpo terapéutico como se describe en ese documento. Típicamente, estas células hospedadoras comprenden un primer vector que codifica la cadena ligera y el segundo vector que codifica dicha cadena pesada.

Estas células hospedadoras también pueden modificarse o adaptarse adicionalmente por ingeniería genética para modificar la calidad, la función y/o el rendimiento del anticuerpo de esta invención. Los ejemplos no limitantes incluyen la expresión de enzimas de modificación específicas (por ejemplo glicosilación), y chaperones de plegamiento de proteínas.

Métodos de cultivo celular

Las células hospedadoras transformadas con vectores que codifican los anticuerpos terapéuticos de la invención pueden cultivarse por cualquier método conocido por los especialistas en la técnica. Las células hospedadoras pueden cultivarse en matraces de centrifugación, matraces giratorios, frascos cilíndricos o sistemas de fibras huecas, pero se prefiere para la producción a gran escala usar reactores de depósito agitado o reactores de bolsa (por ejemplo Wave Biotech, Somerset, New Jersey USA) particularmente para los cultivos en suspensión. Típicamente, los depósitos agitados se adaptan para la aireación usando, por ejemplo, rociadores, tabiques o impulsores de bajo cizallamiento. Para las columnas de burbujas y reactores de ascenso por aire, puede usarse la aireación directa con burbujas de aire o de oxígeno. Cuando las células hospedadoras se cultivan en un medio de cultivo sin suero, se prefiere suplementar el medio con un agente protector de las células tal como pluronic F-68 para ayudar a prevenir lesiones celulares como resultado del proceso de aireación. Dependiendo de las características de las células hospedadoras, pueden usarse microsoportes como sustratos de crecimiento para las líneas celulares dependientes de anclaje o las células pueden adaptarse al cultivo en suspensión (lo cual es típico). El cultivo de las células hospedadoras, particularmente las células hospedadoras de vertebrado, puede utilizar diversos modos de operación tales como un procesamiento discontinuo, semicontinuo, discontinuo repetido (véase Drapeau *et al* (1994) cytotechnology 15: 103-109), un proceso discontinuo prolongado o cultivo de perfusión. Aunque las células hospedadoras de mamífero trasformadas de forma recombinante pueden cultivarse en medios que contienen suero tales como medios que comprenden suero bovino fetal (FCS), se prefiere que estas células hospedadoras se cultiven en medios sintéticos sin suero tales como el descrito en Keen *et al* (1995) Cytotechnology 17:153-163, o medios disponibles en el mercado tales como CHO-CDM o UltraCHO™ (Cambrex NJ, USA), suplementado cuando sea necesario con una fuente de energía tal como glucosa y factores de crecimiento sintéticos tales como insulina recombinante. El cultivo sin suero de las células hospedadoras puede requerir que esas células se adapten al crecimiento en condiciones sin suero. Una estrategia de adaptación es cultivar estas células hospedadoras en medios que contienen suero y cambiar repetidamente 80% del medio de cultivo por medio sin suero de forma que las células hospedadoras aprendan a adaptarse en condiciones sin suero (véase, por ejemplo, Scharfenberg *K et al* (1995) in *Animal Cell technology: Developments towards the 21st century* (Beuvery E.C. *et al* eds), páginas 619-623, Kluwer Academic publishers).

Los anticuerpos de la invención secretados al medio pueden recuperarse y purificarse del medio usando una diversidad de técnicas para proporcionar un grado de purificación adecuado para el uso deseado. Por ejemplo, el uso de anticuerpos terapéuticos de la invención para el tratamiento de pacientes humanos típicamente hace que sea necesaria una pureza de al menos 95% como se determina por SDS-PAGE reductora, más típicamente una pureza de 98% o 99%, en comparación con el medio de cultivo que comprende los anticuerpos terapéuticos. En el primer caso, típicamente se retira el desecho celular del medio de cultivo usando centrifugación seguida de una etapa de clarificación del sobrenadante, usando, por ejemplo microfiltración, ultrafiltración y/o filtración en profundidad. Como alternativa, el anticuerpo puede recogerse por microfiltración, ultrafiltración o filtración en profundidad sin centrifugación previa. Se dispone de diversas otras técnicas tales como diálisis, electroforesis en gel y técnicas cromatográficas tales como cromatografía en hidroxiapatita (HA), cromatografía de afinidad (que implica opcionalmente un sistema de señalización de afinidad tal como polihistidina) y/o cromatografía de interacción hidrófoba (HIC, véase el documento US 5.429.746). En una realización, los anticuerpos de la invención, después de diversas etapas de clarificación, se capturan usando cromatografía de afinidad en proteína A o G seguido de etapas cromatográficas adicionales tales como cromatografía de intercambio aniónico y/o HA, intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de exclusión molecular y precipitación con sulfato amónico. Típicamente, también se emplean diversas etapas de retirada de virus (por ejemplo, nanofiltración usando por ejemplo un filtro DV-20). Después de estas diversas etapas, se proporciona una preparación purificada (típicamente monoclonal) que

comprende al menos 10 mg/ml o más, por ejemplo 100 mg/ml o más del anticuerpo de la invención y, por lo tanto, constituye una realización de la invención. Puede generarse una concentración de 100 mg/ml o mayor por ultracentrifugación. Convenientemente, estas preparaciones carecen sustancialmente de formas agregadas de anticuerpos de la invención

Los sistemas bacterianos son particularmente adecuados para la expresión de fragmentos de anticuerpos. Estos fragmentos se localizan intracelularmente o dentro del periplasma. Pueden extraerse proteínas periplásmicas insolubles y replegarse para formar proteínas activas de acuerdo con métodos conocidos por los especialistas en la técnica, véase Sanchez *et al* (1999) J.Biotechnol. 72, 13-20 y Cupit PM *et al* (1999) Lett Appl Microbiol, 29, 273-277.

3. Composiciones farmacéuticas y modo de administración

Las preparaciones purificadas de anticuerpos de la invención como se han descrito anteriormente pueden incorporarse en composiciones farmacéuticas para el uso en el tratamiento de enfermedades y trastornos humanos tales como los indicados anteriormente. Típicamente, estas composiciones comprenden además un vehículo farmacéuticamente aceptable (es decir, inerte) como los conocidos y nombrados en la práctica farmacéutica aceptable, véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª ed, (1980), Mack Publishing Co. Los ejemplos de estos vehículos incluyen vehículos esterilizados tales como solución salina, solución de Ringer o solución de dextrosa, tamponados con tampones adecuados hasta un pH dentro del intervalo de 5 a 8. Las composiciones farmacéuticas para inyección (por ejemplo, por vía intravenosa, intraperitoneal, intradérmica, subcutánea, intramuscular o intraaortal) o para infusión continua convenientemente carecen de materia visible en forma de partículas y pueden comprender de 0,1 mg a 10 g de anticuerpo terapéutico, típicamente entre 5 mg y 25 mg de anticuerpo. Los métodos para la preparación de estas composiciones farmacéuticas son bien conocidos para los especialistas en la técnica. En una realización, las composiciones farmacéuticas comprenden de 0,1 mg a 10 g de anticuerpos terapéuticos de la invención en forma de dosificación unitaria, opcionalmente junto con instrucciones para el uso. Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden liofilizarse (secarse por congelación) para reconstituirse antes de la administración de acuerdo con métodos bien conocidos o evidentes para los especialistas en la técnica. Cuando las realizaciones de la invención comprenden anticuerpos de la invención con un isotipo IgG1, puede añadirse un quelante de cobre tal como citrato (por ejemplo citrato sódico) o EDTA o histidina a la composición farmacéutica para reducir el grado de degradación mediada por cobre de anticuerpos de este isotipo, véase por ejemplo el documento EP 0612251.

Las dosis y los regímenes de tratamiento eficaces para administrar el anticuerpo de la invención generalmente se determinan empíricamente y dependen de factores tales como la edad, el peso y el estado de salud del paciente y la enfermedad o trastorno total. Estos factores están dentro del alcance del médico a cargo del caso. Pueden encontrarse pautas para la selección de las dosis apropiadas, por ejemplo, en. Smith *et al* (1977) Antibodies in human diagnosis and therapy, Raven Press, New York, pero en general estas dosis estarán comprendidas entre 0,1 mg y 1 g. En una realización, el régimen de dosificación para tratar a un paciente humano es de 0,1 mg a 10 g del anticuerpo terapéutico de la invención administrado por vía subcutánea una vez por semana o cada dos semanas, o por infusión intravenosa cada uno o dos meses. Las composiciones de la presente invención también pueden usarse de forma profiláctica.

4. Usos clínicos

La presente invención se refiere un anticuerpo que se une a IL-8 humana, Gro-alfa, Gro-beta, Gro-gamma y ENA-78. Los anticuerpos de la presente invención pueden ser útiles en métodos para tratar enfermedades o trastornos caracterizados por un nivel elevado o desequilibrado de una o más de las siguientes proteínas: IL-8 humana, Gro-alfa, Gro-beta, Gro-gamma y ENA-78, particularmente, COPD, osteoartritis, artritis reumatoide, artritis erosiva, asma, aterosclerosis, enfermedad inflamatoria del intestino, psoriasis, rechazo de trasplantes, gota, cáncer, lesión pulmonar aguda, enfermedad pulmonar aguda, sepsis, ARDS, enfermedad arterial periférica, esclerosis sistémica, síndrome de insuficiencia respiratoria en recién nacidos, exacerbación del asma y COPD, fibrosis quística, panbronquiolitis difusa, lesión de reperfusión y/o endometriosis, con dicho anticuerpo, comprendiendo dichas composiciones farmacéuticas dicho anticuerpo, y también se refiere a métodos de fabricación.

La presente invención también se refiere al uso un anticuerpo en la fabricación de medicamento para el tratamiento de enfermedades o trastornos caracterizados por un nivel elevado o desequilibrado de una o más de las siguientes proteínas: IL-8 humana, Gro-alfa, Gro-beta, Gro-gamma, GCP-2 y ENA-78, particularmente COPD, osteoartritis, artritis reumatoide, artritis erosiva, asma, aterosclerosis, enfermedad inflamatoria del intestino, psoriasis, rechazo de trasplantes, gota cáncer, lesión pulmonar aguda, enfermedad pulmonar aguda, sepsis, ARDS, enfermedad arterial periférica, esclerosis sistémica, síndrome de insuficiencia respiratoria en recién nacidos, exacerbación del asma y COPD, fibrosis quística, panbronquiolitis, lesión de reperfusión o endometriosis. Aunque la presente invención se ha descrito principalmente en relación con el tratamiento de enfermedades o trastornos humanos, la presente invención también puede tener aplicación en el tratamiento de enfermedades o trastornos similares en mamíferos no humanos.

Realizaciones específicas

Ejemplo 1. Generación de anticuerpo monoclonal de ratón 656.35, 197.2 y 81.1

Generación de un mAb penta-específico contra las quimioquinas diana (IL-8 humana, Gro-alfa, Gro-beta, Gro-gamma y ENA-78).

Se usaron múltiples métodos y esquemas para inmunizar ratones con la intención de generar mAb pan-específicos. La generación de mAb pan-específicos se realizó usando diversas mezclas de múltiples péptidos antigénicos (MAP) y/o quimioquinas intactas (IL-8, Gro-α, -β, -γ y ENA-78) mezclados en adyuvante completo o incompleto de Freund (cFA o iFA), siguiendo un protocolo de Sitios Múltiples de Inmunización Repetitiva (RIMMS) modificado en la cepa de ratón SJL/JOrlCrl.

Los MAP o péptidos antigénicos múltiples tuvieron dos funciones dentro del protocolo de inmunización. En primer lugar, los MAP permiten una presentación múltiple selectiva de una secuencia de aminoácidos diana conocida. En segundo lugar, hay un aumento de masa, debido a las múltiples copias de la secuencia asociada, por ejemplo, a través de un núcleo de lisina, lo cual también aumenta la inmunogenicidad de la secuencia con respecto a los péptidos individuales (Francis, J.P., et al., Immunology, 1991: 73; 249, Schott, M.E., et al., Cell. Immuno. 1996: 174: 199-209, Tam, J.P. Proc. Natl. Acad. Sci. 1988: 85; 5409-5413). La figura I es un dibujo esquemático de una serie de MAP que tienen las secuencias de aminoácidos SEQ ID Nº: 49-53. Un enlazador en MPA puede ser cualquier enlazador distinto de lisinas.

Línea de tiempo de inmunización general:

Dos protocolos de inmunización diferentes siguiendo la línea de tiempo anterior produjeron mAb pan-específicos:

1.La inmunización inicial (día 0) consiste en múltiples inyecciones subcutáneas (en los cuartos traseros, lomo y cuello) de todas las quimioquinas mezcladas en cFA (10 μg de cada una). Los cuatro refuerzos siguientes consistían en una mezcla de todas las quimioquinas diana mezcladas en iFA (10 μg de cada una). El quinto y los demás refuerzos posteriores consistían en un cóctel de todas las quimioquinas diana y los 5 MAP lineales (10 μg de cada uno) en iFA. El refuerzo final 3 días antes del sacrificio y la fusión consistía en todas las quimioquinas diana y MAP lineales en PBS y se administró por medio de una inyección intraperitoneal (IP).

2.La inmunización inicial (día 0) consiste en múltiples inyecciones subcutáneas (en los cuartos traseros, lomo y cuello) de los 5 MPA lineales mezclados en cFA (10 μg de cada uno). Los cuatro refuerzos siguientes consistían en una mezcla de los 5 MPA lineales en iFA (10 μg de cada uno). El quinto y los demás refuerzos posteriores consistían en un cóctel de los 5 MPA lineales y todas las quimioquinas diana (10 μg de cada uno) en iFA. El refuerzo final 3 días antes del sacrificio y la fusión consistía en los 5 MPA lineales y todas las quimioquinas diana (10 μg de cada uno) en PBS y se administró por medio de una inyección intraperitoneal (IP).

Ejemplo 2. La pan-unión del mAb a las quimioquinas diana (IL-8 humana, Gro-alfa, Gro-beta, Gro-gamma, GCP-2 y ENA-78) se ha confirmado a través de un ensayo de inmunofluorescencia de resolución en el tiempo (TRFIA).

En resumen, cada antígeno (IL-8 humana, Gro-alfa, Gro-beta, Gro-gamma, GCP-2, y ENA-78 y hIL-18 cuando se usa como control negativo) se aplica individualmente como un recubrimiento sobre una placa inmunofluorescente de 96 pocillos. Las placas después se lavan y se bloquean con una solución de bloqueo disponible en el mercado. La solución de bloqueo se vacía, se añaden muestras que contienen el mAb en cada pocillo y se incuban durante 40 a 60 minutos (esto permite que en mAb se una a las quimioquinas diana). Después se lavan de nuevo las placas y se añade un Ab de detección a cada pocillo. Los reactivos de detección fueron los siguientes para los MAb 2X656.35, quimera (HcLc) y humanizados, respectivamente: IgG anti-ratón biotinilada; reactivo Fab2 anti-IgG humana biotinilado e IgG anti-humana con europio. El anticuerpo de detección se conjuga con europio o biotina. Después de otra vuelta de lavado, para retirar el Ab de detección no unido, se añadió una solución de estreptavidina-europio a los ensayos de detección con biotina. La estreptadivina-europio se une a la biotina permitiendo la detección. Después de un lavado final para retirar la estreptadivina-europio no unida, o en el caso del ensayo de Mab humanizado después de lavar el conjugado de europio secundario, cada pocillo se rellena con una solución de detergente quelante para activar el europio productor de fluorescencia. El aumento de fluorescencia registrado es directamente proporcional a la cantidad de Ab de detección presente en el pocillo que está relacionada directamente y es proporcional a la cantidad de quimioquina que se une al mAb.

La figura 5A muestra la unión del mAb 656.35 de ratón a quimioquinas humanas diana.

La figura 5B muestra la unión del mAb Anticuerpo Quimera (HcLc) a quimioquinas diana humanas.

La figura 5C muestra la unión de mAb humanizados a quimioquinas diana humanas.

Ejemplo 3. La pan-inhibición funcional por mAb murinos se confirmó usando una diversidad de métodos.

Movilización de Ca^{2+} mediada por CXCR2, quimiotaxis de neutrófilos humanos y activación de neutrófilos humanos (expresión de CD11b en la superficie).

Para la caracterización funcional del efecto neutralizador de anticuerpos sobre la movilización de $[Ca^{2+}]i$ inducida por quimioquinas ELR+ en células CHO–K1 transfectadas y que expresaban de manera estable hCXCR2 y Gα16, se usó una placa de microtitulación basada en un ensayo de movilización de calcio, FLIPR (Fluorometric Imaging Plate Reader, Molecular Devices, Sunnyvale CA, [Schroeder, 1996]).

El día previo al ensayo, se cultivaron células en placas de 96 pocillos, de paredes negras y de fondo transparente (Packard View) a una concentración de 40.000 células por pocillo. Desde de 18 y 24 horas, se retiró en medio de las células por aspiración y se reemplazó por 100 μl de medio de carga que contenía Medio Esencial Mínimo de Eagle (EMEM) con sales de Earl y L-glutamina, BSA al 0,1% (Serologicals Corporation), colorante indicador fluorescente Fluo-4-acetoximetil éster (Fluo-4 AM) 4 μM y probenecid 2,5 mM. las células se incubaron en este medio que contenía colorante durante una hora a 37ºC. Después se retiró el medio que contenía colorante de las células y se reemplazó por un medio idéntico sin Fluo-4 AM y con gelatina al 0,1% (sin BSA) y probenecid 2,5 mM. Las células se incubaron durante 10 minutos a 37ºC y después se lavaron tres veces con tampón de ensayo KRH [Krebs Ringer Henseleit (NaCl 120 mM, KCl 4,6 mM, KH_2PO_4 1,03 mM, $NaHCO_3$ 25 mM, $CaCl_2$ 1,0 mM, $MgCl_2$ 1,1 mM, Glucosa 1,1 mM, HEPES 20 mM (pH 7,4)) con gelatina al 0,1% y probenecid 2,5 mM]. Después del lavado de tampón final, se añadieron a las células 100 μl de tampón de ensayo KRH con gelatina al 0,1% y probenecid 2,5 mM y se calentaron a 37ºC durante 10 minutos antes de ponerse en FLIPR, donde las células cargadas con colorante se expusieron a una luz de excitación (488 nm) procedente de un láser de argón de 6 vatios. La movilización de $[Ca^{2+}]i$ se controló como resultado de un aumento en la intensidad de emisión a 516 nm de Fluo-4 cuando se unía a Ca^{2+}. El cambio en la intensidad de emisión está relacionado directamente con los niveles de calcio citosólicos $[Ca^{2+}]i$. Después del control inicial durante 10 seg., se añadieron a la placa celular 50 μl de 3X quimioquina ELR+, que se había pre-incubado con un intervalo de concentraciones de anticuerpo, y se recogieron los datos cada segundo durante un minuto, seguido de medio minuto adicional de registro en intervalos de tres segundos. La máxima respuesta celular por encima de la lectura basal se exportó para la representación en GraphPad Prism (v4.03).

El valor de CI_{50} se definió como la concentración de anticuerpo necesaria, durante el pretratamiento de 3X CE_{80} de quimioquina, para neutralizar el efecto estimulador mediado por CXCR2 de una concentración CE_{80} de la quimioquina ELR+ en 50%. Se controló una respuesta celular secundaria a ATP 25μM para ensayar la viabilidad celular [Sarau, 1999].

	hIL-8 3nM		hGROα 10nM		hGROβ 6nM		hENA-78 30nM		hGCP-2 100nM	
mAB murino	CI_{50} (μg/ml)	C. I. 95%	CI_{50} (μg/ml)	C.I. 95%	CI_{50} (μg/ml)	C. I. 95%	CI_{50} (μg/ml)	C. I. 95%	CI_{50} (μg/ml)	C. I. 95%
656.35	0,18	0,14 - 0,25	1,43	0,60 - 3,42	1,06	0,78 - 1,42	2,09	0,71 - 6,14	9,58	1,17 - 78,57
81.1	67,65	18,80 - 243,50	0,94	0,37 - 2,38	n.d.	N/D	1,84	0,69 - 4,93	9,11	1,44 - 57,61
197.2	2,19	0,61 - 7,88	2,24	0,39 - 12,98	n.d.	N/D	13,86	1,71 - 112,49	>157	N/D

Tabla: Inhibición de flujo de calcio inducido por quimioquina ELR+ humana (los valores de CI_{50} son medias geométricas, μg/ml) por 3 mAb murinos. (n=3 a 6) (n.d. = no determinado, N/D = no disponible) Schroeder KS, Neagle, BD. FLIPR: a new instrument for accurate, high throughput optical screening. *J. Biomol. Screen.* 1996:1-75. Sarau HM, Ames RS, Chambers J, Ellis C, Elshourbagy N, Foley JJ et al. Identification, molecular cloning, expression, and characterization of a cysteinyl leukotrien receptor. *Mol Pharmacol.* 1999;56:657-663.

También se demostró la inhibición de la quimiotaxis de neutrófilos humanos estimulada por IL-8 usando una cámara micro-Boyden. El aparato micro-Boyden consiste en dos cámaras pequeñas una por encima y la otra por debajo de una membrana porosa de 3 micrómetros. La cámara inferior se carga con el agente quimiotáctico (es decir, IL-8) o una mezcla de la quimioquina con el mAb penta-específico. La cámara superior contiene neutrófilos humanos no activados purificados. Una vez que la cámara se ensambla, se forma un gradiente de concentración desde el pocillo inferior al superior, estimulando la quimiotaxis de los neutrófilos a través de la membrana. El ensayo se expresa como CI (índice quimiotáctico), que es una relación entre el número de células que producen quimiotaxis en respuesta a un estimulante con respecto al número de células quimiotácticas no estimuladas. La preincubación de la quimioquina (es decir, la IL-8) con el mAb penta-específico en la cámara inferior, inhibió de una manera dependiente de la dosis la quimiotaxis de neutrófilos estimulada por IL-8. La IL-8 a una concentración 10 nM consiguió un valor de CI 3,6 ± 0,8. La pre-incubación de IL-8 con concentraciones crecientes del mAb penta-específico (656.35) inhibió de una forma dependiente de la dosis la quimiotaxis de neutrófilos humanos, y se alcanzó significado a un valor de CI de 2,2 ± 0,6 a 1 μg/ml. Debido a las cantidades y sensibilidad del ensayo, no pudieron examinarse las otras quimioquinas (Gro-α, -β, -γ y ENA-78).

Inhibición de la activación de neutrófilos humanos purificados por medio del control de la expresión de CD11b en la superficie. CD11b o Mac-1 media la adhesión a sustratos, la agregación y la quimiotaxis y se sabe que se regula positivamente en la superficie de neutrófilos activados (Molad, Y., J., et al., Clin. Immunol. Immunopathol. 1994: 71; 281–286). En resumen, se purifican neutrófilos humanos no activados y se estimulan *ex vivo* con quimioquinas diana (es decir, IL-8) o con quimioquinas pre-incubadas con un mAb penta-específico de quimioquina. Los datos se presentan como porcentaje de activación establecido para la expresión máxima en la superficie de CD11b debido a

la estimulación por IL-8. La pre-incubación de IL-8 con el mAb 656.35 inhibió de una manera dependiente de la dosis el aumento de los niveles de expresión en la superficie de CD11b y, por lo tanto, indica inhibición de la activación de neutrófilos (79,9% ± 3,7, 48,5% ± 7,2, 28,7% ± 3,2 y 31,6% ± 3,4, a 0,01, 0,1, 1, 10 y 50 μg/ml respectivamente).

Ejemplo 4. Valores de asociación/disociación de mAb penta-específicos para cada quimioquina diana (IL-8 humana, Gro-beta y ENA-78).

Métodos para el Análisis Biacore.

Para el experimento denominado KL, se inmoviliza IgG de conejo anti-ratón-Fc (Biacore BR-1005-14) en un chip CM5 por acoplamiento de amina primaria de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Para el experimento denominado BE, se usaron anticuerpos purificados inmovilizados directamente en el chip por acoplamiento con amina.

Se captura sobrenadante o anticuerpos purificados procedentes de mAB de ratón parentales sobre la superficie de IgG anti-ratón-Fc. Se pasan concentraciones definidas de cada analito (IL8, Gro-beta y ENA-78) sobre la superficie del anticuerpo inmovilizado o capturado, y se usa un suceso de captura separado para cada inyección de analito. Después de cada inyección de analito, la superficie se regenera por inyección de una solución ácida débil que retira el anticuerpo capturado pero no afecta significativamente a la capacidad de la superficie de IgG anti-ratón-Fc de realizar otro suceso de captura ni afecta a los anticuerpos inmovilizados directamente. También se realiza una inyección de tampón sobre la superficie con el anticuerpo capturado y esto se usa para una doble referencia. Los datos se analizan usando el software de análisis intrínseco de la máquina, usando el modelo de unión 1:1.

		IL-8			Gro-B			ENA-78		
	mAb	**kd**	**ka**	**KD**	**kd**	**ka**	**KD**	**kd**	**ka**	**KD**
KL	**656.35**	1.48E-03	1.53E+06	9.64E-10	2.01E-03	3.82E+06	5.26E-10	1.87E-03	1.07E+06	1.74E-09
BE		6.87E-04	8.19E+06	8.39E-11	1.46E-03	1.32E+07	1.11E-10	7.96E-04	2.94E+06	2.71E-10
KL	**81.1**	9.32E-03	1.95E+06	4.80E-09	3.12E-04	2.76E+06	1.13E-10	3.76E-04	6.11E+05	6.16E-10
BE		1.08E-01	1.95E+06	5.55E-08	4.89E-04	5.44E+06	8.98E-11	3.94E-06	1.65E+05	2.39E-11
KL	**197.2**	3.69E-03	6.27E+05	5.89E-09	9.93E-04	1.55E+05	6.39E-10	2.69E-03	2.99E+05	9.00E-09
BE		4.99E-04	7.23E+05	6.90E-10	4.80E-08	1.04E+06	4.62E-14	3.02E-03	3.01E+05	1.01E-08

Ejemplo 5

Mapeo de epítopo

Se mapeó el epítopo del mAb 656.35 y se descubrió que se unía dentro de KELRCQCIKTYSKP (SEQ ID Nº: 54) en la IL-8 humana. De esta manera, en otra realización, la presente invención se refiere a un anticuerpo penta-específico que se une dentro del epítopo de la SEQ ID Nº:54 de la IL-8 humana.

Ejemplo 6: Estudio de eficacia de un anticuerpo quimera obtenido a partir de 656.35 que tiene la secuencia de cadena pesada de la SEQ ID Nº: 56 y la secuencia de cadena ligera de la SEQ ID Nº:58. (Este anticuerpo se denominará Anticuerpo Quimera)

- Estudios *in vivo*:

Se usó un modelo inflamatorio de pulmón agudo con LPS inhalado para examinar la capacidad de un anticuerpo penta-específico de inhibir la infiltración de neutrófilos en los pulmones de primates no humanos (NHP – cynomolgus). En resumen, se seleccionaron NHP (primates no-humanos) por criterios de salud y capacidad de respuesta a IL-8 cynomolgus (cynoIL-8) añadida de forma exógena. Los NPH seleccionados después se sometieron a extracciones de muestras basales (sangre y lavado broncoalveolar – BAL) 5 días antes de la primera exposición al LPS. La exposición a LPS consistía en tranquilizar al NHP con una sola inyección de ketamina HCl (~10 mg/kg). Una vez sedado el NHP, se administra anestesia por medio de infusión intravenosa de propofol (~0,2 mg/kg/min, cuando sea necesario). Los animales anestesiados se ponen en una manta calefactora con agua caliente circulante y/o dentro de una manta con aire caliente circulante y se administra un lubricante oftálmico en cada ojo. Los animales después se intuban y se ventilan mecánicamente para el procedimiento de exposición. Durante el procedimiento se usa un ventilador de presión positiva con volumen regulado (Stoelting Cat/Rabbit ventilator www.stoeltingco.com Nº Cat. 5019510). La exposición al lipopolisacárido (LPS) se realiza por inhalación de aerosol usando un nebulizador ultrasónico DeVilbiss Ultraneb-99. Se administra LPS aerosolizado durante 5 minutos a 100 μg/ml. Durante los procedimientos de exposición se controlan el ritmo cardiaco, la temperatura corporal y la velocidad de respiración y se registran. La exposición inicial confirma que el NHP responde al LPS (aumento de la infiltración de neutrófilos en los pulmones y elevación de los niveles de cynoIL-8). Las respuestas de los NHP individuales se confirmaron por extracciones de muestras a las 6 y 24 horas después de la exposición.

Los NHP expuestos a LPS inicial después se dividieron aleatoriamente en dos grupos. Después de una

recuperación de 4 semanas, todos los NHP participantes se sometieron a otra extracción basal (sangre y BAL). Cuatro días después de las mediciones basales, los grupos de sujetos recibieron una inyección IV de un vehículo o una inyección de 1 mg/kg del Anticuerpo Quimera. Al día siguiente, los NHP se expusieron de nuevo a LPS inhalado y se recogieron muestras para análisis 6 y 24 horas después de la exposición. Después de un período de recuperación adicional se recogieron muestras basales del NHP al que se le había administrado vehículo, y 4 días después estos NHP se trataron con una sola inyección IV en embolada del Anticuerpo Quimera a 10 mg/kg. Al día siguiente, los animales se expusieron a LPS y se recogieron muestras para el análisis a las 6 y 24 horas.

La inhalación de LPS es un modelo inflamatorio agudo que estimula una elevación de las quimioquinas quimiotácticas tales como IL-8, que conduce a un aumento de la infiltración de neutrófilos en los pulmones. El parámetro de eficacia primario para el tratamiento con el Anticuerpo Quimera es la inhibición de la infiltración de los neutrófilos en los pulmones de los NHP expuestos a LPS. Se produce infiltración de neutrófilos en este modelo de inflamación aguda durante las primeras 24 horas después de la exposición al LPS, momento en el que se están haciendo más prominentes otros procesos inflamatorios.

El pretratamiento con Anticuerpo Quimera inhibió de forma significativa y dependiente de la dosis la infiltración de neutrófilos en los pulmones de NHP expuestos a LPS. El tratamiento con el anticuerpo quimera también previno la elevación de los neutrófilos circulantes, mientras que no afectó a la función real de los neutrófilos (es decir, la capacidad fagocítica de las células). El tratamiento tampoco afectó en gran medida a otros tipos celulares tales como macrófagos/monocitos en el pulmón o la circulación. Véase la Figura 2.

Ejemplo 7

Otros estudios de mAb humanizados

Se han producido múltiples construcciones de anticuerpos penta-específicos humanizados de las que cuatro han demostrado unirse fuertemente e inhibir todas las quimioquinas diana. (Para cada secuencia, véase la información de secuencia proporcionada más adelante). Este análisis consistía en mediciones de afinidad (BiaCore), ensayos de movilización de calcio (ensayo funcional *in vitro*, FLIPR), y ensayo de estimulación de neutrófilos en NHP y en humano CD11b (ensayo funcional *ex vivo*, citrometría de flujo)

- BiaCore

Para generar la cinética para las construcciones humanizada y quimérica que se indica a continuación, se usó un método de captura de Proteína A:

Se inmoviliza proteína A en un chip CM5 por acoplamiento de amina primaria de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se captura anticuerpo humanizado o quimérico purificado en la superficie de proteína A. Después de la captura, se pasan concentraciones definidas de cada analito (IL8, Gro-β y ENA-78) sobre la superficie con el anticuerpo capturado; se usa un suceso de captura separado por cada inyección de analito. Después de cada inyección de analito, se regenera la superficie por inyección de una solución ácida débil, que elimina el anticuerpo capturado pero no afecta significativamente a la capacidad de la proteína A de realizar otro suceso de captura. También se inyecta una inyección de tampón sobre la superficie de anticuerpo capturado y esto se usa para la doble referencia. Los datos se analizan usando el software de análisis intrínseco en la máquina, usando el modelo de unión 1:1.

Mediciones con Gro-beta

Construcción	ka (1/Ms)	kd(1/s)	KD(M)
HcLc	7.39E+06	8.16E-04	1.11E-10
HcLc	2.11E+07	0.0011	5.21E-11
HcLc	1.59E+07	8.88E-04	5.57E-11
HcLc	1.19E+07	6.16E-04	5.17E-11
HcLc	1.43E+07	5.43E-04	3.79E-11
HcLc	1.33E+07	6.76E-04	5.09E-11
HcLc	1.51E+07	6.73E-04	4.45E-11
HcLc	1.49E+07	6.44E-04	4.33E-11
HcLc	2.54E+07	0.001163	4.57E-11
HcLc	1.81E+07	0.001058	5.85E-11
HcLc	2.04E+07	8.54E-04	4.18E-11

HcLc	1.82E+07	5.06E-04	2.78E-11
H0L7	6.99E+06	9.66E-04	1.38E-10
H0L7	1.76E+07	0.001305	7.40E-11
H0L7	1.63E+07	0.001039	6.39E-11
H0L7	1.14E+07	0.005616	4.93E-10
H0L7	1.20E+07	0.004398	3.66E-10
H0L7	1.42E+07	9.57E-04	6.73E-11
H0L7	1.76E+07	0.00118	6.72E-11
H0L7	1.63E+07	0.001389	8.52E-11
H0L7	1.12E+07	0.008212	7.32E-10
H0L7	2.63E+07	0.001546	5.88E-11
H0L7	2.10E+07	9.28E-04	4.41E-11
H0L8	1.28E+07	0.005462	4.27E-10
H0L8	1.99E+07	0.01065	5.36E-10
H0L8	1.19E+07	0.007727	6.52E-10
H0L8	1.18E+07	0.007799	6.60E-10
H0L8	1.61E+07	0.006903	4.29E-10
H0L8	1.85E+07	0.004586	2.48E-10
H0L10	1.23E+07	0.001395	1.13E-10
H0L10	1.45E+07	0.001261	8.68E-11
H0L10	1.44E+07	0.001477	1.03E-10
H0L10	1.28E+07	0.001394	1.09E-10
H0L10	1.98E+07	0.00144	7.28E-11
H0L10	1.94E+07	0.00109	5.62E-11
H0M0	1.20E+07	0.001394	1.17E-10
H0M0	1.13E+07	0.007071	6.24E-10
H0M0	1.58E+07	0.001708	1.08E-10
H0M0	1.43E+07	0.001829	1.28E-10
H0M0	1.03E+07	0.009588	9.34E-10
H0M0	1.85E+07	0.001728	9.35E-11
H0M0	1.81E+07	0.001252	6.91E-11

Mediciones con IL8

Construcción	ka (1/Ms)	kd(1/s)	KD(M)
HcLc	3.77E+06	2.34E-04	6.22E-11
HcLc	1.03E+07	2.87E-04	2.78E-11
HcLc	8.20E+06	2.76E-04	3.37E-11
HcLc	1.04E+07	2.68E-04	2.58E-11
HcLc	9.44E+06	2.53E-04	2.68E-11
HcLc	9.97E+06	2.30E-04	2.31E-11
H0L7	2.74E+06	2.84E-04	1.04E-10
H0L7	8.99E+06	4.00E-04	4.45E-11
H0L7	7.64E+06	2.84E-04	3.71E-11
H0L7	5.98E+06	0.001167	1.95E-10
H0L7	8.74E+06	3.52E-04	4.03E-11
H0L7	7.51E+06	3.63E-04	4.83E-11
H0L7	9.10E+06	3.89E-04	4.28E-11
H0L8	5.90E+06	0.00111	1.88E-10
H0L8	7.89E+06	0.001126	1.43E-10
H0L8	6.80E+06	0.001193	1.75E-10
H0L8	7.30E+06	0.001112	1.52E-10
H0L10	6.86E+06	4.57E-04	6.66E-11
H0L10	7.20E+06	3.67E-04	5.10E-11
H0L10	7.21E+06	3.96E-04	5.48E-11
H0L10	7.43E+06	3.73E-04	5.02E-11
H0M0	7.02E+06	3.98E-04	5.67E-11
H0M0	6.40E+06	0.001467	2.29E-10
H0M0	7.96E+06	4.09E-04	5.14E-11
H0M0	7.97E+06	4.60E-04	5.77E-11
H0M0	7.50E+06	4.18E-04	5.57E-11

Mediciones con ENA78

Construcción	ka (1/Ms)	kd(1/s)	KD(M)
HcLc	3.67E+06	1.70E-04	4.63E-11
HcLc	5.81E+06	1.71E-04	2.94E-11
HcLc	5.11E+06	1.84E-04	3.60E-11
HcLc	5.28E+06	1.54E-04	2.91E-11
HcLc	4.87E+06	1.56E-04	3.20E-11
HcLc	4.78E+06	1.23E-04	2.58E-11
H0L7	2.95E+06	2.04E-04	6.93E-11
H0L7	5.28E+06	2.97E-04	5.63E-11
H0L7	4.59E+06	2.17E-04	4.74E-11
H0L7	3.03E+06	3.33E-04	1.10E-10
H0L7	5.11E+06	2.58E-04	5.04E-11
H0L7	4.76E+06	3.07E-04	6.45E-11
H0L7	4.91E+06	2.77E-04	5.63E-11
H0L8	2.88E+06	2.88E-04	1.00E-10
H0L8	2.82E+06	2.66E-04	9.41E-11
H0L8	2.95E+06	2.69E-04	9.12E-11
H0L8	3.29E+06	2.48E-04	7.55E-11
H0L10	4.07E+06	3.66E-04	8.99E-11
H0L10	4.72E+06	3.40E-04	7.22E-11
H0L10	4.20E+06	3.12E-04	7.42E-11
H0L10	4.38E+06	2.68E-04	6.13E-11
H0M0	3.91E+06	3.09E-04	7.89E-11
H0M0	2.97E+06	3.49E-04	1.17E-10
H0M0	4.39E+06	3.16E-04	7.20E-11
H0M0	4.18E+06	3.34E-04	7.99E-11
H0M0	4.52E+06	2.94E-04	6.51E-11

La afinidad (KD) se determina examinando la velocidad de asociación (ka) y la constante de disociación (kd) de proteínas.

HcLc se refiere al anticuerpo quimera obtenido a partir de 656.35 que tiene la secuencia de cadena pesada de la SEQ ID Nº: 56; y la secuencia de cadena ligera de la SEQ ID Nº: 58.

- Ensayo funcional: movilización de Calcio (FLIPR) usando CHO-K1 CXCR2 (con G α16)

Para la caracterización funcional del efecto neutralizador de anticuerpos sobre la inmovilización de $[Ca^{2+}]i$ inducida por quimioquinas ELR+ en células CHO-K1 transfectadas con y que expresan de forma estable hCXCR2 y Gα16 se usaron ensayos de movilización de calcio basados en una placa de microtilulación, FLIPR (Fluorometric Imaging Plate Reader, Molecular Devices, Sunnyvale CA, [Schroeder,1996]).

El día previo al ensayo, se cultivaron células en placas de 96 pocillos de fondo transparente y de paredes negras (Packard View) a una concentración de 40.000 células por pocillo. Después de 18 a 24 horas, se retiró el medio de las células por aspiración y se reemplazó por 100 μl de medio de carga que contenía Medio Esencial Mínimo de Eagle (EMEM) con sales de Earl y L-Glutamina, BSA al 0,1% (Serologicals Corporation), colorante indicador fluorescente Fluo-4-acetoximetil éster (Fluo-4 AM) 4 μM y probenecid 2,5 mM. Las células se incubaron en este medio que contenía colorante durante una 1 hora a 37°C. El medio que contenía colorante después se retiró de las células por aspiración y se reemplazó por un medio idéntico sin Fluo-4 AM y con Gelatina al 0,1% (sin BSA) y probenecid 2,5 mM. Las células se incubaron durante 10 min a 37°C y después se lavaron 3 veces con tampón de ensayo KRH [Krebs Ringer Henseleit (NaCl 120 mM, KCl 4,6 mM, KH_2PO 1,03 mN, $NaHCO_3$ 25 mM, $CaCl_2$ 1,0 mM, $MgCl_2$ 1,1 mM, Glucosa 11 mM, HEPES 20 mM (pH 7,4)) con gelatina al 0,1% y probenecid 2,5 mM]. Después del lavado de tampón final, se añadieron 100 μl de tampón de ensayo KRH con gelatina al 0,1% y probenecid 2,5 mM a las células y se calentaron a 37°C durante 10 minutos antes de ponerse en FLIPR donde las células cargadas con colorante se expusieron a luz de excitación (488 nm) a partir de un láser de argón de 6 vatios. La movilización de $[Ca^{2+}]i$ se controló como resultado de un aumento en la intensidad de emisión a 516 nm de Fluo-4 cuando se unió a Ca^{2+}. El cambio en la intensidad de emisión está relacionado directamente con los niveles de calcio citosólicos $[Ca^{2+}]i$. Después del control basal durante 10 segundos, se añadieron 50 □l de 3X quimioquina ELR+, que se había preincubado con un intervalo de concentraciones de anticuerpo, a la placa de células y los datos se recogieron cada segundo durante 1 minuto, seguido de medio minuto adicional de registro en intervalos de 3 segundos. La respuesta celular máxima por encima de la lectura basal se exportó para la representación en GraphPad Prism (v4.03).

El valor de CI_{50} se definió como la concentración de anticuerpo necesaria durante el pretratamiento de 3X CE_{80} de quimioquina para neutralizar el efecto estimulador mediado por CXCR2 de una concentración CE_{80} de la quimioquina ELR+ en 50%. Se controló una respuesta celular secundaria a ATP 25 μM para ensayar la viabilidad celular [Sarau, 1999].

	H0L7		H0L8		H0L10		H0M0	
3X CE_{80} quimioquina ELR+ pretratada	**CI_{50} (μg/ml)**	**C.I. 95%**	**CI_{50} (μg/ml)**	**C.I. 95%**	**CI_{50} (μg/ml)**	**C.I. 95%**	**CI_{50} (μg/ml)**	**C.I. 95%.**
hIL8 3 nM	**0,30**	0,12 - 0,72	**0,83**	0,70 - 0,98	**0,19**	0,15 - 0,22	**0,19**	0,15 - 0,23
hGROa 10 nM	**1,48**	0,98 - 2,23	**3,52**	2,74 - 4,53	**1,09**	0,58 - 2,06	**1,11**	0,67 - 1,83
hGROb 6 nM	**1,04**	0,19 - 5,58	**7,93**	4,20 - 14,97	**0,66**	0,24 - 1,86	**0,99**	0,35 - 2,76
hENA-78 30 nM	**2,48**	0,78 - 7,91	**2,42**	1,27 - 4,63	**1,88**	0,83 - 4,26	**1,75**	1,33 - 2,29
hGCP-2 100 nM	**11,43**	8,19 - 15,96	**40,38**	38,45 - 42,41	**11,54**	6,30 - 21,17	**13,03**	7,20 - 23,56

Tabla: Inhibición del flujo de calcio inducido por quimioquina ELR+ humana (los valores de CI_{50} son medias geométricas μg/ml) por cuatro construcciones de mAb humanizadas. (n=3)

Schroeder KS, Neagle, BD. FLIPR: a new instrument for accurate, high throughput optical screening. *J. Biomol. Screen.* 1996:1-75.

Sarau HM, Ames RS, Chambers J, Ellis C, Elshourbagy N, Foley JJ et al. Identification, molecular cloning, expression, and characterization of a cysteinyl leukotrien receptor. *Mol Pharmacol.* 1999;56:657-663.

- Ensayo de estimulación de neutrófilos humanos CD11b *ex vivo*

Se usó citrometría de flujo para examinar la capacidad de anticuerpos penta-específicos humanizados de prevenir la activación de neutrófilos purificados humanos inducidos por quimioquina, por medio de los siguientes cambios celulares físicos (tamaño y forma - granulación) y examinando marcadores de activación de superficie (aumento de la expresión de CD11b en la superficie). Para confirmar la capacidad de los neutrófilos humanos purificados de activarse se usó el estimulante de control de neutrófilos fMLP. Véase la Figura 4.

Información de Secuencia

Se extrajo ARN total a partir de células de hibridoma 656.35, 197.2 y 81.1, y después se generó una secuencia de ADNc de dominio variable de cadena pesada y ligera por transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). El cebador directo para RT-PCR era una mezcla de cebadores degenerados específicos para secuencias líder de gen de inmunoglobulina murina y el cebador inverso era específico para las regiones constantes de anticuerpo, en este caso el isotipo IgG2a/κ. Los cebadores se diseñaron de acuerdo con la estrategia descrita por Jones y Bendig (Bio/Technology 9:88, 1991). La RT-PCR se realizó por duplicado para las dos secuencias de región V para permitir la verificación posterior de las secuencias de región V correctas. Los productos de región V generados por la RT-PCR se clonaron (Invitrogen TA Cloning Kit) y se obtuvieron los datos de la secuencia. Este proceso no fue satisfactorio para el dominio variable ligero de 81.1. De esta manera, la secuencia de aminoácidos mostrada a continuación (SEQ ID Nº: 12) se generó por secuenciación de proteína de la cadena ligera aislada en un gel de SDS-poliacrilamida procesado en condiciones reductoras.

Las regiones determinantes de complementariedad (CDR) están subrayadas.

Secuencias polinucleotídicas para regiones variables de cadena pesada y ligera (SEQ ID Nº: 1 y 3; respectivamente) para 656.35

SEQ ID Nº: 1

CAGGTCCAGTTGCAGCAGTCTGGAGCTGAACTGGTAAGGCCTGGGACTTC
AGTGACGATATCCTGTAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACTAACTACTGGAT
AGTTTGGGTCAAACAGAGGCCTGGACATGGACTTGAGTGGATTGGAGATC
TTTACTCTGGAGGTGGTTATACTTTCTACAGTGAAAATTTCAAGGGGAAG
GCCACACTGACTGCAGACACATCCTCCAGCACTGCCTACATGCACCTCAT
TAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCTGTCTATTTCTGTGCAAGATCGGGTTA
CGACAGAACCTGGTTTGCTCACTGGGGCCAAGGGTCTCTGGTCACTGTCT
CTGCA

SEQ ID Nº: 3

GACATCAAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCATGTCTGCATCGCTGGGAGA
GAGAGTCACTATCACTTGTCAGGCGAGTCAGGACATTGAAAGCTATTTAA
GCTGGTATCAGCAGAAACCATGGAAATCTCCTAAGACCCTGATCTATTAC
GCTACAAGGTTGGCAGATGGGGTCCCATCAAGATTCAGTGGCAGTGGATC
TGGTCAAGATTATTCTCTAACCATCAGCAGCCTGGAGTCTGACGATACAG
CAACTTATTACTGTCTACAACATGGTGAGAGCCCTCCCACGTTCGGTGCTG
GGACCAAGCTGGAGCTGAAACGG

Secuencias polipeptídicas para regiones variables pesada y ligera (SEQ ID Nº: 2 y 4, respectivamente) para 656.35

SEQ ID Nº: 2

QVQLQQSGAELVRPGTSVTISCKASGYTFTNYWIVWVKQRPGHGLEWIGDL
YSGGGYTFYSENFKGKATLTADTSSSTAYMHLISLTSEDSAVYFCARSGYDR
TWFAHWGQGSLVTVSA

SEQ ID Nº: 4

DIKMTQSPSSMSASLGERVTITCQASQDIESYLSWYQQKPWKSPKTLIYYATR
LADGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSLESDDTATYYCLQHGESPPTFGAGTKLEL
KR

Secuencias polipeptídicas para CDR de cadena pesada (SEQ ID Nº: 13, 14, 15, respectivamente) para 656.35

SEQ ID Nº: 13

NYWIV

SEQ ID Nº: 14

DLYSGGGYTFYSENFKG

SEQ ID Nº: 15

SGYDRTWFAH

Secuencias polipeptídicas para CDR de cadena ligera (SEQ ID Nº: 16, 17, 18) para 656.35

SEQ ID Nº: 16

QASQDIESYLS

SEQ ID Nº: 17

YATRLAD

SEQ ID Nº: 18

LQHGESPPT

Secuencias polinucleotídicas para CDR de cadena pesada (SEQ ID Nº: 31, 32, 33) para 656.35

SEQ ID Nº: 31

AACTACTGGATAGTT

SEQ ID Nº: 32

GATCTTTACTCTGGAGGTGGTTATACTTTCTACAGTGAAAATTTCAAGGGG

SEQ ID Nº: 33

TCGGGTTACGACAGAACCTGGTTTGCTCAC

Secuencias polinucleotídicas para CDR de cadena ligera (SEQ ID Nº: 34, 35, 36) para 656.35

SEQ ID Nº: 34

CAGGCGAGTCAGGACATTGAAAGCTATTTAAGC

SEQ ID Nº: 35

TACGCTACAAGGTTGGCAGAT

SEQ ID Nº: 36

CTACAACATGGTGAGAGCCCTCCCACG

Secuencias polinucleotídicas para regiones variables pesada y ligera (SEQ ID Nº: 5 y 7, respectivamente) para 197.2

SEQ ID Nº: 5

GAGTTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGCGCTTC
AGTGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTCACTGACTACAACAT
GAACTGGGTGAAGCAGAGCAATGGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGAGTA
ATTAATCCTAAGTATGGTACTACTAGTTACAATCAGAAGTTCAAGGGCAA
GGCCACGTTGACTGTAGACCAATCCTCCAACACAGCCTACATGCAGCTCA
GCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATCACTGTGCAAGAGGAATG
GGACTCCTCTTTGGTATGGACTACTGGGGCCAAGGAACCTCTGTCACCGT
CTCCTCA

SEQ ID Nº: 7

GACATTGTGATGACACAGTCTCCATCCTCCCTGAGTGTGTCAGCAGGAGA
GAAGGTCACTATGAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGTCTGTTAAACAGTGGAA
ATCARAAGAACTACTTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCT
AAACTGTTGATCTACGGGGCATCCACTAGGAAATCTGGGGTCCCTGATCG
CTTCACAGGCAGTGGATCTGGAACCGATTTCACTCTTACCATCAGCAGTGT
GCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTCAGAATGATCATAGTTTTCC
GTGCACGTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAACGG

Secuencias polipeptídicas para regiones variables pesada y ligera (SEQ ID Nº: 6 y 8, respectivamente) para 197.2

SEQ ID Nº: 6

EFQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFTDYNMNWVKQSNGKSLEWIGVIN
PKYGTTSYNQKFKGKATLTVDQSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYHCARGMGLL
FGMDYWGQGTSVTVSS

SEQ ID Nº: 8

DIVMTQSPSSLSVSAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLAWYQQKPGQPPKL
LIYGASTRKSGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDHSFPCTFG
GGTKLEIKR

Secuencias polipeptídicas para CDR de cadena pesada (SEQ ID Nº: 19, 20, 21, respectivamente) para 197.2

SEQ ID Nº: 19

DYNMN

SEQ ID Nº: 20

VINPKYGTTSYNQKFKG

SEQ ID Nº: 21

GMGLLFGMDY

Secuencias polipeptídicas para CDR de cadena ligera (SEQ ID Nº: 22, 23, 24) para 197.2

SEQ ID Nº: 22

KSSQSLLNSGNQKNYLA

SEQ ID Nº: 23

GASTRKS

SEQ ID Nº: 24

QNDHSFPCT

Secuencias polinucleotídicas para CDR de cadena pesada (SEQ ID Nº: 37, 38, 39) para 197.2

SEQ ID Nº: 37

GACTACAACATGAAC

SEQ ID Nº: 38

GTAATTAATCCTAAGTATGGTACTACTAGTTACAATCAGAAGTTCAAGGG C

SEQ ID Nº: 39

GGAATGGGACTCCTCTTTGGTATGGACTAC

Secuencias polinucleotídicas para CDR de cadena ligera (SEQ ID Nº: 40, 41, 42) para 197.2

SEQ ID Nº: 40

AAGTCCAGTCAGAGTCTGTTAAACAGTGGAAATCAAAAGAACTACTTGGC C

SEQ ID Nº: 41

GGGGCATCCACTAGGAAATCT

SEQ ID Nº: 42

CAGAATGATCATAGTTTTCCGTGCACG

Secuencia polinucleotídica para región variable pesada (SEQ ID Nº: 9) para 81.1

SEQ ID Nº: 9

GAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAACTGGAGAAGCCTGGCGCTTC
AGTGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCTTTCACTGTCTACGGCAT
GAACTGGGTGAGACAGAGCAATGGAAAGAGCCTTGAATGGATTGGAAAT
TTTGATCCTTACTTTAGTGTCACTTCCTACAACCAGAAGTTCCAGGACAAG
GCCACATTGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAA
GAACCTCACATCTGAAGACTCTGCAGTCTATTTCTGTGCAAGAGGGAGCT
GGGAAACCATTTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTG
CA

Secuencia polipeptídica para región variable pesada (SEQ ID Nº: 10) para 81.1

SEQ ID Nº: 10

EVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTVYGMNWVRQSNGKSLEWIGNF
DPYFSVTSYNQKFQDKATLTVDKSSSTAYMQLKNLTSEDSAVYFCARGSWE
TIFAYWGQGTLVTVSA

Secuencias polipeptídicas para CDR de cadena pesada (SEQ ID Nº: 25, 26, 27, respectivamente) para 81.1

SEQ ID Nº: 25

VYGMN

SEQ ID Nº: 26

NFDPYFSVTSYNQKFQD

SEQ ID Nº: 27

GSWETIFAY

Secuencias polinucleotídicas para CDR de cadena pesada (SEQ ID Nº: 43, 44, 45) para 81.1

SEQ ID Nº: 43

GTCTACGGCATGAAC

SEQ ID Nº: 44

AATTTTGATCCTTACTTTAGTGTCACTTCCTACAACCAGAAGTTCCAGGAC

SEQ ID Nº: 45

GGGAGCTGGGAAACCATTTTTGCTTAC

Secuencia polipeptídica para región variable ligera (SEQ ID Nº: 12) para 81.1

QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNN RAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNHVFGGGTKLTVLQP K

Secuencias polipeptídicas para CDR de cadena ligera (SEQ ID Nº: 28, 29 y 30, respectivamente) para 81.1

SEQ ID Nº: 28

RSSTGAVTTSNYAN

SEQ ID Nº: 29

GTNNRAP

SEQ ID Nº: 30

ALWYSNHV

Una secuencia polinucleotídica de quimera* (región variable pesada + IgG1 de codón optimizado) SEQ ID Nº: 55

CAGGTCCAGTTGCAGCAGTCTGGAGCTGAACTGGTAAGGCCTGGGACTTC
AGTGACGATATCCTGTAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACTAACTACTGGAT
AGTTTGGGTCAAACAGAGGCCTGGACATGGACTTGAGTGGATTGGAGATC
TTTACTCTGGAGGTGGTTATACTTTCTACAGTGAAAATTTCAAGGGGAAG
GCCACACTGACTGCAGACACATCCTCCAGCACTGCCTACATGCACCTCAT
TAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCTGTCTATTTCTGTGCAAGATCGGGTTA
CGACAGAACCTGGTTTGCTCACTGGGGCCAAGGGTCACTAGTGACCGTGT
CCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGC
AAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACT
ACTTCCCCGAACCGGTGACCGTGTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCAGC
GGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCT
GAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTAC
ATCTGTAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGG
TGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGACCCACACCTGCCCCCCCTGCCCTGCC
CCCGAGCTGCTGGGAGGCCCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCCAAGCCTAA
GGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGG
ATGTGAGCCACGAGGACCCTGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC
GTGGAGGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACA
GCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTG
AACGGCAAGGAGTACAAGTGTAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCC
TATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCCCAG
GTGTACACCCTGCCCCCTAGCAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTC
CCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGT
GGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCTGT
GCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACA
AGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCTCCGTGATGCACGA
GGCCCTGCACAATCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCTGGCA
AG

secuencia polipeptídica de quimera* (región variable pesada + IgG1 de codón optimizado) SEQ ID Nº: 56

QVQLQQSGAELVRPGTSVTISCKASGYTFTNYWIVWVKQRPGHGLEWIGDL
YSGGGYTFYSENFKGKATLTADTSSSTAYMHLISLTSEDSAVYFCARSGYDR
TWFAHWGQGSLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP
VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP
SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Una secuencia polinucleotídica de quimera* (región variable ligera + cK humana de codón optimizado) SEQ ID Nº: 57

GACATCAAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCATGTCTGCATCGCTGGGAGA
GAGAGTCACTATCACTTGTCAGGCGAGTCAGGACATTGAAAGCTATTTAA
GCTGGTATCAGCAGAAACCATGGAAATCTCCTAAGACCCTGATCTATTAC
GCTACAAGGTTGGCAGATGGGGTCCCATCAAGATTCAGTGGCAGTGGATC
TGGTCAAGATTATTCTCTAACCATCAGCAGCCTGGAGTCTGACGATACAG
CAACTTATTACTGTCTACAACATGGTGAGAGCCCTCCCACGTTCGGTGCTG
GGACCAAGCTGGAGCTGAAACGTACGGTGGCCGCCCCCAGCGTGTTCATC
TTCCCCCCCAGCGATGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTG
TCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGG
ACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGA
CAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAGG
CCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGG
CCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGC

Secuencia polipeptídica de quimera* (región variable ligera + cK humana de codón optimizado)

SEQ ID Nº: 58

DIKMTQSPSSMSASLGERVTITCQASQDIESYLSWYQQKPWKSPKTLIYYATR
LADGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSLESDDTATYYCLQHGESPPTFGAGTKLEL
KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
SQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR
GEC

Quimera* se refiere al anticuerpo quimérico obtenido a partir del anticuerpo 656.35 murino

Secuencia de ADN de cadena pesada madura H0 SEQ ID Nº: 11

CAGGTGCAGCTCGTGCAGAGCGGCGCCGAAGTGAAGAAGCCCGGGGCCAGCG
TGAAGGTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCAACTACTGGATCGTG
TGGGTCAGGCAGGCCCCCGGCCAGGGACTGGAGTGGATGGGCGACCTGTATA
GCGGCGGCGGCTACACCTTCTACAGCGAGAACTTCAAGGGCAGGGTGACCAT
GACCAGGGACACCAGCACCAGCACCGTGTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGG
AGCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGAGCGGCTACGACAGGACTT
GGTTTGCTCACTGGGGCCAGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGCGCCAGCACC
AAGGGCCCCAGCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCG
GCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACC
GTGTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGT
GCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCAGC
AGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTGAACCACAAGCCCAGCA
ACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGACCCACAC
CTGCCCCCCCTGCCCTGCCCCCGAGCTGCTGGGAGGCCCCAGCGTGTTCCTGTT
CCCCCCCAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCT
GTGTGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCTGAGGTGAAGTTCAACTGGTA
CGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAG
TACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTG
GCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGTAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCC
CCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCCCAGG
TGTACACCCTGCCCCCTAGCAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTG
ACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA
GCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCTGTGCTGGACAG
CGATGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGC
AGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCAC
TACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCTGGCAAG

Secuencia de proteína de cadena pesada madura H0 SEQ ID Nº: 46

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWIVWVRQAPGQGLEWMGDLY
SGGGYTFYSENFKGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARSGYDRTWF
AHWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV
EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN
HYTQKSLSLSPGK

Secuencia de ADN de cadena ligera madura L7 SEQ ID Nº: 47

GATATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCTCCCTCAGCGCATCAGTCGGCGACAG
AGTGACAATCACCTGCCAGGCATCCCAGGACATCGAGTCTTACCTGAGCTGGT
ACCAGCAGAAGCCCGGAAAGGCCCCAAAGCTCCTGATCTACTACGCCACTCG
GCTGGCAgacGGCGTGCCTAGCAGGTTCTCCGGCTCAGGGTCTGGGACAGACTT
CACCCTGACCATCAGCTCACTGCAGCCCGAGGATTTCGCCACCTACTACTGTC
TGCAGCACGGAGAGAGCCCCCCAACCTTTGGCCAGGGAACCAAGCTGGAGAT
CaagCGTACGGTGGCCGCCCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCCAGCGATGAGCA
GCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGTCTGCTGAACAACTTCTACCCCC
GGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAG
CCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGC
AGCACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCT
GTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCG
GGGCGAGTGC

Secuencia de proteína de cadena ligera madura L7 SEQ ID Nº: 48

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDIESYLSWYQQKPGKAPKLLIYYATRLAD
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQHGESPPTFGQGTKLEIKRTVAAP
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Secuencia de ADN de cadena ligera madura L8 SEQ ID Nº: 59

GATATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCTCCCTCAGCGCATCAGTCGGCGACAG
AGTGACAATCACCTGCCAGGCATCCCAGGACATCGAGTCTTACCTGAGCTGGT
ACCAGCAGAAGCCCGGAAAGGCCCCAAAGCTCCTGATCTACTACGCCACTCG
GCTGGCAgacGGCGTGCCTAGCAGGTTCTCCGGCTCAGGGTCTGGGACAGACTT
CACCttcACCATCAGCTCACTGCAGCCCGAGGATatcGCCACCTACTACTGTCTGC
AGCACGGAGAGAGCCCCCCAACCTTTGGCCAGGGAACCAAGCTGGAGATCaag
CGTACGGTGGCCGCCCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCCAGCGATGAGCAGCT
GAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGTCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGGG
AGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCA
GGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGC
ACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGTG
AGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGG
CGAGTGC

Secuencia de proteína de cadena ligera madura L8 SEQ ID Nº: 60

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDIESYLSWYQQKPGKAPKLLIYYATRLAD
GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCLQHGESPPTFGQGTKLEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Secuencia de ADN de cadena ligera madura L10 SEQ ID Nº: 61

GATATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCTCCCTCAGCGCATCAGTCGGCGACAG
AGTGACAATCACCTGCCAGGCATCCCAGGACATCGAGTCTTACCTGAGCTGGT
ACCAGCAGAAGCCCGGAAAGGCCCCAAAGCTCCTGATCTACTACGCCACTCG
GCTGGCAgacGGCGTGCCTAGCAGGTTCTCCGGCTCAGGGTCTGGGcagGACtacA
CCCTGACCATCAGCTCACTGCAGCCCGAGGATTTCGCCACCTACTACTGTCTG
CAGCACGGAGAGAGCCCCCCAACCTTTGGCCAGGGAACCAAGCTGGAGATCA
AGCGTACGGTGGCCGCCCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCCAGCGATGAGCAG
CTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGTCTGCTGAACAACTTCTACCCCCG
GGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGC
CAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCA
GCACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTG
TGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGG
GGCGAGTGC

Secuencia de proteína de cadena ligera madura L10 SEQ ID Nº: 62

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDIESYLSWYQQKPGKAPKLLIYYATRLAD
GVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDFATYYCLQHGESPPTFGQGTKLEIKRTVAAP
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Secuencia de ADN de cadena ligera madura M0 SEQ ID Nº: 63

GAGATCGTGCTGACCCAGTCTCCCGCCACCCTGTCACTGTCTCCCGGCGAAAG
GGCAACCCTGAGCTGCCAGGCCAGCCAGGACATCGAGAGCTACCTGAGCTGG
TACCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCCCCAGGCTGCTGATCTACTACGCCACCAG
GCTGGCCGACGGCATTCCCGCCAGGTTCAGCGGAAGCGGCAGCGGCACCGAC
TTCACTCTGACCATCAGCAGCCTGGAGCCCGAGGACTTCGCCGTGTACTACTG
CCTGCAGCACGGCGAGAGCCCTCCCACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTCGAG
ATCAAGCGTACGGTGGCCGCCCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCCAGCGATGA
GCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGT
GTCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGA
CAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGC
AAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACT
ACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAG
CCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGC

Secuencia de proteína de cadena ligera madura M0 SEQ ID Nº: 64

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCQASQDIESYLSWYQQKPGQAPRLLIYYATRLAD
GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCLQHGESPPTFGQGTKLEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCQASQDIESYLSWYQQKPGQAPRLLIYYATRLAD
GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCLQHGESPPTFGQGTKLEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Listado de secuencias

<110> CLEGG, Stephanie J.
DOBRZYNSKI, Er i c
ELLIS, Jonathan H.
GERMASCHEWSKI, Vol ker
GODI LLOT, A. Paul
JONAK, Zdenka L.
LEW S, Al an P.
WHITE, John R.

<120> **NUEVOS COMPUESTOS**

<130> PU62421

<150> 60/ 912, 229 <151> 2007-04-17

<150> 61/ 044, 132 <151> 2008-04-11

<160> 64

<170> Fast SEQ for Windows Version 4. 0

<210> 1
<211> 357
<212> DNA
<213> Murino

<400> 1

caggt ccagt t gcagcagt c t ggagct gaa ct ggt aaggc ct gggact t c agt gacgat a 60
t cct gt aagg ct t ct ggct a cacct t cact aact act gga t agt t t gggt caaacagagg 120
cct ggacat g gact t gagt g gat t ggagat ct t t act ct g gaggt ggt t a t act t t ct ac 180
agt gaaaat t t caaggggaa ggccacact g act gcagaca cat cct ccag cact gcct ac 240
at gcacct ca t t agcct gac at ct gaggac t ct gct gt ct at t t ct gt gc aagat cgggt 300
t acgacagaa cct ggt t t gc t cact ggggc caagggt ct c t ggt cact gt ct ct gca 357

<210> 2
<211> 119
<212> PRT
<213> Murino

<400> 2

Gl n Val Gl n Leu Gl n Gl n Ser Gl y Al a Gl u Leu Val Arg Pro Gl y Thr
1 5 10 15
Ser Val Thr Il e Ser Cys Lys Al a Ser Gl y Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30
Trp Il e Val Trp Val Lys Gl n Arg Pro Gl y His Gl y Leu Gl u Trp Il e
35 40 45
Gl y Asp Leu Tyr Ser Gl y Gl y Gl y Tyr Thr Phe Tyr Ser Gl u Asn Phe
50 55 60
Lys Gl y Lys Al a Thr Leu Thr Al a Asp Thr Ser Ser Ser Thr Al a Tyr
65 70 75 80
Met His Leu Il e Ser Leu Thr Ser Gl u Asp Ser Al a Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Al a Arg Ser Gl y Tyr Asp Arg Thr Trp Phe Al a His Trp Gl y Gl n Gl y
100 105 110
Ser Leu Val Thr Val Ser Al a
115

<210> 3
<211> 324
<212> DNA
<213> Murino

<400> 3

gacatcaaga tgacccagtc tccatcctcc atgtctgcat cgctgggaga gagagtcact 60
atcacttgtc aggcgagtca ggacattgaa agctatttaa gctggtatca gcagaaacca 120
tggaaatctc ctaagaccct gatctatttac gctacaaggt tggcagatgg ggtcccatca 180
agatttcagtg gcagtggatc tggtcaagat tattctctaa ccatcagcag cctggagtct 240
gacgatacag caacttatta ctgtctacaa catggtgaga gccctcccac gttcggtgct 300
gggaccaagc tggagctgaa acgg 324

<210> 4
<211> 108
<212> PRT
<213> Murino

<400> 4

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

<210> 5
<211> 357
<212> DNA
<213> Murino

<400> 5

gagttccagc tgcagcagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggcgcttc agtgaagata 60
tcctgcaagg cttctggtta ctcatttcact gactacaaca tgaactgggt gaagcagagc 120
aatggaaaga gccttgagtg gattggagta atttaatcct a agtatggtac tactagttac 180
aatcagaagt tcaagggcaa ggccacgtttg actgtagacc aatcctccaa cacagcctac 240
atgcagctca gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct atcactgtgc aagaggaatg 300
ggactcctct ttggtatgga ctactggggc caaggaacct ctgtcaccgt ctcctca 357

<210> 6
<211> 119
<212> PRT
<213> Murino

<400> 6

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

<210> 7
<211> 342
<212> DNA
<213> Murino

<400> 7

gacattgtga tgacacagtc tccatcctcc ctgagtgtgt cagcaggaga gaaggtcact 60
atgagctgca agtccagtca gagtctgtta aacagtggaa atcaraagaa ctacttggcc 120
tggtaccagc agaaaccagg gcagcctcct aaactgttga tctacggggc atccactagg 180
aaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg gaaccgattt cactcttacc 240
atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gtcagaatga tcatagtttt 300
ccgtgcacgt tcggaggggg gaccaagctg gaaataaaac gg 342

<210> 8
<211> 114
<212> PRT
<213> Murino

<400> 8

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

<210> 9
<211> 354
<212> DNA
<213> Murino

<400> 9

gaggtccagc tgcagcagtc tggacctgaa ctggagaagc ctggcgcttc agtgaagata 60
tcctgcaagg cttctggtta ctctttcact gtctacggca tgaactgggt gagacagagc 120
aatggaaaga gccttgaatg gattggaaat tttgatcctt actttagtgt cacttcctac 180
aaccagaagt tccaggacaa ggccacattg actgtagaca aatcctccag cacagcctac 240
atgcagctca agaacctcac atctgaagac tctgcagtct atttctgtgc aagagggagc 300
tgggaaacca tttttgctta ctggggccaa gggactctgg tcactgtctc tgca 354

<210> 10
<211> 118
<212> PRT
<213> Murino

<400> 10

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

<210> 11
<211> 1347

<212> DNA
<213> Murino

<400> 11

caggtgcagc tcgtgcagag cggcgccgaa gtgaagaagc ccggggccag cgtgaaggtg 60
agctgcaagg ccagcggcta cacctttacc aactactgga tcgtgtgggt caggcaggcc 120
cccggccagg gactggagtg gatgggcgac ctgtatagcg gcggcggcta cacctttctac 180
agcgagaact tcaagggcag ggtgaccatg accagggaca ccagcaccag caccgtgtac 240
atggagctga gcagcctgag gagcgaggac accgccgtgt actactgcgc caggagcggc 300
tacgacagga cttggttttgc tcactggggc cagggcacac tagtgaccgt gtccagcgcc 360
agcaccaagg gccccagcgt gtttccccct gccccccagca gcaagagcac cagcggcggc 420
acagccgccc tgggctgcct ggtgaaggac tacttccccg aaccggtgac cgtgtcctgg 480
aacagcggag ccctgaccag cggcgtgcac accttccccg ccgtgctgca gagcagcggc 540
ctgtacagcc tgagcagcgt ggtgaccgtg cccagcagca gcctgggcac ccagacctac 600
atctgtaacg tgaaccacaa gcccagcaac accaaggtgg acaagaaggt ggagcccaag 660
agctgtgaca agacccacac ctgccccccc tgccctgccc ccgagctgct gggaggcccc 720
agcgtgttcc tgttcccccc caagcctaag gacaccctga tgatcagcag aaccccgag 780
gtgacctgtg tggtggtgga tgtgagccac gaggaccctg aggtgaagtt caactggtac 840
gtggacggcg tggaggtgca caatgccaag accaagccca gggaggagca gtacaacagc 900
acctaccggg tggtgtccgt gctgaccgtg ctgcaccagg attggctgaa cggcaaggag 960
tacaagtgta aggtgtccaa caaggccctg cctgccccta tcgagaaaac catcagcaag 1020
gccaagggcc agcccagaga gccccaggtg tacaccctgc ccccctagcag agatgagctg 1080
accaagaacc aggtgtccct gacctgcctg gtgaagggct tctaccccag cgacatcgcc 1140
gtggagtggg agagcaacgg ccagcccgag aacaactaca agaccacccc ccctgtgctg 1200
gacagcgatg gcagcttctt cctgtacagc aagctgaccg tggacaagag cagatggcag 1260
cagggcaacg tgttcagctg ctccgtgatg cacgaggccc tgcacaatca ctacacccag 1320
aagagcctga gcctgtcccc tggcaag 1347

<210> 12
<211> 111
<212> PRT
<213> Murino

<400> 12

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

<210> 13
<211> 5
<212> PRT
<213> Murino

<400> 13

Asn Tyr Trp Ile Val
1 5

<210> 14
<211> 17
<212> PRT
<213> Murino

<400> 14

Asp Leu Tyr Ser Gly Gly Gly Tyr Thr Phe Tyr Ser Glu Asn Phe Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 15

<211> 10
<212> PRT
<213> Murino

<400> 15

Ser Gly Tyr Asp Arg Thr Trp Phe Ala His
1 5 10

<210> 16
<211> 11
<212> PRT
<213> Murino

<400> 16

Gln Ala Ser Gln Asp Ile Glu Ser Tyr Leu Ser
1 5 10

<210> 17
<211> 7
<212> PRT
<213> Murino

<400> 17

Tyr Ala Thr Arg Leu Ala Asp
1 5

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> Proteína

<400> 18

Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Pro Thr
1 5

<210> 19
<211> 5
<212> PRT
<213> Murino

<400> 19

Asp Tyr Asn Met Asn
1 5

<210> 20
<211> 17
<212> PRT
<213> Murino

<400> 20

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

<210> 21
<211> 10
<212> PRT
<213> Murino

<400> 21

Gly Met Gly Leu Leu Phe Gly Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 22
<211> 17
<212> PRT
<213> Murino

<400> 22

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15
Ala

<210> 23
<211> 7
<212> PRT
<213> Murino

<400> 23

Gly Ala Ser Thr Arg Lys Ser
1 5

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

<400> 24

Gln Asn Asp His Ser Phe Pro Cys Thr
1 5

<210> 25
<211> 5
<212> PRT
<213> Murino

<400> 25

Val Tyr Gly Met Asn
1 5

<210> 26
<211> 17
<212> PRT
<213> Murino

<400> 26

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

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

<400> 27
Gly Ser Trp Glu Thr Ile Phe Ala Tyr
1 5

<210> 28
<211> 14
<212> PRT

<213> Murino

<400> 28

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

<210> 29
<211> 7
<212> PRT
<213> Murino

<400> 29

Gly Thr Asn Asn Arg Ala Pro
1 5

<210> 30
<211> 8
<212> PRT
<213> Murino

<400> 30

Ala Leu Trp Tyr Ser Asn His Val
1 5

<210> 31
<211> 15
<212> DNA
<213> Murino

<400> 31

aact act gga t agt t 15

<210> 32
<211> 51
<212> DNA
<213> Murino

<400> 32

gat ct ttact ct ggaggt gg t t at act t t c t acagt gaaa at t t caaggg g 51

<210> 33
<211> 30
<212> DNA
<213> Murino

<400> 33

t cgggt t acg acagaacct g gt t t gct cac 30

<210> 34
<211> 33
<212> DNA
<213> Murino

<400> 34

caggcgagt c aggacat t ga aagct at t t a agc 33

<210> 35
<211> 21
<212> DNA

<213> Murino

<400> 35

tacgctacaa ggttggcaga t 21

<210> 36
<211> 27
<212> DNA
<213> Murino

<400> 36

ctacaacatg gt gagagccc t cccacg 27

<210> 37
<211> 15
<212> DNA
<213> Murino

<400> 37

gact acaaca t gaac 15

<210> 38
<211> 51
<212> DNA
<213> Murino

<400> 38

gt aat t aat c ct aagt at gg t act act agt t acaat caga agt t caaggg c 51

<210> 39
<211> 30
<212> DNA
<213> Murino

<400> 39

ggaat gggac t cct ct t t gg tatggactac 30

<210> 40
<211> 51
<212> DNA
<213> Murino

<400> 40.

aagt ccagt c agagt ct gt t aaacagtgga aat caaaaga act act t ggc c 51

<210> 41
<211> 21
<212> DNA
<213> Murino

<400> 41

ggggcatcca ctaggaaat c t 21

<210> 42
<211> 27
<212> DNA
<213> Murino

<400> 42

cagaat gat c at agt t t t cc gt gcacg 27

<210> 43
<211> 15
<212> DNA
<213> Murino

<400> 43

gt ct acggca t gaac 15

<210> 44
<211> 51
<212> DNA
<213> Murino

<400> 44

aat t t t gat c ct t act t t ag t gt cact t cc tacaaccaga agt t ccagga c 51

<210> 45
<211> 27
<212> DNA
<213> Murino

<400> 45

gggagct ggg aaaccatttt t gct t ac 27

<210> 46
<211> 449
<212> PRT
<213> Murino

<400> 46

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30
Trp Ile Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Asp Leu Tyr Ser Gly Gly Gly Tyr Thr Phe Tyr Ser Glu Asn Phe
50 55 60
Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Ser Gly Tyr Asp Arg Thr Trp Phe Ala His Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445
Lys

<210> 47
<211> 642
<212> DNA
<213> Murino

<400> 47

gat at ccaga t gacccagag ccct agct cc ct cagcgcat cagt cggcga cagagt gaca 60
at cacct gcc aggcat ccca ggacat cgag t ct t acct ga gct ggt acca gcagaagccc 120
ggaaaggccc caaagct cct gat ct act ac gccact cggc t ggcagacgg cgt gcct agc 180
aggt t ct ccg gct cagggt c t gggacagac t t cacccct ga ccat cagct c act gcagccc 240
gaggat t t cg ccacct act a ct gt ct gcag cacggagaga gccccccaac ct t t ggccag 300
ggaaccaagc t ggagat caa gcgt acggt g gccgcccccа gcgt gt t cat ct t ccccccc 360
agcgat gagc agct gaagag cggcaccgcc agcgt ggt gt gt ct gct gaa caact t ct ac 420
ccccgggagg ccaaggt gca gt ggaaggt g gacaat gccc t gcagagcgg caacagccag 480
gagagcgt ga ccgagcagga cagcaaggac t ccacct aca gcct gagcag cacccт gacc 540
ct gagcaagg ccgact acga gaagcacaag gt gt acgcct gt gaggt gac ccaccagggc 600
ct gt ccagcc ccgt gaccaa gagct t caac cggggcgagt gc 642

<210> 48
<211> 214
<212> PRT
<213> Murino

<400> 48

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 Gln Ala Ser Gln Asp Ile Glu Ser Tyr
20 25 30
Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Tyr Ala Thr Arg Leu Ala Asp 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 Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Pro
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 49
<211> 15
<212> PRT
<213> Murino

<400> 49

Leu Ala Thr Glu Leu Arg Ser Gln Ser Leu Gln Thr Leu Gln Gly
1 5 10 15

<210> 50
<211> 15
<212> PRT
<213> Murino

<400> 50

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

<210> 51
<211> 14
<212> PRT
<213> Murino

<400> 51

Leu Arg Glu Leu Arg Ser Val Ser Leu Gln Thr Thr Gln Gly
1 5 10

<210> 52
<211> 14
<212> PRT
<213> Murino

<400> 52

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

<210> 53
<211> 14
<212> PRT
<213> Murino

<400> 53

Glu Ser Gly Pro His Ser Ala Asn Thr Glu Ile Ile Val Lys
1 5 10

<210> 54
<211> 14
<212> PRT
<213> Murino

<400> 54

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

<210> 55
<211> 1347
<212> DNA
<213> Murino

<400> 55

caggtccagt tgcagcagtc tggagctgaa ctggtaaggc ctgggacttc agtgacgata 60
tcctgtaagg cttctggcta cacctttact aactactgga tagtttgggt caaacagagg 120

cctggacatg gacttgagtg gattggagat ctttactctg gaggtggtta tacttctac 180
agtgaaaatt tcaaggggaa ggccacactg actgcagaca catcctccag cactgcctac 240
atgcacctca ttagcctgac atctgaggac tctgctgtct atttctgtgc aagatcgggt 300
tacgacagaa cctggtttgc tcactggggc caagggtcac tagtgaccgt gtccagcgcc 360
agcaccaagg gccccagcgt gttccccctg gccccagca gcaagagcac cagcggcggc 420
acagccgccc tgggctgcct ggtgaaggac tacttccccg aaccggtgac cgtgtcctgg 480
aacagcggag ccctgaccag cggcgtgcac acctttcccg ccgtgctgca gagcagcggc 540
ctgtacagcc tgagcagcgt ggtgaccgtg cccagcagca gcctgggcac ccagacctac 600
atctgtaacg tgaaccacaa gcccagcaac accaaggtgg acaagaaggt ggagcccaag 660
agctgtgaca agacccacac ctgccccccc tgccctgccc ccgagctgct gggaggcccc 720
agcgtgttcc tgttcccccc caagcctaag gacaccctga tgatcagcag aacccccgag 780
gtgacctgtg tggtggtgga tgtgagccac gaggaccctg aggtgaagtt caactggtac 840
gtggacggcg tggaggtgca caatgccaag accaagccca gggaggagca gtacaacagc 900
acctaccggg tggtgtccgt gctgaccgtg ctgcaccagg atttggctga cggcaaggag 960
tacaagtgta aggtgtccaa caaggccctg cctgccccta tcgagaaaac catcagcaag 1020
gccaagggcc agcccagaga gccccaggtg tacaccctgc ccccctagcag agatgagctg 1080
accaagaacc aggtgtccct gacctgcctg gtgaagggct tctaccccag cgacatcgcc 1140
gtggagtggg agagcaacgg ccagcccgag aacaactaca agaccacccc ccctgtgctg 1200
gacagcgatg gcagcttctt cctgtacagc aagctgaccg tggacaagag cagatggcag 1260
cagggcaacg tgttcagctg ctccgtgatg cacgaggccc tgcacaatca ctacacccag 1320
aagagcctga gcctgtcccc tggcaag 1347

<210> 56
<211> 449
<212> PRT
<213> Murino

<400> 56

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr
1 5 10 15
Ser Val Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30
Trp Ile Val Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Asp Leu Tyr Ser Gly Gly Gly Tyr Thr Phe Tyr Ser Glu Asn Phe
50 55 60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met His Leu Ile Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Arg Ser Gly Tyr Asp Arg Thr Trp Phe Ala His Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Ser Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445
Lys

<210> 57
<211> 642
<212> DNA
<213> Murino

<400> 57

gacatcaaga tgacccagtc tccatcctcc atgtctgcat cgctgggaga gagagtcact 60
atcacttgtc aggcgagtca ggacattgaa agctatttaa gctggtatca gcagaaacca 120
tggaaatctc ctaagaccct gatctattac gctacaaggt tggcagatgg ggtcccatca 180
agattcagtg gcagtggatc tggtcaagat tattctctaa ccatcagcag cctggagtct 240
gacgatacag caacttatta ctgtctacaa catggtgaga gccctcccac gttcggtgct 300
gggaccaagc tggagctgaa acgtacggtg gccgccccca gcgtgttcat cttccccccc 360
agcgatgagc agctgaagag cggcaccgcc agcgtggtgt gtctgctgaa caacttctac 420
ccccgggagg ccaaggtgca gtggaaggtg gacaatgccc tgcagagcgg caacagccag 480
gagagcgtga ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag caccctgacc 540
ctgagcaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gtgaggtgac ccaccagggc 600
ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac cggggcgagt gc 642

<210> 58
<211> 214
<212> PRT
<213> Murino

<400> 58

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 59
<211> 642
<212> DNA
<213> Murino

<400> 59

```
gatatccaga tgacccagag ccctagctcc ctcagcgcat cagtcggcga cagagtgaca 60
atcacctgcc aggcatccca ggacatcgag tcttacctga gctggtacca gcagaagccc 120
ggaaaggccc caaagctcct gatctactac gccactcggc tggcagacgg cgtgcctagc 180
aggttctccg gctcagggtc tgggacagac ttcaccttca ccatcagctc actgcagccc 240
gaggatatcg ccacctacta ctgtctgcag cacggagaga gccccccaac ctttggccag 300
ggaaccaagc tggagatcaa gcgtacggtg gccgccccca gcgtgttcat ctttccccccc 360
agcgatgagc agctgaagag cggcaccgcc agcgtggtgt gtctgctgaa caacttctac 420
ccccgggagg ccaaggtgca gtggaaggtg gacaatgccc tgcagagcgg caacagccag 480
gagagcgtga ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag caccctgacc 540
ctgagcaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gtgaggtgac ccaccagggc 600
ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac cggggcgagt gc                    642
```

<210> 60
<211> 214
<212> PRT
<213> Murino

<400> 60

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

<210> 61
<211> 642
<212> DNA
<213> Murino

<400> 61

```
gatatccaga tgacccagag ccctagctcc ctcagcgcat cagtcggcga cagagtgaca 60
atcacctgcc aggcatccca ggacatcgag tcttacctga gctggtacca gcagaagccc 120
ggaaaggccc caaagctcct gatctactac gccactcggc tggcagacgg cgtgcctagc 180
aggttctccg gctcagggtc tgggcaggac tacaccctga ccatcagctc actgcagccc 240
gaggatttcg ccacctacta ctgtctgcag cacggagaga gccccccaac ctttggccag 300

ggaaccaagc tggagatcaa gcgtacggtg gccgccccca gcgtgttcat cttccccccc 360
agcgatgagc agctgaagag cggcaccgcc agcgtggtgt gtctgctgaa caacttctac 420
ccccgggagg ccaaggtgca gtggaaggtg gacaatgccc tgcagagcgg caacagccag 480
gagagcgtga ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag caccctgacc 540
ctgagcaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gtgaggtgac ccaccagggc 600
ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac cggggcgagt gc                    642
```

<210> 62
<211> 214
<212> PRT
<213> Murino

<400> 62

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

<210> 63
<211> 642
<212> DNA
<213> Murino

<400> 63

```
gagatcgtgc tgacccagtc tcccgccacc ctgtcactgt ctcccggcga aagggcaacc 60
ctgagctgcc aggccagcca ggacatcgag agctacctga gctggtacca gcagaagccc 120
ggccaggccc ccaggctgct gatctactac gccaccaggc tggccgacgg cattcccgcc 180
aggttcagcg gaagcggcag cggcaccgac ttcactctga ccatcagcag cctggagccc 240
gaggacttcg ccgtgtacta ctgcctgcag cacggcgaga gccctcccac ctttcggccag 300
ggcaccaagc tcgagatcaa gcgtacggtg gccgccccca gcgtgttcat ctttcccccc 360
agcgatgagc agctgaagag cggcaccgcc agcgtggtgt gtctgctgaa caacttctac 420
ccccgggagg ccaaggtgca gtggaaggtg gacaatgccc tgcagagcgg caacagccag 480
gagagcgtga ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag caccctgacc 540
ctgagcaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gtgaggtgac ccaccagggc 600
ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac cggggcgagt gc                    642
```

<210> 64
<211> 214
<212> PRT
<213> Murino

<400> 64

```
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 Gln Ala Ser Gln Asp Ile Glu Ser Tyr
20 25 30
Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Tyr Ala Thr Arg Leu Ala Asp 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 Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Pro
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo penta-específico que tiene especificidad por y neutraliza cada una de IL-8 humana, Gro-alfa, Gro-beta, Gro-gamma y ENA-78.

2. Un anticuerpo según la reivindicación 1, que se une a IL-8 humana, Gro-alfa, Gro-beta, Gro-gamma y ENA-78 con una constante de equilibrio KD con valores menores de 10^{-7} M, 10^{-8} M o 10^{-9} M determinados por resonancia de plasmón superficial.

3. Un método para producir un anticuerpo penta-específico que comprende las etapas de:

a. inyectar en un ratón una mezcla de IL-8 humana, Gro-alfa, Gro-beta, Gro-gamma y ENA-78 en adyuvantes de Freund (cFA);

b. inyectar en el ratón una mezcla de IL-8 humana, Gro-alfa, Gro-beta, Gro-gamma y ENA-78 en adyuvante incompleto de Freund (iFA); y

c. inyectar en el ratón una mezcla de IL-8 humana, Gro-alfa, Gro-beta, Gro-gamma y ENA-78, y una serie de 5 péptidos antigénicos múltiples (MAP) teniendo cada unidad de MAP una secuencia distinta de los polipéptidos de la SEQ ID Nº: 49-53 en adyuvante incompleto de Freund;

d. aislar células B a partir del ratón;

e. fusionar las células B con células de mieloma para formar células de hibridoma inmortales que secreten el anticuerpo penta-específico deseado; y

f. aislar el anticuerpo penta-específico del sobrenadante del cultivo del hibridoma.

4. Un método para obtener un anticuerpo penta-específico que comprende las etapas de:

a. inyectar en un ratón una serie de 5 péptidos antigénicos múltiples (MAP), teniendo cada unidad de MAP una secuencia distinta de los polipéptidos de ID Nº: 49-53 (la serie de MAP) en adyuvante completo de Freund.;

b. inyectar en el ratón la serie de MAP en adyuvante incompleto de Freund;

c. inyectar en el ratón una mezcla de IL-8 humana, Gro-alfa, Gro-beta, Gro-gamma y ENA-78 y la serie de MPA en adyuvante incompleto de Freund (iFA);

d. aislar células B a partir del ratón; y

e. fusionar las células B con células de mieloma para formar células de hibridoma inmortales que secreten el anticuerpo penta-específico deseado; y

f. aislar el anticuerpo penta-específico del sobrenadante del cultivo del hibridoma.

5. Un anticuerpo según la reivindicación 1, donde el anticuerpo comprende:

a. regiones variables de cadena pesada y ligera codificadas por secuencias de nucleótidos que comprenden las secuencias de la SEQ ID Nº:1 y la SEQ ID Nº: 3, respectivamente;

b. regiones variables de cadena pesada y ligera codificadas por secuencias de nucleótidos que comprenden secuencias de la SEQ ID Nº:5 y la SEQ ID Nº: 7, respectivamente;

c. una región variable de cadena pesada codificada por secuencias de nucleótidos que comprenden la secuencia de la SEQ ID Nº:9;

d. secuencias que comprenden secuencias de la SEQ ID Nº: 11, y de la SEQ ID Nº:47, 59, 61 ó 63, respectivamente; o

e. cadenas ligeras y pesadas codificadas por secuencias nucleotídicas que comprenden secuencias que comprenden secuencias con una identidad de al menos 90%, 95%, 98% ó 99% con secuencias de la SEQ ID Nº: 11, y de la SEQ ID Nº: 47, 59, 61 ó 63, respectivamente.

6. Un anticuerpo según la reivindicación 1, donde el anticuerpo comprende

a. regiones variables de las cadenas pesada y ligera que comprenden las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID Nº: 2 y la SEQ ID Nº: 4, respectivamente;

b. regiones variables de las cadenas pesada y ligera que comprenden polipéptidos que tienen una identidad

de al menos 90%, 95%, 98% ó 99% con las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID Nº: 2 y la SEQ ID Nº: 4, respectivamente;

c. regiones variables de las cadenas pesada y ligera que comprenden las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID Nº: 6, y la SEQ ID Nº: 8, respectivamente;

d. regiones variables de las cadenas pesada y ligera que comprenden polipéptidos que tienen una identidad de al menos 90%, 95%, 98% ó 99% con las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID Nº: 6 y la SEQ ID Nº:84, respectivamente;

e. una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID Nº: 10, o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 90%, 95%, 98% ó 99% con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID Nº: 10;

f. cadenas pesada y ligera que comprenden las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID Nº:46, y las SEQ ID Nº: 48, 60, 62 o 64, respectivamente; o

g. cadenas pesada y ligera que comprenden polipéptidos que tienen una identidad de al menos 90%, 95%, 98% ó 99% con las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID Nº: 46 y las SEQ ID Nº: 48, 60, 62, o 64, respectivamente.

7. Un anticuerpo según la reivindicación 1, donde el anticuerpo comprende al menos una región variable seleccionada de (i) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID Nº: 2, 4, 6, 8, o 10; o (ii) una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 90%, 95%, 98% ó 99% con una cualquiera de las secuencias de aminoácidos de (i) anteriores.

8. Un anticuerpo según la reivindicación 1, donde el anticuerpo comprende:

a. al menos una secuencia de CDR seleccionada de SEQ ID NOs: 13, 14, 15, 16, 17 y 18;

b. al menos una secuencia de CDR seleccionada de SEQ ID NOs: 19, 20, 21, 22, 23 y 24; o

c. al menos una secuencia de CDR seleccionada de SEQ ID NOs: 25, 26 y 27.

9. Un anticuerpo según la reivindicación 1, donde el anticuerpo comprende una secuencia polinucleotídica que codifica :

a. el polipéptido de SEQ ID NO:15;

b. el polipéptido de SEQ ID NO:21; o

c. polipéptido de SEQ ID NO:27.

10. Un anticuerpo según la reivindicación 1, donde el anticuerpo comprende:

a. al menos 4 secuencias de CDR seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 13, 14, 15, 16, 17, y 18; o

b. al menos 4 secuencias de CDR seleccionadas del grupo que consiste en: SEQ ID NOs: 19, 20, 21, 22, 23, y 24.

11. Un anticuerpo según la reivindicación 1, donde el anticuerpo comprende:

a. Secuencias de CDR de SEQ ID NOs: 13, 14, 15, 16, 17 y 18;

b. regiones variables de cadenas ligera y pesada que comprenden las secuencias de CDR de SEQ ID NOs: 13, 14, y 15 y SEQ ID NOs: 16, 17, y 18, respectivamente;

c. secuencias de CDR de SEQ ID NOs: 19, 20, 21, 22, 23, y 24;

d. regiones variables de cadenas ligera y pesada que comprenden las secuencias de CDR de SEQ ID NOs: 19,20, y 21, y SEQ ID NOs: 22, 23, y 24, respectivamente;

e. Secuencias de CDR de SEQ ID NOs: 25, 26, y 27; o

f. una región variable de cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de CDR de SEQ ID NOs: 25, 26, y 27.

12. Un anticuerpo según la reivindicación 1, que comprende las secuencias de CDR de SEQ ID NO: 13, 14, 15, 16, 17 y 18.

13. Un hibridoma o transfectoma que produce un anticuerpo penta-específico que comprende secuencias de CDR de:

a. SEQ ID NOs: 13, 14, 15, 16, 17, y 18;

b. SEQ ID NOs: 19,20,21,22,23, y 24; o

c. SEQ ID NOs: 25, 26, y 27.

14.Una célula eucariótica o procariótica que produce un anticuerpo que comprende:

a. secuencias de CDR de SEQ ID NOs: 13, 14, 15, 16, 17, y 18;

b. secuencias de CDR de SEQ ID NOs: 19, 20, 21, 22, 23, y 24;

c. secuencias de CDR de SEQ ID NOs: 25, 26, y 27;

d. una cadena ligera y/o pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46, o SEQ ID NO:48, 60, 62, o 64 , respectivamente; o

e. una cadena ligera y/o pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 90%, 95%, 98% ó 99 con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID Nº 46 o de las SEQ ID Nº: 48, 60, 62 ó 64, respectivamente.

15. Un anticuerpo según la reivindicación 1, que comprende secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera de, respectivamente:

(a) SEQ ID NO:46 and SEQ ID NO:48;

(b) SEQ ID NO:46 and SEQ ID NO: 62;

(c) SEQ ID NO:46 and SEQ ID NO: 60; o

(d) SEQ ID NO:46 and SEQ ID NO: 64.

16. Un anticuerpo según la reivindicación 1, donde dicho anticuerpo se une dentro del epítopo de KELRCQCIKTYSKP (SEQ ID NO: 54) de IL-8 humana.

17. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo penta-específico según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 5 a 12, o 14 a 16 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

18. Un anticuerpo penta-específico según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 5 a 12, 15 y 16 para uso en el tratamiento o la prevención de EPOC, osteoartritis, artritis reumatoide, artritis erosiva, asma, aterosclerosis, enfermedad intestinal inflamatoria, psoriasis, rechazo de trasplantes, gota, cáncer, lesión pulmonar aguda, enfermedad pulmonar aguda, sepsis, ARDS, enfermedad de las arterias periféricas, esclerosis sistémica, síndrome de dificultad respiratoria en neonatos, exacerbación de asma y EPOC, fibrosis quística, panbronquiolitis difusa, lesión por reperfusion, y/o endometriosis.

19.Un proceso para producir un anticuerpo penta-específico (inmunoglobulina) en una sola célula hospedadora, que comprende las etapas de:

(i) transformar dicha célula hospedadora individual con

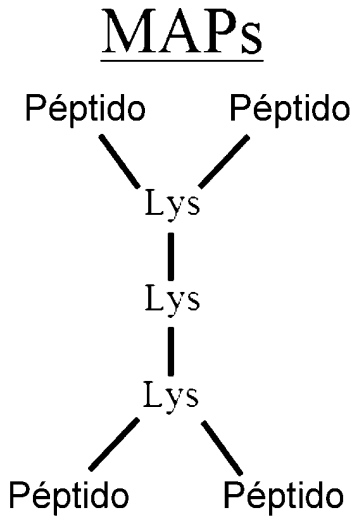
(a) una primera secuencia de ADN que codifica al menos el dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina que comprende dominios de CDR de las SEQ ID Nº: 13, 14 y 15; y una segunda secuencia de ADN que codifica al menos el dominio variable de la cadena ligera de inmunoglobulina que comprende dominios CDR de SEQ ID Nº: 16, 17 y 18;

(b) una primera secuencia de ADN que codifica al menos el dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina que comprende dominios de CDR de las SEQ ID Nº: 19, 20 y 21; y una segunda secuencia de ADN que codifica al menos el dominio variable de la cadena ligera de inmunoglobulina que comprende dominios CDR de SEQ ID Nº: 22, 23 y 24; o

(c) una primera secuencia de ADN que codifica una cadena pesada que comprende polipéptido de SEQ ID Nº 46; y una secuencia de ADN que codifica una cadena ligera que comprende un polipéptido de SEQ ID Nº: 48, 60, 62, o 64; y

(ii) expresar dicha primera secuencia de ADN y dicha segunda secuencia de ADN de forma que se produzcan dichas cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina como moléculas separadas en dicha célula hospedadora individual transformada.

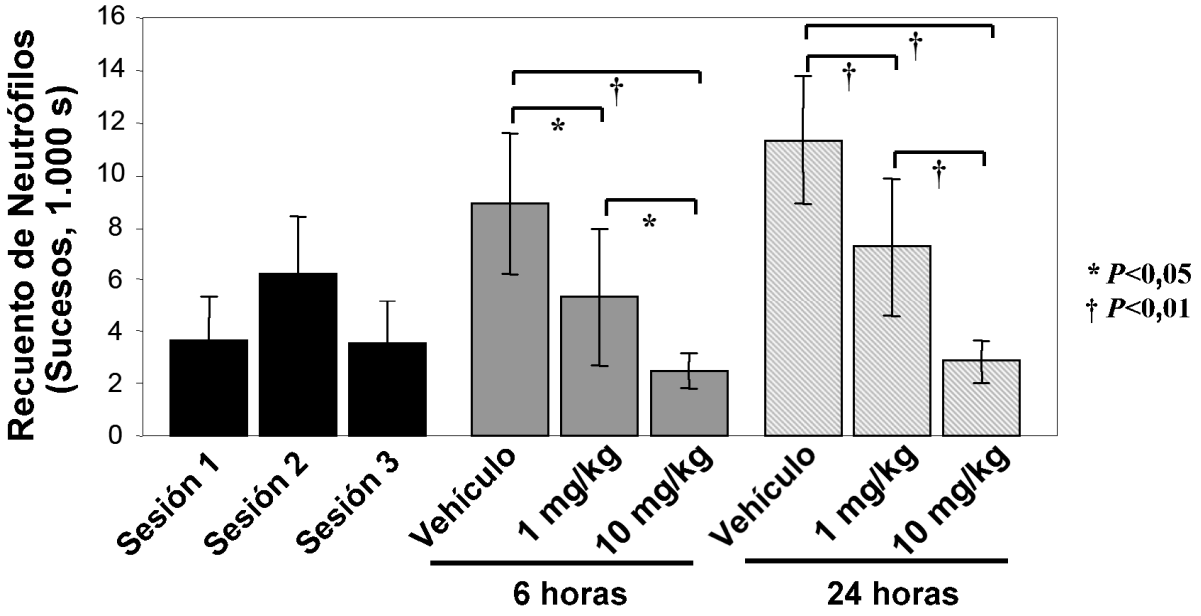
Figura 1



Péptidos lineales

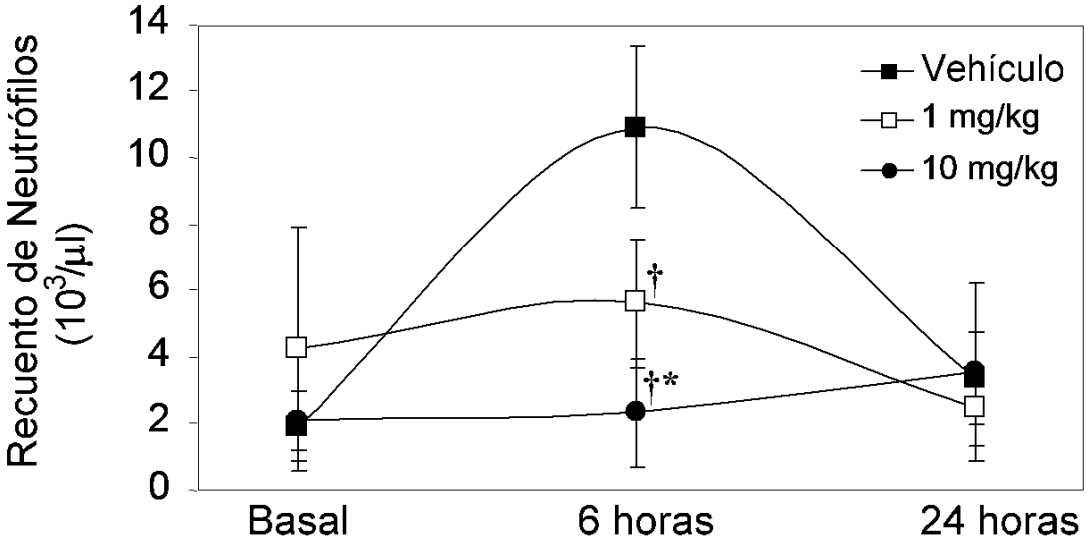
LATELRSQSLQTLQG - SEC ID Nº: 49
SAKELRSQSIKTYSK - SEC ID Nº: 50
LRELRSVSLQTTQG - SEC ID Nº: 51
SPGPHSAQTEVIAT - SEC ID Nº: 52
ESGPHSANTEIIVK - SEC ID Nº: 53

Figura 2



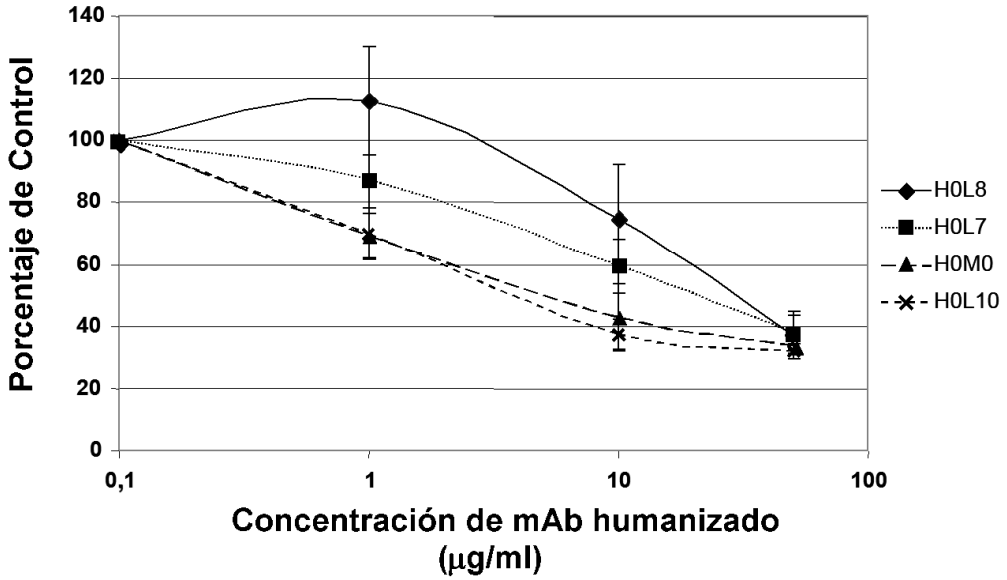
Datos de citometría de flujo que comparan neutrófilos presentes en muestras de BAL. Se presentan las sesiones 1, 2 y 3. Las barras rellenas de color negro muestran los valores basales 5 días antes de la exposición a LPS. Las barras rellenas de color gris representan los datos de BAL 6 horas después de la exposición a LPS. El tratamiento con Anticuerpo Quimera inhibió de una manera significativa y dependiente de la dosis la infiltración de neutrófilos. Las barras sombreadas en gris representan los datos a las 24 horas. (n=6, *$p \leq 0,05$, †$p \leq 0,01$, las barras de error representan la desviación típica).

Figura 3



Análisis hematológico de neutrófilos circulantes totales (recuento de células). La inyección IV de 1 (cuadrados blancos, □) y 10 mg/kg (círculos negros, •) del Anticuerpo Quimera previno la estimulación por LPS inhalado de los neutrófilos circulantes. Tanto el tratamiento con 1 mg/kg como el tratamiento con 10 mg/kg redujeron significativamente el recuento de neutrófilos en comparación con los NHP tratados con vehículo (†) y el tratamiento con 10 mg/kg también redujo significativamente el recuento de neutrófilos en comparación con la dosis de 1 mg/kg (*). Los datos se representan como recuento total por µl de sangre (n=6, *$p \leq 0,05$ frente a 1 mg/kg, †$p \leq 0,01$ frente a vehículo, las barras de error representan la desviación típica).

Figura 4



La inhibición de IL-8 humana estimulaba la activación de los neutrófilos (aumentaba la expresión de CD11b en la superficie). Se preincubaron diversas concentraciones de los anticuerpos penta-específicos humanizados con hIL-8 10 nM antes de la adición a neutrófilos humanos purificados. Los datos se expresan como valores medios de 4 donantes diferentes (n=4). Las barras representan el error típico. Todas las muestras se comparan con neutrófilos purificados estimulados sólo con hIL-8 (sin mAb antes de la adición a los neutrófilos purificados). Las construcciones humanizadas H0L10 y H0M0 son más eficaces en la inhibición de la expresión de CD11b en la superficie estimulada por hIL-8.

Figura 5A

Unión del mAb 2X656.35 de ratón a quimioquinas humanas diana.

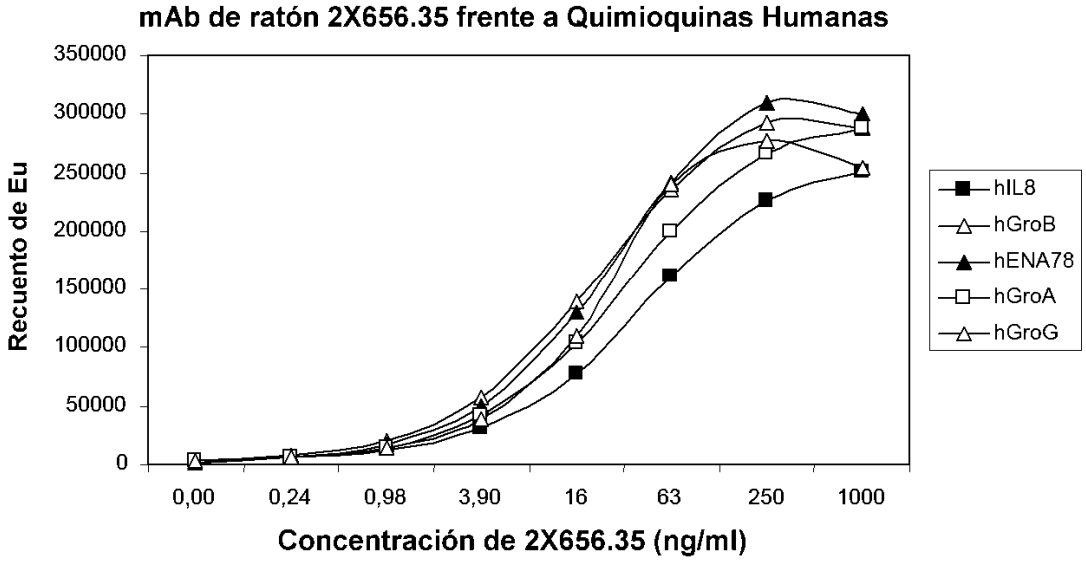
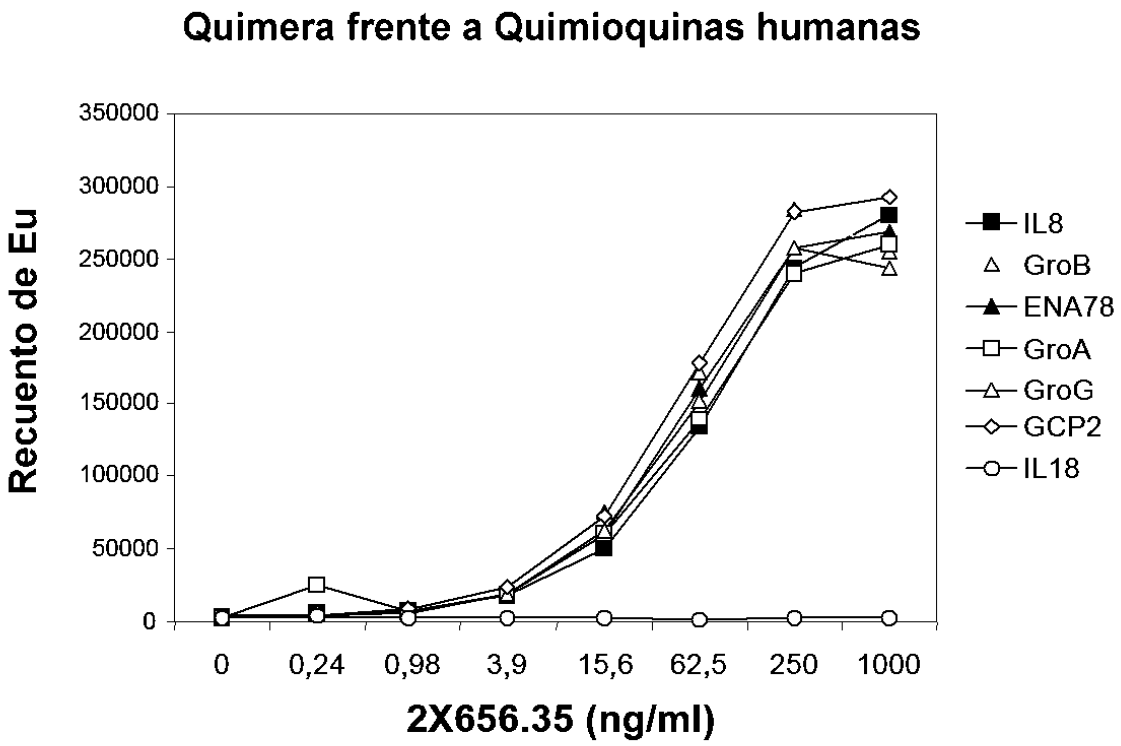


Figura 5B

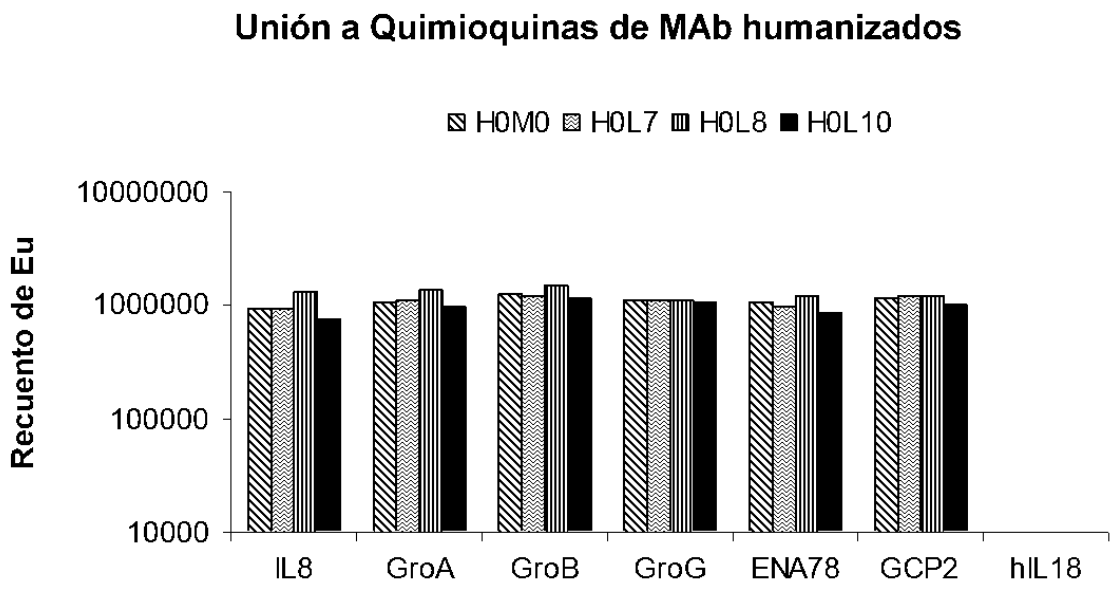
Unión del mAb Anticuerpo Quimera (HcLc) a quimioquinas humanas diana.



se usa hIL-18 como control negativo

Figura 5C

Unión de mAb humanizados a quimioquinas humanas diana



se usa hIL-18 como control negativo