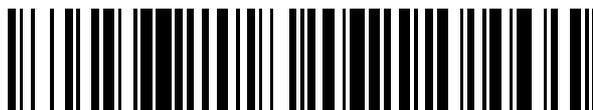


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 666 126**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.06.2013 PCT/IB2013/054688**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.12.2013 WO13183032**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.06.2013 E 13742750 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.02.2018 EP 2859019**

54 Título: **Anticuerpos anti-TrkA humanizados con sustituciones de aminoácidos**

30 Prioridad:

08.06.2012 US 201261657184 P

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

03.05.2018

73 Titular/es:

**GLENMARK PHARMACEUTICALS S.A. (100.0%)
Chemin de la Combeta, 5
2300 La Chaux-de-Fonds, CH**

72 Inventor/es:

**BLEIN, STANISLAS;
OLLIER, ROMAIN y
SKEGRO, DARKO**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 666 126 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-TrkA humanizados con sustituciones de aminoácidos

Campo de la invención

La presente invención se refiere en general a anticuerpos dirigidos contra el receptor TrkA y sus usos, que incluyen anticuerpos anti-TrkA humanizados y métodos de tratamiento con anticuerpos anti-TrkA. En un aspecto, la presente invención se refiere a anticuerpos anti-TrkA humanizados con propiedades inhibitoras potenciadas.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a anticuerpos anti-TrkA humanizados con propiedades inhibitoras mejoradas que comprenden una región variable de cadena pesada, una región variable de cadena ligera, una región constante de cadena ligera humana y una región constante de cadena pesada de IgG4 humana variante que presentan propiedades de intercambio alteradas.

Antecedentes de la invención

Las neurotrofinas son una familia de factores de crecimiento peptídicos (Barde YA (1994) J. Neurobiol. 25(11): 1329-33) estructuralmente relacionadas con el primer miembro de la familia NGF (Levi - Montalcini R (1987) EMBO J. 6(5): 1145 - 54). Las neurotrofinas modulan la diferenciación y supervivencia neuronal, así como la transmisión sináptica, tanto de las neuronas periféricas como del sistema nervioso central. Además, el NGF actúa sobre diversos tejidos y células no neuronales, tales como las células inmunes. El NGF actúa a través de dos receptores de membrana presentes en las células diana, el receptor p75 de baja afinidad y la glicoproteína transmembrana de alta afinidad de 140 kDa, TrkA (Kaplan DR et al., (1991) Science 252 (5005): 554-8; Klein R et al., (1991) Cell 65 (1): 189 - 97) que tiene actividad de tirosina quinasa. TrkA se expresa en las neuronas de la cresta neural, en las neuronas simpáticas y en las neuronas colinérgicas del cerebro anterior basal y cuerpo estriado, donde representa el mediador crucial de las actividades de NGF (Holtzman DM et al., (1992) Neuron 9(3): 465-78; Verge VM et al., (1992) J. Neurosci. 12(10):4011-22). TrkA también se expresa en algunos tejidos y células no neuronales, que incluyen los linfocitos B (Torcia M et al., (1996) Cell 85 (3): 345-56).

El factor de crecimiento nervioso (NGF) se identificó originalmente como un factor de supervivencia para neuronas sensoriales y simpáticas en el sistema nervioso en desarrollo (Gorin PD & Johnson EM (1979) PNAS USA, 76 (10): 5382-6). En los adultos, NGF no es necesario para la supervivencia, pero tiene un papel crucial en la generación del dolor y la hiperalgesia en varios estados de dolor agudo y crónico. La expresión de NGF es alta en tejidos lesionados e inflamados, y la activación de trkA en neuronas nociceptivas desencadena y potencia la señalización del dolor por múltiples mecanismos.

El dolor relacionado con la inflamación se puede reducir significativamente neutralizando la bioactividad de NGF en modelos animales (Woolf CJ et al., (1994) Neuroscience 62 (2): 327 - 31; McMahon SB et al., (1995) Nat. Med. 1(8): 774 - 80; Koltzenburg M et al., (1999) Eur. J. Neurosci. 11 (5): 1698 - 704), lo que implica que es necesario un nivel mejorado de esta neurotrofina para generar la respuesta hiperalgésica completa. Sorprendentemente, la inhibición de otras neurotrofinas no provoca el antagonismo de la hiperalgesia inducida, lo que sugiere que este efecto es específico del NGF (McMahon SB et al., (1995) Nat. Med. 1(8): 774 - 80); además, la inhibición de NGF da como resultado la analgesia en diferentes protocolos de dolor relacionados con la neuropatía (Koltzenburg M et al., (1999) Eur. J. Neurosci. 11(5): 1698-704; Ro LS et al., (1999) Pain 79 (2-3): 265-74; Theodosiou M et al., (1999) Pain, 81 (3): 245-55; Christensen MD y Hulsebosch CE (1997) Exp. Neurol. 147(2):463-75). Hay una gran necesidad médica no satisfecha en el tratamiento del dolor. Las clases dominantes de fármacos analgésicos, los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) y los opiáceos están limitados por su eficacia y tolerabilidad (Hefti FF et al, (2006) Trends Pharmacol. Sci. 27(2): 85-91). Menos del 30% de los pacientes con dolor crónico obtienen un alivio adecuado con las terapias actuales, y hay muchos efectos adversos, particularmente con la administración a largo plazo (Kalso E et al, (2004) Pain 112 (3): 372-80). El reconocimiento de que el NGF tiene un papel central en los mecanismos del dolor en adultos brinda la oportunidad de desarrollar una clase completamente nueva de terapias para el dolor.

Reconocer TrkA en lugar de NGF puede representar una mejor opción terapéutica ya que este receptor no interfiere con las funciones de NGF mediadas por el receptor p75, teniendo este último una amplia función en el desarrollo neuronal. Se han descrito previamente anticuerpos que se unen específicamente a TrkA en el documento WO2009/098238.

Sumario de la invención

La presente descripción se refiere en general a anticuerpos anti-TrkA humanizados, a métodos para su preparación y uso.

En un aspecto, la presente descripción proporciona un anticuerpo anti-TrkA humanizado o fragmento del mismo que comprende:

a) un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 1-5, y

b) un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 6-13,

5 en donde CDR2 del dominio variable de la cadena pesada comprende al menos una sustitución de aminoácido y/o en el que la región no CDR del dominio variable de la cadena pesada comprende una sustitución de aminoácido en una posición de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en 37, 42 y 89, en donde la posición del aminoácido de cada miembro del grupo se indica utilizando el sistema de numeración establecido en Kabat.

10 En aspectos adicionales, la presente descripción proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo anti-TrkA humanizado o fragmento del mismo, un vector que comprende el ácido nucleico aislado y una célula hospedadora que comprende el ácido nucleico aislado o el vector. También se proporciona en la presente descripción un método para producir un anticuerpo anti-TrkA humanizado o un fragmento del mismo.

15 En aspectos adicionales, la presente descripción proporciona una composición que comprende un anticuerpo anti-TrkA humanizado o fragmento del mismo y un inmunocombinado que comprende un anticuerpo anti-TrkA humanizado o fragmento del mismo unido a un agente terapéutico.

En aspectos adicionales, la presente descripción proporciona un anticuerpo anti-TrkA humanizado o fragmento del mismo, una composición o un inmunocombinado para uso en medicina, para uso en el tratamiento del dolor, para uso en el tratamiento del dolor crónico, para uso en el tratamiento de dolor agudo, para uso en el tratamiento del dolor asociado con uno o más de los siguientes:

20 pancreatitis, cálculos renales, endometriosis, EII, enfermedad de Crohn, adherencias posquirúrgicas, cálculos de la vesícula biliar, dolores de cabeza, dismenorrea, dolor musculoesquelético, esguinces, dolor visceral, quistes ováricos, prostatitis, cistitis, cistitis intersticial, dolor postoperatorio, migraña, neuralgia del trigémino, dolor por quemaduras y/o heridas, dolor asociado a traumatismos, dolor neuropático, dolor asociado con enfermedades musculoesqueléticas, artritis reumatoide, osteoartritis, espondilitis anquilosante, patologías periarticulares, dolor
25 oncológico, dolor por metástasis óseas, infección por VIH, para uso en el tratamiento del cáncer, un trastorno neuronal, la enfermedad de Alzheimer, diabetes mellitus, nefropatía diabética, un trastorno viral, un trastorno mediado por el VIH, la lepra o un trastorno inflamatorio y para su uso en el diagnóstico o pronóstico.

30 En otro aspecto, en un modelo in vivo de hiperalgesia inflamatoria aguda, la administración de un anticuerpo anti-TrkA humanizado dio como resultado una reversión significativa y sostenida de la hiperalgesia inflamatoria crónica a una dosis de 0,01 mg/kg. En otro aspecto, en un modelo in vivo de hiperalgesia osteoarticular crónica, la administración de un anticuerpo anti-TrkA humanizado dio como resultado una reversión significativa y sostenida de la hiperalgesia osteoarticular crónica a una dosis de 0,01 mg/kg. En un aspecto adicional, en el modelo de lesión por constricción crónica in vivo de dolor neuropático, la administración de un anticuerpo anti-TrkA humanizado dio como resultado una reversión significativa del dolor neuropático a una dosis de 1,0 mg/kg.

35 En un aspecto adicional, la presente descripción proporciona un artículo de fabricación que comprende un anticuerpo anti-TrkA humanizado o fragmento del mismo, una composición o un inmunocombinado.

En un aspecto adicional, la presente descripción proporciona un kit que comprende un anticuerpo anti-TrkA humanizado o fragmento del mismo, una composición o un inmunocombinado.

Breve descripción de las figuras

40 FIG. 1: Medidas de resonancia de plasma superficial de anticuerpos anti-TrkA. Los datos se expresan como el número de respuestas (abreviado RU, eje Y) frente al tiempo (eje X). (Figura 1A) anticuerpo MNAC13. (Figura 1B) anticuerpo BXhVH5VL1. (Figura 1C) anticuerpo GBR VH5 (V37A) VL1. (Figura 1D) anticuerpo GBR VH5 (K3Q, V37A) VL1.

45 FIG. 2: Mediciones de termoestabilidad de anticuerpos anti-TrkA usando calorimetría de barrido diferencial. Los datos se expresan como capacidad de calor molar en exceso (abreviado CP [kcal/mol/°C]; Eje Y) vs. temperatura (eje X). (Figura 2A) Anticuerpo MNAC13 (la T_m del fragmento FAB es T_m1 a 74°C). (Figura 2B) Anticuerpo BXhVH5VL1 (la T_m del fragmento FAB es T_m3 a 76,5°C). (Figura 2C) GBR VH5 (V37A) anticuerpo VL1 (la T_m del fragmento FAB es T_m1 a 73,6°C). (Figura 2D) GBR VH5 (K3Q, V37A) anticuerpo VL1 (la T_m del fragmento FAB es T_m1 a 73°C). (Figura 2E) superposición de la FIG. 2C y FIG. 2D. (Fig. 2F) superposición de la FIG. 2B y FIG. 2D. (Figura 2G) superposición de la FIG. 2A y FIG. 2D.

50 FIG. 3: Bioactividad funcional de anticuerpos anti-TrkA. Efecto de anticuerpos anti-TrkA humanizados en la proliferación de células TF-1 inducida por NGF; los datos se expresan como % de la respuesta proliferativa (eje Y) frente a la concentración de anticuerpo (µg/ml; Eje X). (Figura 3A) GBR VH5 (V37A) VL1, GBR VH5 (K3Q, V37A) VL1 vs. BXhVH5VLI. (Figura 3B) GBR VH5 (V37A) VL1, GBR VH5 (K3Q, V37A) VL1 vs. MNAC13. (Figura 3C) GBR

VH5 (K3Q, V37A) VL1 vs. GBR VH5 (K3Q, V37A) VL1 IGHG4 S228P. (Figura 3D) BXhVH5VL1, BXhVH5VL3, GBR VH5 (V37A) VL1 vs. GBR VH5 (V37A) VL3. (Figura 3E) BXhVH5VL1, BXhVH3VL1, GBR VH5 (V37A) VL1 vs. GBR VH3 (V37A) VL1.

5 FIG. 4: El anticuerpo humanizado anti-TrkA revierte el dolor agudo inflamatorio de las patas. La hiperalgesia inflamatoria aguda de las patas fue inducida por inyección intraplantar de CFA en una de las patas posteriores de ratones AMB1 y fue medida como la relación en % entre el peso que soporta la pata ipsilateral (inyectada) y contralateral (no inyectada) (% ipsi/contra, media \pm sem). Las lecturas que soportaban el peso se tomaron 23 horas después de la inyección de CFA (0 h) antes del inicio del tratamiento a las 24 horas después de la CFA con una única inyección i.p. de 0,0001 (barras blancas), 0,001 (barras sombreadas horizontalmente), 0,01 (barras cuadrículadas) y 0,1 mg/kg (barras sombreadas en diagonal) de anticuerpo anti-TrkA o anticuerpo control isotipo 0,1 mg/kg (barras negras) seguido de mediciones de carga de peso a 4, 8, 24, 48, 72, 96 y 120 horas después de la dosis. Como control positivo, los ratones se trataron con 10 mg/kg de indometacina p.o. (barras sombreadas verticalmente).

15 FIG. 5: El anticuerpo humanizado anti-TrkA revierte el dolor articular inflamatorio crónico. La hiperalgesia inflamatoria crónica de la articulación fue inducida por inyección intraarticular de CFA en una de las articulaciones de la rodilla de la extremidad posterior de ratones AMB1 y medida como la relación en % entre el peso soportado en la extremidad ipsilateral (inyectada) y contralateral (no inyectada) (% ipsi/contra, media \pm sem). Las lecturas que soportan peso se tomaron inmediatamente antes de la inyección de CFA (naive) y en los días 3, 7 y 10 después de CFA antes del inicio del tratamiento en el día 13 después de CFA con una única inyección i.p. de 0,01 (cuadrado abierto, línea punteada), 1 (triángulo cerrado) y 10 mg/kg (círculo abierto) de anticuerpo anti-TrkA o anticuerpo control isotipo 10 mg/kg (círculo cerrado) seguido de mediciones de carga de peso a 4, 8, 24, 48, 72 y 96 horas después de la dosis (entre paréntesis). Como control positivo, los ratones se trataron con 60 mg/kg de celecoxib dos veces al día (diamante abierto) desde el día 13 en adelante y se midió el peso a 1 y 8 horas después de la dosificación el día 13 después de CFA y luego 1 hora después de la dosificación en los días 14-17 post-CFA.

25 FIG. 6: Anticuerpo humanizado anti-TrkA revierte el dolor osteoartrosico crónico. La hiperalgesia osteoartrosica crónica fue inducida por inyección intraarticular de MIA en una de las articulaciones de la rodilla de la extremidad posterior de ratones AMB1 y medida como la relación en % entre el peso soportado en la extremidad ipsilateral (inyectada) y contralateral (no inyectada) (% ipsi/contra, media \pm sem). Las lecturas que soportan el peso basal (BL) se tomaron inmediatamente antes de la inyección de MIA y el día 3, 7 y 10 días después de MIA antes del inicio del tratamiento en el día 14 post MIA con una única inyección i.p. de 1 (triángulo abierto), 10 (diamante abierto) y 100 μ g/kg (círculo cerrado, línea punteada) del anticuerpo anti-TrkA o anticuerpo control isotipo 10 mg/kg (cuadrado cerrado) (Figura 6A). Como control de comparación, los animales se trataron el día 14 después de MIA con tramadol a 10 mg/kg o pregabalina a 30 mg/kg p.o. seguido de tramadol a 30 mg/kg o pregabalina a 100 mg/kg cada dos días los días 16-22 post-MIA (Figura 6B). Todos los animales se evaluaron utilizando el peso soportado a las 4, 8 y 24 horas después de la dosificación en el día 14 post MIA seguido de cada 24 horas para los grupos tratados con anticuerpo y 1 y 24 horas después de la dosis para los grupos tratados con tramadol y pregabalina.

35 FIG. 7: Anticuerpo humanizado anti-TrkA revierte el dolor neuropático. Fueron inducidas la hiperalgesia neuropática crónica y la alodinia por una lesión de constricción crónica del nervio ciático en ratones AMB1 y fueron medidas como la fuerza umbral requerida para la retirada de la pata (g) y el tiempo de latencia para la retirada de la pata de una placa fría (s), respectivamente. Las lecturas se tomaron antes de la cirugía y 7 días después de la cirugía el día antes del inicio del tratamiento (0 h). Los animales se trataron entonces con una única inyección i.p. de 1000 μ g/kg de anticuerpo de control de isotipo (triángulo cerrado) o 10 (círculo cerrado), 100 (cuadrado cerrado) y 1000 μ g/kg (diamante cerrado) de anticuerpo anti-TrkA. Se administraron pregabalina (triángulo cerrado invertido) a 30 mg/kg/10ml, p.o. o solución salina (círculo abierto) una vez al día durante el periodo de siete días después de la dosis. Las lecturas posteriores a la dosis se registraron a las 4 h, 24 h y luego cada dos días hasta el 7º día después de la dosis. Las lecturas posteriores a la dosis se registraron 1 h después de la administración de pregabalina o solución salina todos los días.

Descripción detallada de la invención

50 La presente descripción se refiere a anticuerpos anti-TrkA humanizados o a fragmentos de los mismos, a métodos para su preparación y uso.

Los términos o expresiones "TrkA", "TrkA humano", "receptor TrkA" o "receptor TrkA humano" se usan en la presente memoria de forma equivalente y significan "TrkA humano" si no se indica específicamente de otra manera. El TrkA humano como se usa en el presente documento incluye variantes, isoformas y homólogos de especies de TrkA humano. Por consiguiente, los anticuerpos de esta descripción pueden, en ciertos casos, reaccionar inespecíficamente con TrkA de especies distintas de la humana. En ciertas realizaciones, los anticuerpos pueden ser completamente específicos para una o más proteínas TrkA humanas y pueden no exhibir especies u otros tipos de reactividad inespecífica no humana.

TrkA también se conoce como receptor del factor de crecimiento nervioso de alta afinidad o receptor neurotrófico de tirosina quinasa tipo TR o proteína transformante de tirosina cinasa TRK1 o receptor de cinasa A o tirosina quinasa

relacionado con la tropomiosina o receptor A de tirosina quinasa o Trk-A o gp140trk o p140-TrkA o MTC o TRK. TrkA es un receptor tirosina quinasa implicado en el desarrollo y la maduración de los sistemas nerviosos central y periférico a través de la regulación de la proliferación, diferenciación y supervivencia de las neuronas simpáticas y nerviosas. TrkA es el receptor de alta afinidad para NGF que es su ligando primario; también puede unirse y ser activado por NTF3/neurotrofina-3.

La secuencia de aminoácidos completa de las cuatro isoformas TrkA humanas conocidas se encuentra bajo el número de acceso P04629 de UniProt/Swiss-Prot (Consortium TU, (2012) Nucleic Acids Res. 40(D1): D71-D5). Las cuatro isoformas se producen por corte y empalme alternativo: la isoforma TrkA-I se encuentra en la mayoría de los tejidos no neuronales (UniProt/Swiss-Prot número de acceso P04629-2), mientras que la isoforma TrkA-II se expresa principalmente en células neuronales (UniProt/Swiss-Prot Número de acceso P04629-1), y la isoforma TrkA-III se expresa específicamente por progenitores de cresta neural y tallo neural pluripotentes (número de acceso UniProt/Swiss-Prot P04629-4). Una cuarta isoforma que difiere de la isoforma TrkA-II en los residuos 1-71 y que carece de los residuos 393 a 398 se conoce como la isoforma 3 (UniProt/Swiss-Prot número de acceso P04629-3). La isoforma TrkA-II es la isoforma más conocida de TrkA. La isoforma TrkA-I tiene una capacidad de respuesta mejorada para la neurotrofina NTF3, mientras que la isoforma TrkA-III es constitutivamente activa y no se une a NGF. En una realización preferida, la isoforma TrkA, como se usa en este documento, es la isoforma TrkA-II con la SEQ ID N°: 72 y una región extracelular de la misma que comprende la secuencia de la SEQ ID N°: 25.

La expresión "anticuerpo anti-TrkA o fragmento del mismo" o "anticuerpo anti-TrkA humanizado o fragmento del mismo", como se usa en el presente documento, incluye anticuerpos o un fragmento del mismo que se une a TrkA humano, por ejemplo el TrkA humano en forma aislada, específicamente anticuerpos o fragmentos del mismo que se unen a la isoforma TrkA-II (SEQ ID NO: 72), más específicamente anticuerpos o fragmentos del mismo que se unen a una forma monovalente de la región extracelular TrkA humana (SEQ ID NO: 25) de la isoforma TrkA-II, con una afinidad (KD) de 500 nM o menos, preferiblemente 350 nM o menos, más preferiblemente 150 nM o menos, incluso más preferiblemente 100 nM o menos, lo más preferido 50 nM o menos, en particular 30 nM o menos. Habitualmente, el anticuerpo anti-TrkA humanizado o fragmento del mismo es capaz de inhibir la activación funcional de TrkA y/o es capaz de bloquear o reducir una o más actividades biológicas que de otro modo serían inducidas por la unión de NGF a TrkA.

Como se usa en el presente documento, un "anticuerpo anti-NGF" se refiere a un anticuerpo que es capaz de unirse a NGF, preferiblemente NGF humano. Habitualmente, el anticuerpo anti-NGF es capaz de inhibir la activación funcional de TrkA y/o es capaz de bloquear o reducir una o más actividades biológicas de TrkA. La afinidad de unión de un anticuerpo anti-NGF a NGF (tal como hNGF) puede ser 500 nM o menos, preferiblemente 100 nM o menos. Habitualmente, el anticuerpo anti-NGF debe presentar una o más de las siguientes características: (a) se une a NGF e inhibe la actividad biológica de NGF y/o las rutas aguas abajo mediadas por la función de señalización de NGF; (b) bloquea o disminuye la activación del receptor de NGF (incluyendo la dimerización y/o autofosforilación del receptor TrkA); (c) aumenta el aclaramiento de NGF; (d) inhibe (reduce) la síntesis, producción o liberación de NGF. Los anticuerpos anti-NGF son conocidos en la técnica, véanse, por ejemplo, las Publicaciones PCT Nos. WO 01/78698, WO 01/64247, patentes de los Estados Unidos números 5.844.092, 5.877.016 y 6.153.189; Hongo et al., (2000) Hybridoma, 19: 215 - 227; Números de acceso de GenBank. U39608, U39609, L17078 o L17077.

La expresión "anticuerpo anti-TrkA humanizado o fragmento del mismo capaz de inhibir la activación funcional de TrkA" como se usa en el presente documento se refiere a anticuerpos anti-TrkA humanizados que exhiben una o más de las siguientes características: (a) se unen a TrkA e inhiben las actividades biológicas y/o rutas posteriores de TrkA mediadas por la unión de NGF o la función de señalización de NTF3/neurotrofina-3; (b) previenen, mejoran o tratan cualquier aspecto del dolor; (c) bloquean o disminuyen la activación de TrkA, o la dimerización y/o autofosforilación; (d) aumentan la eliminación de TrkA; (e) inhiben o reducen la síntesis de TrkA y/o la expresión de la superficie celular.

La expresión "anticuerpo anti-TrkA humanizado o el fragmento del mismo capaz de bloquear o reducir una o más actividades biológicas de TrkA" como se usa en el presente documento se refiere a anticuerpos anti-TrkA humanizados que reducen, inhiben, neutralizan o suprimen directa o indirectamente las actividades biológicas de TrkA.

La expresión "actividades biológicas de TrkA" como se usa en el presente documento se refiere sin limitación a uno cualquiera o más de los siguientes: la capacidad de unirse a NGF u otras neurotrofinas; la capacidad de homodimerizar o hetero-dimerizar y/o autofosforilar; la capacidad de activar una ruta de señalización inducida por NGF; la capacidad de promover la diferenciación celular, proliferación, supervivencia, crecimiento, migración y otros cambios en la fisiología celular, incluyendo (en el caso de las neuronas, incluidas las neuronas periféricas y centrales) cambios en la morfología neuronal, sinaptogénesis, función sináptica, liberación de neurotransmisores y/o neuropéptidos y regeneración después del daño; y la capacidad de mediar el dolor y el dolor asociado con la metástasis ósea.

El término "IC50" como se usa en el presente documento describe la concentración inhibidora mitad máxima (IC50) que es una medida de la eficacia de un compuesto para inhibir la función biológica, p. ej., la inhibición de anticuerpos anti-TrkA humanizados sobre la proliferación de células TF-1 inducidas por NGF.

El término "anticuerpo" como se denomina en la presente memoria incluye anticuerpos de longitud completa y cualquier fragmento de unión a antígeno o cadenas únicas de los mismos. Los anticuerpos, y específicamente los anticuerpos de origen natural, son glicoproteínas que existen como una o más copias de una unidad en forma de Y, compuesta por cuatro cadenas polipeptídicas. Cada forma de "Y" contiene dos copias idénticas de una cadena pesada (H) y dos copias idénticas de una cadena ligera (L), denominadas como tales por sus pesos moleculares relativos. Cada cadena ligera se empareja con una cadena pesada, y cada cadena pesada se empareja con otra cadena pesada. Los enlaces disulfuro intercatenarios covalentes y las interacciones no covalentes unen las cadenas. Los anticuerpos y específicamente los anticuerpos de origen natural contienen regiones variables, que son las dos copias del sitio de unión al antígeno. La papaína, una enzima proteolítica, divide la forma de "Y" en tres moléculas separadas, los dos fragmentos llamados "Fab" (Fab = fragmento de unión al antígeno) y un fragmento llamado "Fc" o "región Fc" (Fc = fragmento cristalizante). Un fragmento Fab consiste en toda la cadena ligera y parte de la cadena pesada. La cadena pesada contiene un dominio variable (dominio variable de cadena pesada o VH) y tres o cuatro dominios constantes (CH1, CH2, CH3 y CH4, dependiendo de la clase de anticuerpo o isotipo). La región entre los dominios CH1 y CH2 se denomina región bisagra y permite la flexibilidad entre los dos brazos de la molécula de anticuerpo con forma de Y, lo que les permite abrirse y cerrarse para acomodar la unión a dos determinantes antigénicos separados por una distancia fija. Las cadenas pesadas de IgA, IgD e IgG tienen cada una cuatro dominios, es decir, un dominio variable (VH) y tres dominios constantes (CH1-3). IgE e IgM tienen un dominio variable y cuatro dominios constantes (CH1-4) en la cadena pesada. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión a tejidos o factores del huésped, que incluyen diversas células del sistema inmune (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) de la vía clásica del sistema del complemento. Cada cadena ligera generalmente está unida a una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente. Cada cadena ligera contiene un dominio variable (dominio variable de cadena ligera o VL) y un dominio constante de cadena ligera. El dominio constante de la cadena ligera es un dominio constante de la cadena ligera kappa designado en este documento como IGKC o es un dominio constante de la cadena ligera lambda designado en este documento como IGLC. IGKC se usa en este documento de manera equivalente a Ck o CK y tiene el mismo significado. IGLC se usa en la presente memoria de forma equivalente a Cl o CL y tiene el mismo significado. La expresión "un dominio IGLC" como se usa en el presente documento se refiere a todos los dominios constantes de cadena ligera lambda, p. ej., a todos los dominios constantes de cadena ligera lambda seleccionados del grupo que consiste en IGLC1, IGLC2, IGLC3, IGLC6 e IGLC7. Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones estructurales (FR o FW o "regiones que no son CDR"). Cada VH y VL está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno.

Los anticuerpos se agrupan en clases, también denominadas isotipos, determinados genéticamente por la región constante. Las cadenas ligeras constantes humanas se clasifican como cadenas ligeras kappa (CK) y lambda (CL). Las cadenas pesadas se clasifican como mu (μ), delta (δ), gamma (γ), alfa (α) o épsilon (ϵ) y definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. De este modo, "isotipo", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquiera de las clases y/o subclases de inmunoglobulinas definidas por las características químicas y antigénicas de sus regiones constantes. Los isotipos de inmunoglobulina humana conocidos son IgG1 (IGHG1), IgG2 (IGHG2), IgG3 (IGHG3), IgG4 (IGHG4), IgA1 (IGHA1), IgA2 (IGHA2), IgM (IGHM), IgD (IGHD) e IgE (IGHE). El denominado gen de IGHGP pseudo-gamma de inmunoglobulina humana representa un gen de la región constante pesada de inmunoglobulina humana adicional que se ha secuenciado pero que no codifica una proteína debido a una región de cambio alterada (Bensmana M et al., *Nucleic Acids Res.* 16(7):3108). A pesar de tener una región de cambio alterada, el gen de IGHGP pseudo-gamma de inmunoglobulina humana tiene marcos de lectura abiertos para todos los dominios constantes pesados (CH1-CH3) y bisagra. Todos los marcos de lectura abiertos para sus dominios pesados constantes codifican dominios de proteína que se alinean bien con todos los dominios constantes de inmunoglobulina humana con las características estructurales previstas. Este isotipo pseudo-gamma adicional se denomina en este documento IgGP o IGHGP. Se han notificado otros genes de pseudo inmunoglobulina, tales como los pseudogenes épsilon P1 y P2 de dominio constante pesado de inmunoglobulina humana (IGHEP1 e IGHEP2). La clase IgG es la más comúnmente utilizada con fines terapéuticos. En seres humanos, esta clase comprende las subclases IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. En ratones, esta clase comprende las subclases IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c e IgG3.

La expresión "anticuerpo quimérico" o "anticuerpo quimérico anti-TrkA", como se usa en el presente documento, incluye anticuerpos en los que las secuencias de la región variable se derivan de una especie y las secuencias de la región constante se derivan de otra especie, tales como un anticuerpo en el que las secuencias de la región variable se derivan de un anticuerpo de ratón y las secuencias de la región constante se derivan de un anticuerpo humano.

La expresión "anticuerpo humanizado" o "anticuerpo anti-TrkA humanizado", como se usa en el presente documento, incluye anticuerpos en los que las secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se han injertado en secuencias estructurales humanas. Se pueden realizar modificaciones de la región flanqueante adicionales dentro de las secuencias flanqueantes humanas así como dentro de las secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero.

El término "Fab" o la expresión "región Fab", como se usa en este documento, incluye los polipéptidos que comprenden los dominios de inmunoglobulina VH, CH1, VL y CL. Fab puede referirse a esta región en aislamiento o esta región en el contexto de un anticuerpo de longitud completa o fragmento de anticuerpo.

5 El término "Fc" o la expresión "región Fc", como se usa en el presente documento, incluyen el polipéptido que comprende la región constante de un anticuerpo que excluye el primer dominio de inmunoglobulina de la región constante. Así, Fc se refiere a los dos últimos dominios de inmunoglobulina de la región constante de IgA, IgD e IgG, y los últimos tres dominios de inmunoglobulina de la región constante de IgE e IgM, y la bisagra flexible N-terminal a estos dominios. Para IgA e IgM, Fc puede incluir la cadena J. Para IgG, Fc comprende los dominios de inmunoglobulina Cy2 y Cy3 y la bisagra entre Cy1 y Cy2. Aunque los límites de la región Fc puedan variar, la región Fc de la cadena pesada de IgG humana se define habitualmente que comprende los restos C226 o P230 a su extremo carboxilo, en donde la numeración está de acuerdo con el sistema de numeración de la UE (Edelman GM et al., (1969) PNAS USA 63 (1): 78-85). Para la IgG1 humana, la región Fc se define en la presente memoria que comprende el residuo P232 a su extremo carboxilo, en el que la numeración se realiza de acuerdo con el sistema de numeración de la UE. Fc puede referirse a esta región aisladamente o a esta región en el contexto de un polipéptido Fc, por ejemplo, un anticuerpo.

20 El término "bisagra" o la expresión "región bisagra" o "región bisagra del anticuerpo" en este documento incluye el polipéptido flexible que comprende los aminoácidos entre los dominios constantes primero y segundo de un anticuerpo. La "región bisagra" a la que se hace referencia en la presente memoria es una región de secuencia de 6-62 aminoácidos de longitud, solo presente en IgA, IgD e IgG, que abarca los restos de cisteína que unen las dos cadenas pesadas. Estructuralmente, el dominio IgG CH1 termina en la posición 220 de UE, y el dominio CH2 de IgG comienza en la posición UE residual 237. Por tanto, para la IgG, la bisagra del anticuerpo se define en este documento que incluye las posiciones de 221 (D221 en IgG1) a 231 (A231 en IgG1), en donde la numeración es de acuerdo con el sistema de numeración de la UE.

25 Las expresiones "anticuerpo parental", "inmunoglobulina precursora", "anticuerpo parental" o "inmunoglobulina progenitora", que se usan de manera equivalente en la presente memoria, incluyen un anticuerpo no modificado que se modifica posteriormente para generar una variante. Dicho anticuerpo parental puede ser un anticuerpo de origen natural o una variante o versión modificada de un anticuerpo de origen natural. El anticuerpo parental puede referirse al propio anticuerpo, composiciones que comprenden el anticuerpo parental o la secuencia de aminoácidos que lo codifica. Por "anticuerpo murino parental" o "anticuerpo murino parental correspondiente", como se usa en el presente documento, se entiende un anticuerpo o inmunoglobulina que se une a TrkA humano y se modifica para generar una variante, específicamente el anticuerpo murino MNAC13 como se describe en el documento WO00/73344.

35 La expresión "anticuerpo variante" o "variante de anticuerpo", como se usa en el presente documento, incluye una secuencia de anticuerpo que difiere de la de una secuencia de anticuerpo parental en virtud de al menos una modificación de aminoácido en comparación con el parental. La secuencia de anticuerpo variante en la presente memoria poseerá preferiblemente al menos aproximadamente 80%, lo más preferiblemente al menos aproximadamente 90%, más preferiblemente al menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de anticuerpo parental. La variante de anticuerpo puede referirse al propio anticuerpo, composiciones que comprenden la variante de anticuerpo o la secuencia de aminoácidos que lo codifica.

40 La expresión "modificación de aminoácidos" en la presente memoria incluye una sustitución, inserción y/o delección de aminoácidos en una secuencia polipeptídica. Por "sustitución de aminoácidos" o "sustitución" en la presente memoria se entiende la sustitución de un aminoácido en una posición particular en una secuencia polipeptídica parental con otro aminoácido. Por ejemplo, la sustitución R94K se refiere a un polipéptido variante, en este caso una variante de la región marco variable de cadena pesada, en el que la arginina en la posición 94 se reemplaza por una lisina. Para el ejemplo anterior, 94K indica la sustitución de la posición 94 por una lisina. Para los fines del presente documento, las sustituciones múltiples están típicamente separadas por una barra oblicua. Por ejemplo, R94K/L78V se refiere a una variante doble que comprende las sustituciones R94K y L78V. Por "inserción de aminoácido" o "inserción", como se usa en el presente documento, se entiende la adición de un aminoácido en una posición particular en una secuencia polipeptídica parental. Por ejemplo, inserto-94 designa una inserción en la posición 94. Por "delección de aminoácido" o "delección", como se usa en el presente documento, se entiende la eliminación de un aminoácido en una posición particular en una secuencia polipeptídica parental. Por ejemplo, R94- designa la eliminación de arginina en la posición 94.

55 Como se usa en este documento, la expresión "modificaciones conservativas" o "modificaciones de secuencia conservativas" pretende referirse a modificaciones de aminoácidos que no afectan o alteran significativamente las características de unión del anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos. Tales modificaciones conservativas incluyen sustituciones, inserciones y delecciones de aminoácidos. Se pueden introducir modificaciones en un anticuerpo de la invención mediante técnicas estándar conocidas en la técnica, tales como mutagénesis dirigida a sitio y mutagénesis mediada por PCR. Las sustituciones de aminoácidos conservativas son aquellas en las que el resto de aminoácido se reemplaza por un resto de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares se han definido en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (p. ej., lisina, arginina, histidina), cadenas laterales

ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (p. ej., glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (p. ej., alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales beta-ramificadas (p. ej., treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (p. ej., tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por lo tanto, uno o más residuos de aminoácidos dentro de las regiones CDR o dentro de las regiones marco de un anticuerpo de la invención pueden reemplazarse por otros restos de aminoácidos de la misma familia de la cadena lateral y el anticuerpo alterado (anticuerpo variante) puede analizarse por la función conservada.

Para todos los dominios constantes de la cadena pesada de inmunoglobulina humana, la numeración está de acuerdo con el "sistema de numeración de la UE" (Edelman GM et al, *ibid.*). Para el dominio constante de la cadena ligera de inmunoglobulina kappa humana (IGKC), la numeración es de acuerdo con el "sistema de numeración UE" (Edelman GM et al., *ibid.*). Para los dominios constantes de la cadena ligera de inmunoglobulina lambda humana (IGLC1, IGLC2, IGLC3, IGLC6 e IGLC7), la numeración es de acuerdo con el "sistema de numeración de Kabat" (Kabat EA et al., (1991) *Sequences of proteins of immunological interest*. 5ª Edición - Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE.UU., Publicación NIH n° 91-3242) según lo descrito por Dariavach P et al, (1987) *PNAS USA* 84 (24): 9074-8 y Frangione B et al., (1985) *PNAS USA* 82 (10): 3415-9.

La expresión "dominio variable" se refiere a los dominios que median la unión al antígeno y define la especificidad de un anticuerpo particular para un antígeno particular. En los anticuerpos naturales, el sitio de unión al antígeno consiste en dos dominios variables que definen la especificidad: uno ubicado en la cadena pesada, denominado dominio variable de la cadena pesada (VH) y el otro ubicado en la cadena ligera, denominado dominio variable de la cadena ligera (VL). En algunos casos, la especificidad puede residir exclusivamente en solo uno de los dos dominios como en los anticuerpos de dominio único de los anticuerpos de cadena pesada encontrados en camélidos. Las regiones V tienen generalmente aproximadamente 110 aminoácidos de longitud, y consisten en tramos de secuencias de aminoácidos relativamente invariantes llamados regiones marco (regiones FR o "no CDR") de 15-30 aminoácidos separados por regiones más cortas de variabilidad extrema llamadas "regiones hipervariables", que tienen 7-17 aminoácidos de largo. Los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cuatro FR, que adoptan en gran parte una configuración de hoja beta, conectadas por tres regiones hipervariables, que forman bucles. Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen juntas muy cerca por las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat EA et al., *ibid.*). La expresión "región hipervariable", como se usa en el presente documento, se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión del antígeno. La región hipervariable generalmente comprende residuos de aminoácidos de una "región determinante complementaria" o "CDR", siendo la última de la mayor variabilidad de secuencia y/o estando implicada en el reconocimiento del antígeno. Para todos los dominios variables, la numeración es de acuerdo con Kabat (Kabat EA et al., *ibid.*).

Varias definiciones de CDR están en uso y están incluidas en este documento. La definición de Kabat se basa en la variabilidad de secuencia y es la más utilizada (Kabat EA et al., *ibid.*). Chothia se refiere en cambio a la ubicación de los bucles estructurales (Chothia & Lesk J. (1987) *Mol. Biol.* 196:901-917). La definición de AbM es un compromiso entre las definiciones de Kabat y Chothia y es utilizada por el software de modelado de anticuerpos AbM de Oxford Molecular (Martin ACR et al, (1989) *PNAS USA* 86: 9268-9272; Martin ACR et al, (1991) *Methods Enzymol.* 203: 121-153; Pedersen JT et al., (1992) *Immunomethods* 1: 126 - 136; Rees AR et al., (1996) en Sternberg M.J.E. (ed.), *Protein Structure Prediction*. Oxford University Press, Oxford, 141-172). La definición de contacto se ha introducido recientemente (MacCallum RM et al., (1996) *J. Mol. Biol.* 262: 732-745) y se basa en un análisis de las estructuras complejas disponibles, disponibles en Protein Databank. La definición de la CDR por IMGT®, el sistema de información internacional ImMunoGenetics® (<http://www.imgt.org>) se basa en la numeración IMGT para todas las regiones V de inmunoglobulinas y del receptor de células T de todas las especies (IMGT®, sistema de información internacional ImMunoGenetics®; Lefranc MP et al., (1999) *Nucleic Acids Res.* 27(1): 209-12; Ruiz M et al, (2000) *Nucleic Acids Res.* 28(1): 219-21; Lefranc MP (2001) *Nucleic Acids Res.* 29 (1): 207 - 9; Lefranc MP (2003) *Nucleic Acids Res.* 31(1): 307-10; Lefranc MP et al., (2005) *Dev. Comp. Immunol.* 29(3): 185-203; Kaas Q et al, (2007) *Briefings in Functional Genomics & Proteomics*, 6 (4): 253-64).

Todas las Regiones de Determinación de Complementariedad (CDR) a las que se hace referencia en la presente invención, se definen preferiblemente de la siguiente manera (numeración según Kabat EA et al., *ibid.*): LCDR1: 24-34; LCDR2: 50-56; LCDR3: 89-98; HCDR1: 26-35; HCDR2: 50-65; HCDR3: 95-102. Las "regiones no CDR" del dominio variable se conocen como regiones marco (FR). Las "regiones que no son CDR" de la región VL como se usan en este documento comprenden las secuencias de aminoácidos: 1-23 (FR1), 35-49 (FR2), 57-88 (FR3) y 99-107 (FR4). Las "regiones no CDR" de la región VH tal como se usan en la presente memoria comprenden las secuencias de aminoácidos: 1-25 (FR1), 36-49 (FR2), 66-94 (FR3) y 103-113 (FR4).

La expresión "anticuerpo de longitud completa", como se usa en el presente documento, incluye la estructura que constituye la forma biológica natural de un anticuerpo, que incluye regiones variables y constantes. Por ejemplo, en la mayoría de los mamíferos, incluidos humanos y ratones, el anticuerpo de longitud completa de la clase IgG es un tetrámero y consta de dos pares idénticos de dos cadenas de inmunoglobulina, cada par tiene una cadena ligera y una cadena pesada, cada cadena ligera comprende dominios de inmunoglobulina VL y CL y cada cadena pesada comprende los dominios de inmunoglobulina VH, CH1 (C_{yl}), CH2 (C_{y2}) y CH3 (C_{y3}). En algunos mamíferos, por

ejemplo, en camellos y llamas, los anticuerpos IgG pueden consistir en solo dos cadenas pesadas, cada cadena pesada que comprende un dominio variable unido a la región Fc.

Los fragmentos de anticuerpos, como se usan en la presente memoria que se refieren a fragmentos de unión a antígeno, incluyen, pero no se limitan a, (i) el fragmento Fab que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1, incluyendo Fab' y Fab'-SH, (ii) el fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1, (iii) el fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un solo anticuerpo; (iv) el fragmento dAb (Ward et al. (1989) Nature 341: 544-546) que consiste en un solo dominio variable, (v) fragmentos F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos (vi) moléculas Fv monocatenarias (scFv), en donde un dominio VH y un dominio VL están unidos por un enlazador peptídico que permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de unión a antígeno (Bird et al. (1988) Science 242: 423 - 426; Huston et al. (1988) PNAS USA 85: 5879-5883), (vii) dímeros de Fv de cadena única biespecíficos (documento PCT/US92/09965), (viii) "diacuerpos" o "triacuerpos", fragmentos multivalentes o multiespecíficos contruidos por fusión génica (Tomlinson I et al., (2000) Methods Enzymol. 326:461-479; documento WO94/13804; Holliger et al., (1993) PNAS USA 90: 6444-6448) y (ix) scFv genéticamente fusionados con el mismo anticuerpo o uno diferente (Coloma & Morrison (1997) Nature Biotech. 15: 159-163).

La expresión "función efectora", como se usa en el presente documento, incluye un evento bioquímico que resulta de la interacción de una región Fc del anticuerpo con un receptor o ligando Fc. Las funciones efectoras incluyen funciones efectoras mediadas por FcγR tales como ADCC (citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos) y ADCP (fagocitosis mediada por células dependientes de anticuerpos) y funciones efectoras mediadas por complemento tales como CDC (citotoxicidad dependiente del complemento). Una función efectora de un anticuerpo puede alterarse alterando, es decir, mejorando o reduciendo, preferiblemente potenciando, la afinidad del anticuerpo por una molécula efectora tal como un receptor de Fc o un componente de complemento. La afinidad de unión generalmente variará modificando el sitio de unión de la molécula efectora y en este caso es apropiado localizar el sitio de interés y modificar al menos parte del sitio de una manera adecuada. También se prevé que una alteración en el sitio de unión del anticuerpo para la molécula efectora no necesita alterar significativamente la afinidad global de unión, pero puede alterar la geometría de la interacción haciendo que el mecanismo efector sea ineficaz como en la unión no productiva. Se prevé además que una función efectora también se pueda alterar modificando un sitio que no esté directamente implicado en la unión de la molécula efectora, pero involucrado de otro modo en la realización de la función efectora. Al alterar una función efectora de un anticuerpo, puede ser posible controlar diversos aspectos de la respuesta inmune, por ejemplo, potenciando o suprimiendo diversas reacciones del sistema inmune, con posibles efectos beneficiosos en el diagnóstico y la terapia.

Como se usa en el presente 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, ovejas, perros, gatos, caballos, vacas, pollos, anfibios, reptiles, etc. Preferiblemente el sujeto es un ser humano.

Anticuerpos de la invención

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-TrkA humanizado o fragmento del mismo que comprende:

a) un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 1-5, y

b) un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 6-13,

en donde CDR2 del dominio variable de la cadena pesada comprende al menos una sustitución de aminoácido y/o en el que la región no CDR del dominio variable de la cadena pesada comprende una sustitución de aminoácido en una posición de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en 37, 42 y 89, en donde la posición del aminoácido de cada miembro del grupo se indica utilizando el sistema de numeración establecido en Kabat.

En algunas realizaciones, la CDR2 del dominio variable de la cadena pesada comprende al menos una sustitución de aminoácido conservativa.

En algunas realizaciones, la región no CDR del dominio variable de la cadena pesada comprende una sustitución de aminoácido conservativa en una posición de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en 37, 42 y 89.

En algunas realizaciones, la CDR2 del dominio variable de la cadena pesada comprende la secuencia de SEQ ID NO: 15.

En algunas realizaciones, el dominio variable de la cadena pesada comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 1, 3 y 5, y el dominio variable de la cadena ligera comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 6 y 8.

- 5 En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-TrkA humanizado o fragmento del mismo comprende una combinación de un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 3 y SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 3 y SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 5 y SEQ ID N° 6, y SEQ ID N° 5 y SEQ ID N° 8; preferiblemente las secuencias de SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6 o las secuencias de SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 8; más preferiblemente las secuencias de SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6.
- 10 En algunas realizaciones, el dominio variable de cadena pesada del anticuerpo anti-TrkA humanizado o fragmento del mismo proporcionado por la presente descripción no comprende la secuencia de SEQ ID NO: 71.
- 15 En algunas realizaciones, el dominio variable de cadena pesada del anticuerpo anti-TrkA humanizado o fragmento del mismo proporcionado por la presente descripción comprende una treonina en la posición 87, en donde la posición de aminoácido de cada miembro del grupo se indica utilizando el sistema de numeración establecido en Kabat.
- 20 En algunas realizaciones, la sustitución de aminoácido de la CDR2 del dominio variable de la cadena pesada comprende una sustitución de aminoácido en una posición de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en 50, 60 y 62, preferiblemente seleccionada del grupo que consiste en 60 y 62, en donde la posición de aminoácido de cada miembro de grupo se indica utilizando el sistema de numeración establecido en Kabat.
- 25 En algunas realizaciones, la sustitución de aminoácidos de la CDR2 del dominio variable de la cadena pesada no comprende una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en Y50A, P60A y T62S, en donde la posición de aminoácidos de cada miembro del grupo se indica utilizando el sistema de numeración establecido en Kabat.
- 30 En algunas realizaciones, si la sustitución de aminoácido del anticuerpo o fragmento anti-TrkA humanizado en la región no CDR del dominio variable de cadena pesada es A49S, la sustitución de aminoácido del anticuerpo o fragmento anti-TrkA humanizado en el CDR2 del dominio variable de la cadena pesada no es Y50A.
- 35 En algunas realizaciones, la sustitución de aminoácido del anticuerpo o fragmento anti-TrkA humanizado en la región no CDR del dominio variable de cadena pesada no es A49S y/o la sustitución de aminoácido del anticuerpo o fragmento anti-TrkA humanizado en el CDR2 del dominio variable de la cadena pesada no es Y50A.
- 40 En algunas realizaciones, la sustitución de aminoácidos de la región no CDR del dominio variable de cadena pesada del anticuerpo o el fragmento de la misma comprende una sustitución de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en V37A, G42E y V89L, preferiblemente V37A, en donde la posición del aminoácido se indica utilizando el sistema de numeración establecido en Kabat.
- 45 En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 3, en donde la sustitución de aminoácido de la región no CDR del dominio variable de cadena pesada comprende una sustitución de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en V37A, T40A, G42E, R44G, A49S y V89L, preferiblemente seleccionadas del grupo que consiste en V37A, T40A, G42E, R44G y V89L en donde la posición del aminoácido de cada miembro del grupo se indica utilizando el sistema de numeración establecido en Kabat.
- 50 En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una combinación de un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias de SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 6 o que comprende las secuencias de SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 8, en donde la sustitución de aminoácidos de la región no CDR del dominio variable de la cadena pesada comprende una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en V37A, T40A, G42E, R44G, A49S y V89L, preferiblemente seleccionadas del grupo que consiste en V37A, T40A, G42E, R44G y V89L, en donde la posición de aminoácido de cada miembro del grupo se indica utilizando el sistema de numeración establecido en Kabat.
- 55 En algunas realizaciones, la sustitución de aminoácidos de la región no CDR del dominio variable de la cadena pesada comprende una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en K3Q, V37A, G42E, A49S, V89L y R94K, preferiblemente seleccionadas del grupo que consiste en K3Q, V37A, G42E, V89L y R94K, más preferiblemente comprende las sustituciones de aminoácidos K3Q y V37A y lo más preferiblemente comprende la sustitución de aminoácidos V37A, en donde la posición de aminoácido de cada miembro de grupo se indica utilizando el sistema de numeración establecido en Kabat. Igualmente, las más preferidas son realizaciones en las que la sustitución de aminoácidos de la región no CDR del dominio variable de la cadena pesada comprende una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en V37A y K3Q, V37A y en donde la posición del aminoácido de cada miembro del grupo está indicada utilizando el sistema de numeración establecido en Kabat.

5 En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 5, en donde la sustitución de aminoácido de la región no CDR del dominio variable de la cadena pesada comprende una sustitución de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en K3Q, V37A, G42E, A49S, V89L y R94K, preferiblemente seleccionadas del grupo que consiste en K3Q, V37A, G42E, V89L y R94K, más preferiblemente comprende las sustituciones de aminoácidos K3Q y V37A y lo más preferiblemente comprende la sustitución de aminoácidos V37A, en donde la posición del aminoácido de cada miembro del grupo se indica utilizando el sistema de numeración establecido en Kabat. Igualmente las más preferidas son las realizaciones en las que el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 5, en donde la sustitución de aminoácidos de la región no CDR del dominio variable de cadena pesada comprende una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en V37A y K3Q, V37A y en donde la posición del aminoácido de cada miembro de grupo se indica utilizando el sistema de numeración establecido en Kabat.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-TrkA humanizado o fragmento del mismo que comprende:

- 15 a) un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 31-49, y
- b) un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 6-13.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-TrkA humanizado o fragmento del mismo comprende:

- 20 a) un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 32, 36, 39, 43, 48 y 49, y
- b) un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 6-13 o seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 6 y 8.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-TrkA humanizado o fragmento del mismo comprende:

- 25 a) un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 32, 36, 48 y 49 y
- b) un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 8.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-TrkA humanizado o fragmento del mismo comprende:

- 30 a) un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 32 y 36, y
- b) un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 6.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-TrkA humanizado o fragmento del mismo comprende:

- a) un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NOs: 36, y
- b) un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 6.

- 35 En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-TrkA humanizado comprende una combinación de un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera seleccionado del grupo que comprende las secuencias de SEQ ID NO: 32 y SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 32 y SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 36 y SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 48 y SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 49 y SEQ ID N° 6 y SEQ ID N° 49 y SEQ ID NO: 8, preferiblemente seleccionada del grupo que comprende las secuencias de SEQ ID NO: 32 y SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 32 y SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 36 y SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 49 y SEQ ID NO: 6, y SEQ ID NO: 49 y SEQ ID NO: 8, lo más preferiblemente seleccionadas de la combinación de secuencias de SEQ ID NO: 36 y SEQ ID NO: 6.

45 En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-TrkA humanizado o fragmento del mismo comprende además regiones constantes pesadas y/o ligeras, preferiblemente regiones constantes pesadas y/o ligeras y una región bisagra. Preferiblemente, las regiones constantes pesadas son de origen humano y son, p. ej., del isotipo humano IgG1 (IGHG1), IgG2 (IGHG2), IgG3 (IGHG3), IgG4 (IGHG4), IgA1 (IGHA1), IgA2 (IGHA2), IgM (IGHM), IgD (IGHD) o IgE (IGHE). Más preferiblemente, las regiones constantes pesadas son del isotipo IGHG1 humano o son del isotipo humano IGHG4. Preferiblemente, las regiones ligeras constante son de origen humano y son dominios constantes ligeros kappa (CK) humanos o lambda (Cλ) humanos, preferiblemente un dominio constante ligero kappa humano.

50 En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-TrkA humanizado o fragmento del mismo comprende además regiones constantes pesadas y/o ligeras y una región bisagra, en donde la región constante pesada y la región bisagra son del isotipo IGHG1 humano o son del isotipo humano IGHG4.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-TrkA humanizado o fragmento del mismo comprende además regiones constantes pesadas y/o ligeras y una región bisagra, en donde la región constante pesada y la región bisagra son del isotipo humano IGHG4 y en donde la región bisagra comprende la sustitución de aminoácidos S228P, en donde la posición del aminoácido se indica utilizando el sistema de numeración de la UE.

5 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-TrkA humanizado o fragmento del mismo que comprende:

a) una cadena pesada que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 50 a 70, y

10 b) una cadena ligera que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 29 y 30.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-TrkA humanizado o fragmento del mismo comprende:

a) una cadena pesada que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 51, 52, 56, 57, 60, 64, 69 y 70, y

15 b) una cadena ligera que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 29 y 30, preferiblemente SEQ ID NO: 29.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-TrkA humanizado o fragmento del mismo comprende:

a) una cadena pesada que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 51, 52, 56, 57, 69 y 70, y

20 b) una cadena ligera que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 29 y 30, preferiblemente SEQ ID NO: 29.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-TrkA humanizado o fragmento del mismo comprende:

a) una cadena pesada que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 51, 52, 56, 57 y 70, y

25 b) una cadena ligera que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 29 y 30, preferiblemente SEQ ID NO: 29.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-TrkA humanizado o fragmento del mismo comprende:

a) una cadena pesada que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 51, 52, 56 y 57, y

30 b) una cadena ligera que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 29 y 30, preferiblemente SEQ ID NO: 29.

En una realización preferida, el anticuerpo anti-TrkA humanizado o fragmento del mismo comprende:

a) una cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 57, y

b) una cadena ligera que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 29.

35 En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-TrkA humanizado o fragmento del mismo es un anticuerpo de longitud completa.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-TrkA humanizado o fragmento del mismo es un fragmento de anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en Fab, Fab', Fab'-SH, Fd, Fv, dAb, F(ab')₂, scFv, dímeros Fv de cadena única biespecífica, diacuerpos, triacuerpos y scFv genéticamente fusionados al mismo anticuerpo o a un anticuerpo diferente; preferiblemente un scFv, o un Fab; más preferiblemente un dímero scFv o un diacuerpo o un F(ab')₂.

40 En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-TrkA humanizado o fragmento del mismo comprende una región Fc variante que comprende al menos una modificación de aminoácido relativa a la región Fc del anticuerpo parental, mientras que el anticuerpo que comprende la región Fc variante exhibe función efectora alterada en comparación con el anticuerpo parental.

45 La modificación de aminoácidos dentro de la región Fc típicamente altera una o más propiedades funcionales del anticuerpo, tales como la semivida en suero, la fijación del complemento, la función efectora relacionada con el receptor de Fc o la unión del ligando, y/o la citotoxicidad celular dependiente de antígeno.

Las modificaciones dentro de la región Fc como se detalla a continuación están de acuerdo con la numeración de residuos de la UE en la región Fc. En una realización, la región bisagra de CH1 se modifica de manera que el número de residuos de cisteína en la región bisagra se altera, por ejemplo, aumenta o disminuye. Este enfoque se describe adicionalmente en la Patente de Estados Unidos N° 5.677.425 de Bodmer et al. El número de residuos de cisteína en la región bisagra de CH1 se altera para, por ejemplo, facilitar el ensamblaje de las cadenas ligeras y pesadas o aumentar o disminuir la estabilidad del anticuerpo. En otra realización, la región bisagra de Fc de un anticuerpo está mutada para disminuir la semivida biológica del anticuerpo. Más específicamente, se introducen una o más mutaciones de aminoácidos en la región de la interfaz del dominio CH2-CH3 del fragmento de bisagra de Fc de manera que el anticuerpo tiene un enlace de proteína A de estafilocócico (SpA) deteriorado con respecto a la unión de SpA del dominio de bisagra Fc nativo. Este enfoque se describe con más detalle en la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.165.745 de Ward et al. En otra realización, el anticuerpo se modifica para aumentar su semivida biológica. Varios enfoques son posibles. Por ejemplo, se pueden introducir una o más de las siguientes mutaciones: T252L, T254S, T256F, como se describe en la patente de los Estados Unidos N° 6.277.375 de Ward.

Alternativamente, para aumentar la semivida biológica, el anticuerpo puede alterarse dentro de la región CH1 o CL para contener un epítipo de unión al receptor de rescate tomado de dos bucles de un dominio CH2 de una región Fc de una IgG, como se describe en las patentes de EE.UU. Nos. 5.869.046 y 6.121.022 de Presta et al. En una realización adicional, una región Fc se altera reemplazando al menos un resto de aminoácido con un residuo de aminoácido diferente para alterar la función o funciones efectoras del anticuerpo. Por ejemplo, uno o más aminoácidos seleccionados de los residuos de aminoácidos 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 y 322 pueden reemplazarse por un resto de aminoácido diferente de modo que el anticuerpo tenga una afinidad alterada por un ligando efector pero conserve la capacidad de unión al antígeno del anticuerpo original. El ligando efector al que se modifica la afinidad puede ser, por ejemplo, un receptor de Fc o el componente de C1 del complemento. Este enfoque se describe con más detalle en las patentes U.S. núms. 5.624.821 y 5.648.260, ambas de Winter et al. En otro ejemplo, uno o más aminoácidos seleccionados de los residuos de aminoácidos 329, 331 y 322 pueden reemplazarse con un residuo de aminoácido diferente de manera que el anticuerpo tenga alterada la unión de C1q y/o reducida o suprimida la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Este enfoque se describe con más detalle en la patente de Estados Unidos número 6.194.551 de Idusogie et al. En otro ejemplo, uno o más residuos de aminoácidos dentro de las posiciones de aminoácidos 231 a 238 en la región N-terminal del dominio CH2 se alteran para alterar así la capacidad del anticuerpo para fijar el complemento. Este enfoque se describe adicionalmente en la Publicación PCT WO 94/29351 de Bodmer et al. En otro ejemplo más, la región Fc se modifica para aumentar la capacidad del anticuerpo para mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o para aumentar la afinidad del anticuerpo por un receptor Fcγ modificando uno o más aminoácidos en las siguientes posiciones: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 236, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 ó 439. Este enfoque se describe con más detalle en la publicación PCT WO 00/42072 de Presta. Además, un anticuerpo de la invención puede modificarse químicamente (por ejemplo, uno o más restos químicos se pueden unir al anticuerpo) o modificarse para alterar su glucosilación.

Propiedades de los anticuerpos de la invención

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-TrkA humanizado o fragmento del mismo es capaz de inhibir la activación funcional de TrkA.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-TrkA humanizado es capaz de bloquear o reducir una o más actividades biológicas de TrkA.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-TrkA humanizado o fragmento del mismo se une a TrkA humano con una afinidad (KD) de 500 nM o menos, preferiblemente 350 nM o menos, más preferiblemente 150 nM o menos, incluso más preferiblemente 100 nM o menos, lo más preferiblemente 50 nM o menos, en particular 30 nM o menos, por ejemplo, medido por Resonancia de Plasmón Superficie (SPR) utilizando un instrumento BIAcore 2000 (GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Suiza) o un instrumento equivalente conocido en la técnica mediante la captura del anticuerpo en el chip sensor del instrumento con un dominio extracelular recombinante de TrkA humano monovalente (SEQ ID NO: 25) utilizado como analito. "Monovalente", como se usa en este documento en relación a las mediciones de afinidad usando el receptor TrkA, se refiere a un dominio del receptor TrkA humano, como el dominio extracelular TrkA humano que no está dimerizado o multimerizado artificialmente como lo sería, p. ej., si el dominio se fusionara en el extremo amino con una porción de Fc de inmunoglobulina, o que no se dimeriza de forma natural como lo sería, p. ej., si el dominio estuviera asociado con su ligando natural NGF.

Ensayos estándar para evaluar la capacidad de unión de los anticuerpos hacia, p. ej. los TrkA humanos son conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, ELISA, BIAcore, Western blots, RIA y análisis de citometría de flujo. Los ensayos adecuados se describen en detalle en los Ejemplos. La cinética de unión (por ejemplo, la afinidad de unión como K_D) de los anticuerpos también puede evaluarse mediante ensayos convencionales conocidos en la técnica, tales como el análisis del sistema Scatchard o Biacore®. La afinidad de unión relativa K_i puede evaluarse mediante ensayos de competición estándar conocidos en la técnica. Los anticuerpos anti-TrkA modificados por ingeniería genética pueden analizarse en cuanto a su capacidad para inhibir la activación funcional de TrkA en

ensayos de proliferación celular TF-1. La concentración máxima inhibitoria mitad (IC50) que es una medida de la eficacia de un compuesto para inhibir la función biológica se puede usar para seleccionar anticuerpos preferidos.

5 En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-TrkA humanizado o fragmento del mismo tiene al menos una CI50 equivalente o inferior en un ensayo de proliferación celular TF-1 que el anticuerpo murino parental correspondiente, p. ej., medido por la capacidad del anticuerpo para bloquear la proliferación celular mediada por TrkA/beta-NGF de la superficie celular utilizando la línea celular eritroleucémica TF-1 humana dependiente de factor (Kitamura T et al., (1989) J. Cellular Physiology 140 (2): 323-34). Preferiblemente, el anticuerpo anti-TrkA humanizado o fragmento del mismo tiene una CI50 en un ensayo de proliferación celular TF-1 de 1 µg/ml o menos, más preferiblemente de 0,75 µg/ml, incluso más preferiblemente de 0,5 µg/ml o menos, lo más preferiblemente de 0,3 µg/ml o menos, en particular de 0,1 µg/ml o menos.

10 En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-TrkA humanizado o fragmento del mismo tiene una temperatura de termoestabilidad del fragmento FAB superior a 65°C, preferiblemente superior a 70°C. Para el análisis de la termoestabilidad del fragmento FAB, se utilizan mediciones de calorimetría diferencial de barrido, mientras que se identifica una temperatura de fusión en el punto medio del fragmento FAB en el contexto de una IgG de longitud completa. Este tipo de mediciones colorimétricas son conocidas por los expertos en la materia y se pueden llevar a cabo de acuerdo con, por ejemplo, Garber & Demarest (2007) BBRC 355: 751-7. Sorprendentemente, se ha encontrado que el anticuerpo humanizado de la presente invención tiene una temperatura de termoestabilidad del fragmento FAB equivalente a la temperatura de termoestabilidad del fragmento FAB del anticuerpo murino parental mientras que tiene una afinidad equivalente medida por SPR y una potencia mejorada medida por el ensayo de proliferación de células TF-1. Por lo tanto, la presente descripción también proporciona un anticuerpo anti-TrkA humanizado que tiene una temperatura de termoestabilidad de fragmento FAB que es equivalente a la temperatura de termoestabilidad del fragmento FAB del anticuerpo murino parental con una afinidad equivalente para TrkA humano y propiedades inhibitorias mejoradas.

15 "Equivalente a la temperatura de termoestabilidad del fragmento FAB del anticuerpo murino parental", como se usa en este documento, significa en este contexto que el anticuerpo anti-TrkA humanizado o fragmento del mismo tiene una temperatura de termoestabilidad de fragmento FAB que está dentro de un intervalo de $\pm 20\%$, preferiblemente dentro de un intervalo de $\pm 15\%$, más preferiblemente dentro de un intervalo de $\pm 10\%$, incluso más preferiblemente dentro de un intervalo de $\pm 5\%$ de la temperatura de termoestabilidad del fragmento FAB del anticuerpo murino parental. Preferiblemente, el anticuerpo humanizado de la presente invención tiene una temperatura de termoestabilidad del fragmento FAB de no más de 15% menos que la temperatura de termoestabilidad del fragmento FAB del anticuerpo murino parental.

20 "Afinidad equivalente para TrkA humano", como se usa en este documento, significa en este contexto que el anticuerpo anti-TrkA humanizado o fragmento del mismo tiene una afinidad que está dentro de un intervalo de $\pm 20\%$, preferiblemente dentro de un intervalo de $\pm 15\%$, más preferiblemente dentro de un intervalo de $\pm 10\%$ del anticuerpo murino parental. Preferiblemente, el anticuerpo humanizado de la presente invención tiene una K_D que es al menos un 5%, preferiblemente al menos un 10% inferior a la K_D del anticuerpo murino parental.

25 La presente invención también proporciona un anticuerpo anti-TrkA humanizado o un fragmento del mismo que puede usarse para tratar el dolor.

30 El efecto de un anticuerpo anti-TrkA humanizado se ensayó en ratones que padecían hiperalgesia inflamatoria aguda inducida por inyección intraplantar de adyuvante de Freund completo (CFA) en la pata trasera (véase el Ejemplo 2). La administración del anticuerpo humanizado anti-TrkA a una dosis de 0,01 mg/kg o superior produjo una reversión significativa de la hiperalgesia, que fue similar a la observada con la NSAID indometacina.

35 El efecto de un anticuerpo anti-TrkA humanizado se ensayó en ratones que padecían hiperalgesia inflamatoria crónica inducida por inyección intraarticular de CFA en la articulación de la rodilla (véase el Ejemplo 3). La administración del anticuerpo anti-TrkA humanizado a una dosis única de 0,01 mg/kg o superior produjo una reversión significativa de la hiperalgesia, que fue comparable a la observada con la dosificación múltiple del celecoxib NSAID selectivo para COX-2.

40 El efecto de un anticuerpo anti-TrkA humanizado se probó en ratones que padecían hiperalgesia osteoartrítica crónica inducida por inyección intraarticular de yodoacetato monosódico (MIA) en la articulación de la rodilla (véase el Ejemplo 4). La administración del anticuerpo anti-TrkA humanizado en una dosis única de 0,01 mg/kg o superior produjo una reversión significativa de la hiperalgesia, que fue comparable a la observada con la dosificación múltiple del opiáceo tramadol y pregabalina.

45 El efecto de un anticuerpo anti-TrkA humanizado se probó en ratones que padecían dolor neuropático inducido por la constricción crónica del nervio ciático (modelo CCI; véase el Ejemplo 5). La administración del anticuerpo humanizado anti-TrkA a una dosis única de 0,01 mg/kg o superior produjo una reversión significativa de la hiperalgesia mecánica y alodinia de frío, que a la dosis más alta probada, 1 mg/kg, fue comparable a la observada con dosis múltiples de pregabalina.

Por lo tanto, una realización preferida de la presente invención proporciona un anticuerpo anti-TrkA humanizado para el tratamiento de un paciente que padece dolor inflamatorio agudo, dolor inflamatorio crónico, dolor osteoartrosico y/o dolor neuropático.

Ácidos nucleicos, vectores y células hospedadoras

5 La presente descripción también proporciona ácidos nucleicos aislados que codifican los anticuerpos anti-TrkA y sus fragmentos, vectores y células hospedadoras que comprenden el ácido nucleico o el vector. Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células completas, en un lisado celular, o en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. Un ácido nucleico está "aislado" o "se vuelve sustancialmente puro" cuando se purifica de sus otros componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo, otros ácidos nucleicos celulares o proteínas, mediante técnicas estándar, incluido el tratamiento alcalino/SDS, bandas CsCl, cromatografía en columna, electroforesis en gel agarosa y otras bien conocidas en la técnica; véase, por ejemplo, Ausubel F et al., ed. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing y Wiley Interscience, Nueva York. Un ácido nucleico de la invención puede ser, por ejemplo, ADN o ARN y puede contener o no secuencias intrónicas. En una realización preferida, el ácido nucleico es una molécula de ADNc.

15 Los ácidos nucleicos de la invención se pueden obtener usando técnicas estándar de biología molecular, p. ej., los ADNc que codifican las cadenas ligera y pesada del anticuerpo o que codifican los segmentos VH y VL se pueden obtener por amplificación por PCR estándar o técnicas de clonación de ADNc. Para anticuerpos obtenidos a partir de una biblioteca de genes de inmunoglobulina (por ejemplo, usando técnicas de presentación en fagos), pueden recuperarse de la biblioteca uno o más ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo. Los métodos de introducción de ácidos nucleicos exógenos en células hospedadoras son bien conocidos en la técnica y variarán con la célula huésped utilizada. Las técnicas incluyen, sin limitación, transfección mediada por dextrano, precipitación con fosfato de calcio, tratamiento con cloruro de calcio, transfección mediada con polietilimina, transfección mediada con polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, infección viral o de fago, encapsulación de los polinucleótidos en liposomas y microinyección directa del ADN en núcleos. En el caso de células de mamífero, la transfección puede ser transitoria o estable.

En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos aislados que codifican los anticuerpos anti-TrkA y fragmentos de los mismos comprenden una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs 73-116, normalmente moléculas de ácidos nucleicos que codifican la región variable de cadena ligera o la cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 113, 114, 115 y 116 y/o la región variable de la cadena pesada o la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 73-112.

Las moléculas de ácidos nucleicos preferidas de la invención son las que codifican la región variable de la cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID N°: 113 y 114 y/o la región variable de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID N°: 74, 78, 81, 85, 90 y 91. Más preferidas son las moléculas de ácidos nucleicos que codifican la región variable de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 74 y 78 y/o que codifican la región variable de la cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 113 y 114. Las más preferidas son moléculas de ácidos nucleicos que codifican la región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 74 ó 78 y/o que codifican la región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 113.

Las moléculas de ácidos nucleicos preferidas adicionales de la invención son las que codifican la cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 115 y 116 y/o la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 93, 94, 98, 99, 102, 106, 111 y 112. Más preferidas son las moléculas de ácidos nucleicos que codifican la cadena pesada que comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 93, 94, 98 y 99 y/o que codifican la cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 115 y 116. Las más preferidas son moléculas de ácidos nucleicos que codifican la cadena pesada que comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 93, 94, 98 y 99 y/o que codifican la cadena ligera que comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 115.

Una vez que se obtienen fragmentos de ADN que codifican segmentos VH y VL, estos fragmentos de ADN pueden manipularse adicionalmente mediante técnicas de ADN recombinante estándar, por ejemplo para convertir los genes de la región variable en genes de cadena de anticuerpo de longitud completa o para fragmentar los genes correspondientes a los fragmentos descritos anteriormente como, por ejemplo, genes de los fragmentos Fab o a un gen scFv. En estas manipulaciones, un fragmento de ADN que codifica VL o VH se une operativamente a otro fragmento de ADN que codifica otra proteína, tal como una región constante de anticuerpo o un enlazador flexible. La expresión "operativamente unido", tal como se usa en este contexto, pretende significar que los dos fragmentos de ADN están unidos de manera que las secuencias de aminoácidos codificadas por los dos fragmentos de ADN permanecen en el marco. El ADN aislado que codifica la región VH puede convertirse en un gen de cadena pesada de longitud completa uniéndose operativamente el ADN que codifica VH a otra molécula de ADN que codifica regiones constantes de la cadena pesada (CH1, CH2 y CH3). Las secuencias de los genes de la región constante de la cadena pesada humana son conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Kabat, EA et al., Ibid.) y los fragmentos de ADN que abarcan estas regiones se pueden obtener por amplificación PCR estándar.

La región constante de cadena pesada puede ser una región constante IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD, pero lo más preferiblemente es una región constante IgG4, preferiblemente una región constante IGHG4 humana en la que la región bisagra comprende la sustitución de aminoácidos S228P. Para un gen de la cadena pesada del fragmento Fab, el ADN que codifica VH puede unirse operativamente a otra molécula de ADN que codifica solamente la región constante CH1 de la cadena pesada. El ADN aislado que codifica la región VL puede convertirse en un gen de cadena ligera completa (así como un gen de cadena ligera Fab) uniendo operativamente el ADN que codifica VL a otra molécula de ADN que codifica la región constante de la cadena ligera, CL. Las secuencias de los genes de la región constante de la cadena ligera humana son conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Kabat EA et al., *ibid.*) y los fragmentos de ADN que abarcan estas regiones se pueden obtener por amplificación PCR estándar. En realizaciones preferidas, la región constante de la cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda, preferiblemente una región constante kappa. Para crear un gen scFv, los fragmentos de ADN que codifican VH y VL se unen operativamente a otro fragmento que codifica un enlazador flexible, por ejemplo, que codifica la secuencia de aminoácidos (Gly4-Ser)3, de modo que las secuencias VH y VL pueden expresarse como una proteína de cadena sencilla contigua, con las regiones VL y VH unidas mediante el enlazador flexible (véase, por ejemplo, Bird et al., *ibid.*; Huston et al., *ibid.*; McCafferty et al., (1990) *Nature* 348: 552 - 554). Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaron mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, p. ej., Morimoto et al., (1992) *J. Biochem. Biophysical Methods*, 24: 107 - 117 y Brennan et al., (1985) *Science*, 229: 81). Sin embargo, estos fragmentos ahora pueden ser producidos directamente por células hospedadoras recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo se pueden aislar a partir de las bibliotecas de fagos de anticuerpos discutidas anteriormente. Alternativamente, los fragmentos Fab'-SH pueden recuperarse directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')2 (Carter et al., (1992) *Bio/Technology*, 10: 163-167). De acuerdo con otro enfoque, los fragmentos F(ab')2 se pueden aislar directamente del cultivo de células hospedadoras recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para los expertos en la técnica. En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv monocatenario (scFv), véase p. ej. el documento WO93/16185; las Patentes de Estados Unidos N° 5.571.894 y 5.587.458. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.641.870, por ejemplo.

Los ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos de la presente invención se pueden incorporar en un vector, preferiblemente un vector de expresión para expresar la proteína. Se puede utilizar una variedad de vectores de expresión para la expresión de proteínas. Los vectores de expresión pueden comprender vectores extracromosómicos autorreplicantes o vectores que se integran en un genoma del huésped. Los vectores de expresión se construyen para que sean compatibles con el tipo de célula huésped. Por lo tanto, los vectores, preferiblemente los vectores de expresión, que encuentran uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, aquellos que permiten la expresión de proteínas en células de mamíferos, bacterias, células de insectos, levaduras y en sistemas *in vitro*. Como es sabido en la técnica, una variedad de vectores de expresión están disponibles, comercialmente o de otro modo, que pueden encontrar uso en la presente invención para expresar anticuerpos.

Los vectores de expresión típicamente comprenden una proteína unida operativamente con secuencias reguladoras o de control, marcadores seleccionables, cualquier pareja de fusión y/o elementos adicionales. Por "unido operativamente" en la presente memoria se entiende que el ácido nucleico se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. La expresión "secuencia reguladora" pretende incluir promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o traducción de los genes de la cadena del anticuerpo. Dichas secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel (*Gene Expression Technology, Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). En general, estos vectores de expresión incluyen el ácido nucleico regulador transcripcional y traduccional unido operativamente al ácido nucleico que codifica el anticuerpo, y son típicamente apropiados para la célula huésped utilizada para expresar la proteína. En general, las secuencias reguladoras de la transcripción y la traducción pueden incluir secuencias promotoras, sitios de unión ribosómica, secuencias de inicio y parada de la transcripción, secuencias de inicio y parada de la traducción, y secuencias potenciadoras o activadoras. Como también se conoce en la técnica, los vectores de expresión contienen típicamente un gen o marcador de selección para permitir la selección de células hospedadoras transformadas que contienen el vector de expresión. Los genes de selección son bien conocidos en la técnica y variarán con la célula huésped utilizada. Por ejemplo, típicamente el gen marcador seleccionable confiere resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, en una célula hospedadora en la que se ha introducido el vector. Los genes marcadores seleccionables preferidos incluyen el gen de dihidrofolato reductasa (DHFR) (para uso en células huésped dhfr con selección/amplificación de metotrexato) y el gen neo (para la selección de G418).

Las células hospedadoras adecuadas para clonar o expresar el ADN en los vectores de la presente invención son células procariotas, de levadura o eucariotas superiores. Los procariotas adecuados para este fin incluyen eubacterias, incluidos organismos gram-negativos o gram-positivos, por ejemplo, enterobacteriáceas tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans* y *Shigella*, así como Bacilos tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis*, *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa* y *Streptomyces*. Los huéspedes de clonación de *E. coli*

adecuados incluyen *E. coli* 294 (ATCC 31.446), *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31.537) y *E. coli* W3110 (ATCC 27.325).

Además de procariontes, los microbios eucariotes tales como hongos filamentosos o levaduras son huéspedes de clonación o expresión adecuados. *Saccharomyces cerevisiae* o levadura de panadería común es la más utilizada entre los microorganismos hospedadores eucariotes inferiores. Las células hospedadoras para expresar los anticuerpos recombinantes de la invención son preferiblemente células huésped de mamífero que incluyen células de ovario de hámster chino (células CHO) (que incluyen células CHO dhfr^r, descritas en Urlaub & Chasin (1980) PNAS USA 77: 4216 - 4220, utilizadas con un marcador seleccionable de DHFR, por ejemplo, como se describe en Kaufman & Sharp (1982) J. Mol. Biol. 159:601-621), células de mieloma NSO, células COS, células SP2 y células HEK293-EBNA1 (número de catálogo ATCC®: CRL-10852). En particular, para el uso con células de mieloma NSO, otro sistema de expresión preferido es el sistema de expresión del gen GS descrito en los documentos WO87/04462, WO89/01036 y EP0338841.

Construcción y producción de anticuerpos

Los anticuerpos generados contra el polipéptido TrkA pueden obtenerse por inmunización de un animal, es decir, administrando los polipéptidos a un animal, preferiblemente un animal no humano, usando protocolos bien conocidos y de rutina, véase, por ejemplo, Handbook of Experimental Immunology, Weir DM (ed.), Vol. 4, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, Inglaterra, (1986). Muchos animales de sangre caliente, tales como conejos, ratones, ratas, ovejas, vacas, camellos o cerdos pueden ser inmunizados. Sin embargo, los ratones, conejos, cerdos y ratas en ratones particulares son generalmente los más adecuados. Los anticuerpos también se pueden producir mediante técnicas de ADN recombinante conocidas por los expertos. Otros anticuerpos se pueden producir mediante la escisión enzimática o química de los anticuerpos naturales. Los anticuerpos humanizados de la presente invención se pueden construir transfiriendo una o más CDR o porciones de las mismas de regiones VH y/o VL de un animal no humano (por ejemplo, ratón) a una o más regiones marco de regiones VH y/o VL humanas. Preferiblemente, los anticuerpos humanizados de la presente invención se construyen transfiriendo una o más CDR o porciones de las mismas de regiones VH y/o VL del anticuerpo MNAC13 murino como se describe en el documento WO00/73344 a una o más regiones estructurales de las regiones VH y/o VL humanas. Opcionalmente, los residuos estructurales humanos así presentes en las regiones VH y/o VL pueden reemplazarse por residuos correspondientes no humanos (por ejemplo, ratón) cuando sea necesario o se desee para disminuir la inmunogenicidad del anticuerpo y/o mantener la afinidad de unión. Opcionalmente, los residuos de aminoácidos no humanos presentes en las CDR pueden reemplazarse por residuos humanos. Los anticuerpos quiméricos o humanizados de la presente invención se pueden preparar en base a la secuencia de un anticuerpo monoclonal no humano preparado como se describió anteriormente. El ADN que codifica las inmunoglobulinas de cadena pesada y ligera se pueden obtener a partir del híbrido no humano de interés y se modifican genéticamente para contener secuencias de inmunoglobulina no murinas (por ejemplo, humanas) usando técnicas de biología molecular convencionales. Por ejemplo, para crear un anticuerpo quimérico, las regiones variables murinas se pueden unir a las regiones constantes humanas usando los métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 4.816.567 de Cabilly et al). Para crear un anticuerpo humanizado, se pueden insertar regiones de CDR murinas en un marco humano utilizando los métodos conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.225.539 de Winter y las Patentes de Estados Unidos N° 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 y 6.180.370 de Queen et al.).

Se pueden construir anticuerpos humanizados de la presente invención en donde la molécula aceptora humana para la región variable de la cadena pesada se selecciona en base a consideraciones de homología entre las regiones variables de la molécula aceptora potencial y la región variable de la cadena pesada del anticuerpo murino. Se prefieren moléculasceptoras humanas candidatas de la línea germinal para reducir la inmunogenicidad potencial. Las bases de datos de la línea germinal están compuestas de secuencias de anticuerpos que se leen a través del extremo de la región FW3 de la cadena pesada y parcialmente en la secuencia CDR3. Para la selección de una región FW4, se pueden buscar bases de datos de secuencias de anticuerpos maduras que se han derivado de la molécula de la línea germinal seleccionada o se pueden usar secuencias de anticuerpos que se han derivado de la molécula de línea germinal seleccionada de un donante humano. Las moléculasceptoras humanas se seleccionan preferiblemente de la misma clase de cadena pesada que la molécula donante murina, y de la misma clase estructural canónica de la región variable de la molécula donante murina. Las consideraciones secundarias para la selección de la molécula aceptora humana para la región variable de la cadena pesada incluyen la homología en la longitud de CDR entre la molécula donante murina y la molécula aceptora humana. Las moléculas de anticuerpo aceptador humano se seleccionan preferiblemente mediante la búsqueda de homología en la base de datos V-BASE, aunque también pueden usarse otras bases de datos tales como Kabat y las bases de datos públicas de NCBI.

Se pueden construir anticuerpos humanizados de la presente invención en donde la molécula aceptora humana para la región variable de la cadena ligera se selecciona en base a consideraciones de homología entre las regiones variables de la molécula aceptora potencial y con la región variable de la cadena ligera del anticuerpo murino. Se prefieren moléculasceptoras humanas candidatas de la línea germinal para reducir la inmunogenicidad potencial. Las bases de datos de la línea germinal están compuestas de secuencias de anticuerpos que se leen a través del extremo de la región FW3 de la cadena pesada y parcialmente en la secuencia CDR3. Para la selección de una región FW4, se pueden buscar bases de datos de secuencias de anticuerpos maduras que se han derivado de la

molécula de la línea germinal seleccionada o se pueden usar secuencias de anticuerpos que se han derivado de la molécula de la línea germinal seleccionada de un donante humano. Las moléculasceptoras humanas se seleccionan preferiblemente de la misma clase de cadena ligera que la molécula donante murina y de la misma clase estructural canónica de la región variable de la molécula donadora murina. Las consideraciones secundarias para la selección de la molécula aceptora humana para la región variable de la cadena ligera incluyen la homología en la longitud de CDR entre la molécula donante murina y la molécula aceptora humana. Las moléculas de anticuerpo humano se seleccionan preferiblemente mediante búsquedas de homología en la base de datos V-BASE, y también se pueden usar otras bases de datos tales como Kabat y las bases de datos públicas de NCBI.

Cuando el anticuerpo se produce como anticuerpo recombinante p. ej. introduciendo genes en células huésped de mamíferos, los anticuerpos se producen cultivando las células hospedadoras durante un período de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células huésped o, más preferiblemente, para la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el que las células hospedadoras crecen. Las células hospedadoras útiles para producir anticuerpos que se unen a TrkA humano pueden cultivarse en una variedad de medios. Medios comercialmente disponibles tales como Ham's F10 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Suiza), Medio Mínimo Esencial (MEM; Sigma-Aldrich Chemie GmbH), RPMI-1640 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Basilea, Suiza), EX-CELL 293, medio libre de suero HEK293 (Sigma, Buchs, Suiza) y Medio Eagle Modificado de Dulbecco ((DMEM; Sigma-Aldrich Chemie GmbH) son adecuados para el cultivo de las células huésped. Los anticuerpos se pueden recuperar del medio de cultivo usando métodos estándar de purificación de proteínas.

Los anticuerpos se pueden unir operativamente a una pareja de fusión para permitir la selección de la proteína expresada, purificación, selección, presentación y similares. Las parejas de fusión se pueden unir a la secuencia del anticuerpo a través de secuencias enlazadoras. La secuencia enlazadora generalmente comprenderá una pequeña cantidad de aminoácidos, típicamente menos de diez, aunque también se pueden usar enlazadores más largos. Típicamente, las secuencias enlazadoras se seleccionan para que sean flexibles y resistentes a la degradación. Como apreciarán los expertos en la técnica, cualquiera de una amplia variedad de secuencias puede usarse como enlazadoras. Por ejemplo, una secuencia enlazadora común comprende la secuencia de aminoácidos GGGGS. Una pareja de fusión puede ser una secuencia de reconocimiento o señalización que dirige el anticuerpo y cualquier pareja de fusión asociada a una ubicación celular deseada o a los medios extracelulares. Como es sabido en la técnica, ciertas secuencias de señalización pueden dirigirse a una proteína para ser secretada en el medio de crecimiento, o en el espacio periplásmico, localizado entre la membrana interna y externa de la célula. Una pareja de fusión también puede ser una secuencia que codifica un péptido o una proteína que permite la purificación y/o cribado. Tales parejas de fusión incluyen, pero sin limitación, marcadores de polihistidina (His-marcadores) (por ejemplo, H6 y H10 u otras marcadores para uso con sistemas de Cromatografía de Afinidad de Metales Inmovilizados (IMAC) (p. ej., columnas de afinidad de Ni²⁺)), fusiones GST, fusiones MBP, Strep-marcador, la secuencia diana de biotilación BSP de la enzima bacteriana BirA y marcadores de epítipo dirigidos por anticuerpos (por ejemplo, marcadores c-myc, marcadores flag y similares). Como apreciarán los expertos en la técnica, tales marcadores pueden ser útiles para la purificación, para el cribado o para ambos.

Caracterización y purificación de anticuerpos anti-TrkA

El cribado de anticuerpos puede realizarse usando ensayos para medir la unión a TrkA humano y/o ensayos para medir la capacidad de bloquear la unión de TrkA a su ligando NGF. Un ejemplo de un ensayo de unión es un ELISA. Además, el análisis de resonancia de plasma de superficie (SPR) como, p. ej., el utilizado en los ejemplos se puede aplicar para medir las constantes de velocidad de asociación y disociación para la cinética de unión de los anticuerpos. Un ejemplo de un ensayo de bloqueo es un ensayo basado en citometría de flujo que mide el bloqueo de la unión de NGF a TrkA. Como un ensayo para evaluar la actividad funcional de anticuerpos anti-TrkA, p. ej., se puede usar un ensayo de proliferación celular TF-1, en donde la capacidad de los anticuerpos para bloquear la proliferación celular mediada por TrkA/beta-NGF se evalúa usando la línea celular eritroleucémica humana dependiente de factor TF-1 (Kitamura T et al., (1989) J. Cellular Physiology 140 (2): 323 - 34).

Los anticuerpos de la presente invención se pueden aislar o purificar de diversas maneras conocidas por los expertos en la técnica. Los métodos de purificación estándar incluyen técnicas cromatográficas, que incluyen intercambio iónico, interacción hidrófoba, afinidad, dimensionado o filtración en gel y fase inversa, llevados a cabo a presión atmosférica o a alta presión usando sistemas tales como FPLC y HPLC. Los métodos de purificación también incluyen técnicas electroforéticas, inmunológicas, de precipitación, de diálisis y de enfoque cromático. Las técnicas de ultrafiltración y diafiltración, junto con la concentración de proteínas, también son útiles. Para purificar los anticuerpos TrkA, las células huésped seleccionadas se pueden hacer crecer en, por ejemplo, matraces giratorios para la purificación de anticuerpos monoclonales. Los sobrenadantes se pueden filtrar y concentrar antes de la cromatografía de afinidad con proteína A-sefarosa (Pharmacia, Piscataway, NJ). Los anticuerpos eluidos se pueden controlar mediante electroforesis en gel y cromatografía líquida de alta resolución para garantizar la pureza. Un anticuerpo preferido de la presente invención es, por lo tanto, un anticuerpo aislado y/o purificado que se une a TrkA humano.

Inmunocombinados

En otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo TrkA o un fragmento del mismo que se une a TrkA humano, unido a un agente terapéutico, tal como una citotoxina, un fármaco (por ejemplo, un inmunosupresor) o una radiotoxina. Tales combinados se denominan "inmunocombinados". Los inmunocombinados que incluyen una o más citotoxinas se denominan "inmunocombinados". Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial para (por ejemplo, mata) las células. Los ejemplos incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi-antracina, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-desidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puomicina y análogos u homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos también incluyen, por ejemplo, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo descabazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU)), ciclotofamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (p. ej., daunorubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (p. ej., dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antracina (AMC)) y agentes antimetabólicos (por ejemplo, vincristina y vinblastina). Otros ejemplos de citotoxinas terapéuticas que se pueden unir a un anticuerpo de la invención incluyen duocarmicinas, caliqueamicinas, maitansinas y auristatinas y derivados de las mismas. Un ejemplo de un combinado de anticuerpo de caliqueamicina está disponible comercialmente (Mylotarg®, American Home Products). Las citotoxinas se pueden unir a los anticuerpos de la invención usando tecnología de enlazadores disponible en la técnica. Los ejemplos de tipos de enlazadores que se han usado para combinar una citotoxina a un anticuerpo incluyen, pero sin limitación, hidrazonas, tioéteres, ésteres, disulfuros y enlazadores que contienen péptidos. Puede elegirse un enlazador que sea, por ejemplo, susceptible de escisión por pH bajo dentro del compartimento lisosómico o susceptible de escisión por proteasas, tales como proteasas expresadas preferentemente en tejido tumoral tal como catepsinas (por ejemplo, catepsinas B, C, D). Para una discusión adicional de tipos de citotoxinas, enlazadores y métodos para combinar agentes terapéuticos a anticuerpos, véase también Saito G et al., (2003) Adv. Drug Deliv. Rev. 55: 199-215; Trail PA et al., (2003) Cancer Immunol. Immunother. 52:328-337; Payne G (2003) Cancer Cell 3: 207 - 212; Allen TM (2002) Nat. Rev. Cancer 2: 750 - 763; Pastan I y Kreitman RJ (2002) Curr. Opin. Investig. Drugs 3: 1089-1091; Senter PD y Springer CJ (2001) Adv. Drug Deliv. Rev. 53:247-264. Los anticuerpos de la presente invención también se pueden unir a un isótopo radiactivo para generar productos radiofarmacéuticos citotóxicos, también denominados radioinmunocombinados. Los ejemplos de isótopos radiactivos que pueden conjugarse con anticuerpos para uso diagnóstico o terapéutico incluyen, pero no se limitan a, yodo-131, indio-111, itrio-90 y lutecio-177. Métodos para preparar los radioinmunocombinados se establecen en la técnica. Ejemplos de radioinmunocombinados que están disponibles comercialmente incluyen Zevalin® (EDEC Pharmaceuticals) y Bexxar® (Corixa Pharmaceuticals) y se pueden usar métodos similares para preparar radioinmunocombinados usando los anticuerpos de la invención. Los inmunocombinados de anticuerpos de la invención se pueden usar para modificar una respuesta biológica dada, y el resto de fármaco no debe interpretarse como limitado a agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el resto de fármaco puede ser una proteína o polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Tales proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa, o un fragmento activo de la misma, tal como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas o toxina de la difteria; una proteína tal como factor de necrosis tumoral o interferón-γ; o modificadores de la respuesta biológica tales como, por ejemplo, linfocinas, interleucina-1 (IL-1), interleucina-2 (IL-2), interleucina-6 (IL-6), factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) u otros factores de crecimiento.

Las técnicas para unir tales agentes terapéuticos a anticuerpos son bien conocidas, véase, por ejemplo, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Reisfeld et al., (Eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies for Drug Delivery", en Controlled Drug Delivery (2ª edición), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (Eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985) y Thorpe et al, Immunol. Rev. 62: 119-58 (1982).

En otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-TrkA o un fragmento del mismo que se une a TrkA humano, administrado junto con un agente terapéutico, tal como una citotoxina, un fármaco (por ejemplo, un inmunosupresor) o una radiotoxina.

55 Composiciones farmacéuticas

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que comprende el anticuerpo o fragmento del mismo de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tales composiciones pueden incluir uno o una combinación de (por ejemplo, dos o más diferentes) anticuerpos, y/o inmunocombinados de la invención y/o un agente terapéutico, tal como una citotoxina, un fármaco (por ejemplo, un inmunosupresor) o una radiotoxina como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, una composición farmacéutica de la invención puede comprender una combinación de anticuerpos (o inmunocombinados) que se unen a diferentes epítopos en el antígeno diana o que tienen actividades

complementarias. Las composiciones farmacéuticas de la invención también se pueden administrar en terapia de combinación, es decir, combinadas con otros agentes como se detalla más adelante.

Como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes retardadores de la absorción e isotónicos y similares que son fisiológicamente compatibles. Preferiblemente, el vehículo es adecuado para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, mediante inyección o infusión). Dependiendo de la vía de administración, el compuesto activo, es decir, el anticuerpo o inmunoconjugado, se puede revestir en un material para proteger el compuesto de la acción de ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla su uso en las composiciones farmacéuticas de la invención. Compuestos activos suplementarios también se pueden incorporar en las composiciones.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende el anticuerpo anti-TrkA humanizado o fragmento del mismo de la presente invención y otro agente farmacéuticamente activo. Preferiblemente, el agente farmacéuticamente activo es uno o más de: a) un agente analgésico, b) otro anticuerpo anti-TrkA, c) NGF, d) un agente anticancerígeno, e) un anticuerpo anti-NGF como se detalla a continuación.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo o fragmento del mismo que se une a TrkA humano unido a un agente terapéutico y a un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los inmunoconjugados y agentes terapéuticos que se pueden usar son como se describe anteriormente.

Una composición farmacéutica de la invención también puede incluir un antioxidante farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, hidrocloreto de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio y similares; (2) antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol y similares; y (3) agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y similares. Los ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares) y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables, tales como el oleato de etilo. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de materiales de revestimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos. Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos se puede asegurar tanto mediante procedimientos de esterilización, supra como mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, ácido fenolsórbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio y similares en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede conseguirse mediante la inclusión de agentes que retrasan la absorción, tales como el monoestearato de aluminio y la gelatina.

Usos terapéuticos y otros

Los anticuerpos de la presente invención pueden usarse en medicina para tratar diversos trastornos/afecciones, tal como se expone en diversas categorías a continuación.

La invención proporciona así un método de tratamiento de las afecciones que se mencionan a continuación que comprende administrar a un sujeto, adecuadamente un sujeto mamífero, especialmente un sujeto humano que lo necesita, una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o derivado como se describe en la presente de tal manera que la afección sea así tratada.

La invención también proporciona el uso de un anticuerpo o derivado como se describe en este documento en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de las afecciones mencionadas a continuación.

En este documento el término "tratamiento" incluye el tratamiento terapéutico de un trastorno/condición existente. También incluye el tratamiento profiláctico. Incluye además la mejora de uno o más síntomas adversos, incluso si un paciente no se cura de un trastorno/afección dada. Por ejemplo, el dolor puede aliviarse o reducirse.

Un uso médico preferido es el tratamiento del dolor. Según la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor ("IASP"), el dolor generalmente se define como "una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada con un daño tisular real o potencial, o descrito en términos de dicho daño o ambos". El elemento esencial en todas las formas de dolor es la activación de receptores especializados de alto umbral y fibras nerviosas para advertir al organismo de un posible daño tisular. La participación de las células inflamatorias y sus procesos es un elemento

común en muchos estados de dolor. La expresión "dolor agudo" significa un dolor inmediato, generalmente de umbral alto, provocado por una lesión tal como un corte, aplastamiento, quemaduras o estimulación química. La expresión "dolor crónico", como se usa en este documento, significa un dolor que no sea un dolor agudo, tanto de origen inflamatorio como neuropático. Se entiende que el dolor crónico a menudo es de una duración relativamente larga, por ejemplo, meses o años y puede ser continuo o intermitente. Los anticuerpos de la presente invención pueden usarse para tratar tanto el dolor crónico como el dolor agudo. El tratamiento del dolor crónico es preferido.

El dolor puede ser, por ejemplo, o puede estar asociado con cualquiera de los siguientes: dolor inflamatorio, dolor posquirúrgico, dolor postoperatorio (incluido el dolor dental), dolor neuropático, neuropatía periférica, neuropatía diabética, nefropatía diabética, dolor de fractura, dolor en las articulaciones de la gota, neuralgia postherpética, dolor por cáncer, dolor por osteoartritis o artritis reumatoide, ciática, dolores asociados con crisis de células falciformes, dolores de cabeza (p. ej., migrañas, cefalea tensional, cefalea en racimos), dismenorrea, endometriosis, fibromas uterinos, dolor musculoesquelético, dolor lumbar crónico, fibromialgia, esguinces, dolor visceral, quistes ováricos, prostatitis, síndrome del dolor pélvico crónico, cistitis, cistitis intersticial, dolor por el síndrome de vejiga dolorosa y/o síndrome de la vejiga, dolor asociado con prostatitis abacteriana crónica, dolor incisional, migraña, neuralgia del trigémino, dolor por quemaduras y/o heridas, dolor asociado a traumatismos, dolor asociado con enfermedades musculoesqueléticas, espondilitis anquilosante, patologías periarticulares, dolor de metástasis óseas, dolor por VIH, eritromelalgia o dolor causado por pancreatitis o cálculos renales, melanoma maligno, síndrome de Sjogren, asma (por ejemplo, asma no controlada con hipersensibilidad grave a las vías respiratorias), tos intratable, enfermedades desmielinizantes, alcoholismo crónico, apoplejía, síndrome de dolor talámico, dolor por toxinas, dolor por quimioterapia, trastornos inflamatorios del intestino, síndrome del intestino irritable, trastornos oculares inflamatorios, trastornos inflamatorios o inestables de la vejiga, psoriasis, afecciones cutáneas con componentes inflamatorios, quemaduras solares, carditis, dermatitis, miositis, neuritis, enfermedades vasculares del colágeno, afecciones inflamatorias crónicas, dolor inflamatorio y asociado a hiperalgesia y alodinia, dolor neuropático y asociado a hiperalgesia o alodinia, dolor por neuropatía diabética, causalgia, dolor mantenido simpáticamente, síndromes de desaferentación, daño o disfunción del tejido epitelial, alteraciones de la motilidad visceral en regiones respiratorias, genitourinarias, gastrointestinales o vasculares, reacciones cutáneas alérgicas, prurito, vitiligo, trastornos gastrointestinales generales, colitis, ulceración gástrica, úlceras duodenales, rinitis vasomotora o alérgica, trastornos bronquiales, dispepsia, reflujo gastroesofágico, pancreatitis, visceralgia y displasia fibrosa del hueso (FD).

El dolor puede ser, por ejemplo, o puede estar asociado con cualquiera de los siguientes: pancreatitis, cálculos renales, endometriosis, EII, enfermedad de Crohn, adherencias posquirúrgicas, cálculos de la vesícula biliar, dolores de cabeza, dismenorrea, dolor musculoesquelético, esguinces, dolor visceral, quistes ováricos, prostatitis, cistitis, cistitis intersticial, dolor postoperatorio, migraña, neuralgia del trigémino, dolor por quemaduras y/o heridas, dolor asociado a traumatismos, dolor neuropático, dolor asociado con enfermedades musculoesqueléticas, artritis reumatoide, osteoartritis, espondilitis anquilosante, patologías periarticulares, dolor oncológico, dolor por metástasis óseas, infección por VIH.

Se conocen varios modelos para evaluar el dolor y se pueden usar en el cribado de anticuerpos/derivados de los mismos. Por ejemplo, puede usarse la prueba de la placa caliente de nocicepción, como se describe en el documento WO 00/73344, por ejemplo. El experimento se puede llevar a cabo de acuerdo con McMahon et al., 1995 (Nature Med. 1: 774-780), usando el anticuerpo/derivado como inmuno adhesina. El anticuerpo/derivado se infunde subcutáneamente en la pata trasera de una rata adulta durante un período de tres semanas o mediante una minibomba osmótica. La sensibilidad a la nocicepción se evalúa a intervalos usando una prueba de placa caliente (Eddy y Leimbach (1953) J. Phar. Exp. Ther. 107: 385-393), que imita situaciones de hiperalgesia después de una inflamación o daño parcial al nervio. El estímulo nociceptivo induce en tal caso una respuesta (lamer las patas y/o saltar) lo que presupone una coordinación integrada más alta que el reflejo simple. Según la prueba, el animal se coloca en un habitáculo con una placa calentada a la temperatura deseada como base, por lo general, a 56°C. La latencia de cualquiera de las dos respuestas (lamido de pata y salto) se mide en los animales control (tratados con anticuerpo no relevante) y en aquellos tratados con el anticuerpo/derivado anti-TrkA.

Como alternativa a la prueba de la placa caliente, se puede evaluar la respuesta nociceptiva frente a la formalina. Esta prueba es descrita por Porro & Cavazzuti, 1993 (Prog. Neurobiol, 41: 565 - 607) y se usó en el documento WO06/137106. Implica evaluar la reducción de la respuesta al dolor mediante el análisis de cualquier reducción de la lamida de la pata cuando se administra un candidato determinado antes de la prueba. Se usa típicamente solución salina como control negativo.

Una evaluación de la hiperalgesia se puede determinar utilizando un método de soporte de peso. Los ratones normalmente distribuyen su peso corporal por igual entre sus dos extremidades. Después de un estímulo doloroso en la extremidad, por ejemplo, mediante la inyección local de adyuvante completo de Freund (CFA) o yodoacetato monosódico (MIA) en la pata trasera (intraplantar) o en la articulación de la rodilla (intraarticular), el peso se redistribuye para reducirlo en la extremidad inyectada y su aumento se coloca en la extremidad no inyectada. El soporte de peso se mide utilizando un comprobador de incapacidad con las patas traseras colocadas en sensores separados y la fuerza promedio ejercida por ambas extremidades traseras se registra. El soporte de peso se puede usar para evaluar la hiperalgesia inflamatoria aguda resultante de la inyección intraplantar de CFA, hiperalgesia inflamatoria crónica resultante de la inyección intraarticular de CFA o hiperalgesia osteoartrítica crónica que resulta de la inyección intraarticular de MIA, como se detalla en los Ejemplos 2, 3 y 4, respectivamente.

Se puede realizar una evaluación de la hiperalgesia mecánica mediante varios métodos, por ejemplo, filamentos de Von Frey o un analgesiómetro de Randall-Selitto. Los umbrales de la retirada de la pata se miden en respuesta al aumento de los estímulos de presión aplicados a la superficie de la pata trasera plantar por los filamentos de von Frey o a la superficie dorsal de la pata trasera mediante una sonda en forma de cuña de un analgesiómetro Randall-Selitto. La latencia de la retirada de la pata trasera se mide en animales control y en aquellos tratados con el anticuerpo/derivado anti-TrkA. Estos métodos se pueden usar para evaluar la hiperalgesia mecánica resultante del modelo animal de lesión por constricción crónica (CCI) como se detalla en el ejemplo 5.

El modelo CCI es también un modelo animal bien conocido. Implica una constricción crónica del nervio ciático y se usa para inducir dolor crónico de naturaleza neuropática en roedores, tales como ratones o ratas. Este modelo está descrito por Bennett & Xie, 1998 en Pain 33: 87-107. Se usó en el documento WO 06/131592, por ejemplo. Una característica principal de muchos estados de dolor neuropático es que los estímulos fríos normalmente inoocuos comienzan a producir dolor. Una respuesta incrementada frente a un estímulo no doloroso se denomina alodinia. La extensión del estado de dolor neuropático inducido puede, por lo tanto, medirse usando una prueba de placa fría para la alodinia, como se detalla en el Ejemplo 5. El animal se coloca en un habitáculo que tiene una placa enfriada a la temperatura deseada, que puede estar en el intervalo de -5°C a 15°C. La latencia de la retirada de la pata trasera se mide en los animales control y en aquellos tratados con el anticuerpo/derivado anti-TrkA. Típicamente, la latencia para la retirada se vuelve diferente de la línea base a temperaturas superficiales de 5°C e inferiores.

Los anticuerpos pueden usarse en el tratamiento del cáncer, un trastorno neuronal, la enfermedad de Alzheimer, la diabetes mellitus, la nefropatía diabética, un trastorno viral, un trastorno mediado por el VIH, la lepra o un trastorno inflamatorio. Además, los anticuerpos también son útiles en el tratamiento de otras enfermedades que pueden estar asociadas con niveles elevados de NGF, que incluyen, por ejemplo, lupus eritematoso, herpes zóster, neuralgia postherpética e hiperalgesia.

Varios cánceres expresan TrkA. La interacción de TrkA con NGF puede estar implicada en el desarrollo tumoral (por ejemplo, de cánceres de próstata y páncreas). De hecho, en ciertas formas de cáncer, un exceso de NGF puede facilitar el crecimiento y la infiltración de fibras nerviosas. Al bloquear la acción del NGF, es posible reducir significativamente la formación de neuromas. Además, como alternativa a simplemente proporcionar un efecto de bloqueo, los anticuerpos se pueden acoplar a un agente citotóxico y se pueden usar para dirigirse a las células cancerosas que expresan TrkA. Sin embargo, no es necesario combinar los anticuerpos con las toxinas. La ADCC (citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo) surge debido a una respuesta inmune en la que los anticuerpos, al recubrir las células diana, pueden hacerlas vulnerables al ataque del sistema (por ejemplo, por las células T, por la activación del complemento, etc.). Los cánceres preferidos a tratarse son el dolor por el cáncer de próstata, cáncer de tiroides, cáncer de pulmón, prolactinoma, melanoma o cáncer de hueso que incluye el dolor por cáncer asociado con metástasis ósea. Un cáncer preferido a tratar es el dolor del cáncer de hueso, incluido el dolor asociado al cáncer con metástasis ósea.

Los anticuerpos también pueden usarse en el tratamiento de diversos trastornos neuronales que comprenden trastornos neurodegenerativos, p. ej., los anticuerpos pueden usarse para reducir la formación de neuromas. También se pueden usar en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer o en terapias neuroregenerativas. Los anticuerpos de la presente invención pueden ser útiles en tales tratamientos para reducir los efectos agonistas no deseados del NGF (véase también la sección "Terapia de combinación" a continuación). Además, los anticuerpos pueden usarse para tratar el dolor neuropático, como se discutió anteriormente. Esto puede estar asociado con una lesión o una disfunción del sistema nervioso. El NGF tiene un uso potencial en el tratamiento de la diabetes y la lepra, pero tiene propiedades agonistas indeseadas que incluyen un aumento en la sensibilidad al dolor que podría evitarse usando los anticuerpos de la presente invención.

Una aplicación aún más está en el tratamiento de trastornos inflamatorios. El NGF es liberado por los mastocitos, fibroblastos y otros tipos de células en los sitios periféricos donde ocurren los procesos inflamatorios. En particular, los mastocitos parecen jugar un papel fundamental. Producen NGF y al mismo tiempo expresan receptores TrkA funcionales en su superficie. El sistema NGF/TrkA parece mediar en la activación de mastocitos a través de un mecanismo de retroalimentación autocrina positiva que permite la amplificación local de la señal inflamatoria algogénica. Ejemplos de trastornos inflamatorios que pueden tratarse incluyen formas inflamatorias del tracto urinario y de la región pélvica, osteoartritis, esclerosis múltiple, colitis, enfermedad inflamatoria del intestino, cistitis vesical, eczema, dermatitis de contacto, artritis, incluyendo artritis crónica y artritis reumatoide, enfermedad de Crohn enfermedad, psoriasis y asma.

Los anticuerpos de la presente invención pueden ser útiles en los tratamientos mencionados anteriormente para reducir los efectos agonistas no deseados del NGF.

Los anticuerpos o derivados de los mismos de la presente invención se pueden usar junto con uno o más de otros agentes activos, p. ej., agentes farmacéuticamente activos en terapia de combinación. Se pueden usar para administración simultánea, secuencial o concertada en medicina. Por ejemplo, el anticuerpo o derivado se puede combinar con un agente analgésico tal como un opioide analgésico o un analgésico no opioide. En el documento WO06/137106 se describe que pequeñas cantidades de moléculas capaces de bloquear la actividad biológica de TrkA pueden potenciar los efectos analgésicos de los opioides. Dichos opioides analgésicos incluyen uno o más

compuestos seleccionados de los siguientes: morfina, codeína, dihidrocodeína, diacetilmorfina, hidrocodona, hidromorfona, levorfanol, oximorfona, alfentanil, buprenorfina, butorfanol, fentanil, sufentanil, meperidina, metadona, nabumetona, propoxifeno, pentazocina; y sus derivados farmacéuticamente aceptables (por ejemplo, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos). Los analgésicos no opioides adecuados incluyen fármacos inflamatorios no esteroideos (AINE) así como otros analgésicos tales como el paracetamol. Los AINE comúnmente disponibles para tratar el dolor inflamatorio agudo incluyen aspirin, ibuprofeno, indometacina, naproxeno y ketoprofeno y para tratar el dolor inflamatorio crónico incluyen celecoxib y meloxicam.

Una combinación adicional es la de uno o más anticuerpos de la presente invención junto con uno o más anticuerpos diferentes. Una combinación preferida es con uno o más anticuerpos anti-TrkA y/o anti-NGF. Tales combinaciones pueden proporcionar una eficacia aumentada en el tratamiento de uno o más de los trastornos discutidos en la presente memoria, con relación al tratamiento con un único anticuerpo. Por ejemplo, se pueden usar combinaciones de dos o más anticuerpos que se encuentran entre los procedimientos de ensayo más eficaces usados en este documento.

Una combinación adicional es la del anticuerpo de la presente invención con NGF. Como se discutió anteriormente, se ha propuesto el uso de NGF en el tratamiento de diversos trastornos, que incluyen la enfermedad de Alzheimer, la diabetes mellitus, la lepra, etc., pero se ha observado un aumento en la sensibilidad al dolor que surge de las propiedades agonistas hacia los objetivos periféricos. De nuevo, usando un anticuerpo o derivado de la presente invención, se puede reducir la sensibilidad al dolor, haciendo de este modo que las terapias basadas en NGF sean más atractivas.

Una combinación adicional es la del anticuerpo de la presente invención con un agente anticanceroso tal como, p. ej., un agente alquilante, un antimetabolito, un inhibidor de topoisomerasa II, un inhibidor de topoisomerasa I, un fármaco antimetabólico o un derivado de platino.

Los anticuerpos de la presente invención pueden administrarse por cualquier ruta apropiada. Esto incluye (pero no se limita a) la administración intraperitoneal, intramuscular, intravenosa, subcutánea, intratraqueal, oral, enteral, parenteral, intranasal o dérmica.

Los anticuerpos típicamente pueden administrarse para la aplicación local mediante inyección (intraperitoneal o intracraneal, típicamente en un ventrículo cerebral o intrapericardiaco o intrabursal) de formulaciones líquidas o por ingestión de formulaciones sólidas (en forma de píldoras, tabletas, cápsulas) o de formulaciones líquidas (en forma de emulsiones y soluciones). Las composiciones para la administración parenteral comúnmente comprenden una solución de inmunoglobulina disuelta en una solución compatible, preferiblemente acuosa. La concentración del anticuerpo/derivado en estas formulaciones puede variar de menos de 0,005% a 15-20% p/v. Se selecciona principalmente de acuerdo con los volúmenes del líquido, la viscosidad, etc., y de acuerdo con el modo de administración particular deseado. Alternativamente, los anticuerpos se pueden preparar para la administración en forma sólida. Los anticuerpos se pueden combinar con diferentes sustancias inertes o excipientes, que pueden incluir ligandos tales como celulosa microcristalina, gelatina o goma árabe; recipientes tales como lactosa o almidón; agentes tales como ácido alginico, Primogel o almidón de maíz; lubricantes tales como estearato de magnesio, dióxido de silicio coloidal; edulcorantes tales como sacarosa o sacarina; o sabores, tales como la menta y el salicilato de metilo. Otros sistemas de administración farmacéutica incluyen hidrogel, hidroximetilcelulosa, liposomas, microcápsulas, microemulsiones, microesferas, etc.

Las inyecciones locales directamente en un sitio afectado por un trastorno/cerca del mismo son un modo preferido de administración si un trastorno está localizado. Los anticuerpos anti-TrkA se administran de forma adecuada sistémicamente. La administración sistémica puede realizarse mediante inyección, p. ej., infusión intravenosa continua, infusión intravenosa en bolo, inyección subcutánea o intramuscular.

Alternativamente, también pueden usarse otras formas de administración (por ejemplo, oral, mucosal, por inhalación, sublingual, etc.). Sin embargo, si se desea, la administración del anticuerpo/derivado puede realizarse mediante administración local (por ejemplo, inyección intraarticular o inyección subcutánea, intramuscular) en las proximidades de los tejidos afectados.

El anticuerpo/derivado anti-TrkA se formulará adecuadamente en una composición farmacéutica apropiada para la ruta de administración prevista. Las soluciones para inyección contendrán adecuadamente el anticuerpo/derivado disuelto o disperso en un medio acuoso (por ejemplo, agua para inyección) según corresponda, que contenga tampones apropiados y modificadores de la molaridad (por ejemplo, fosfato, sal y/o dextrosa).

El régimen de tratamiento (es decir, dosis, temporización y repetición) puede representarse mediante administraciones únicas o repetidas (por ejemplo, inyecciones) del producto mediante la ruta de administración elegida. El intervalo de administración de la dosis puede estar sujeto a modificaciones dependiendo de la extensión y la duración de la respuesta clínica, así como de la historia clínica particular individual y de la persona.

Adecuadamente, el anticuerpo/derivado anti-TrkA tiene una larga duración de acción. En particular, el efecto clínico del anticuerpo que se extiende después de la administración puede ser de hasta 21 días según se determina a partir de estudios en animales. Además, los anticuerpos anti-TrkA pueden manifestar un beneficio clínico durante un

período más prolongado que aquel en el que puede detectarse su presencia en una matriz biológica relevante tal como suero o plasma después de su administración.

5 A la luz de la larga duración de la acción prevista (es decir, un efecto que dura adecuadamente al menos una semana, o preferiblemente al menos dos semanas, por ejemplo, al menos tres semanas o al menos cuatro semanas), adecuadamente el anticuerpo/derivado puede administrarse a sujetos con una frecuencia de no más de una vez por semana, por ejemplo, no más de una vez cada dos semanas o una vez cada tres semanas o una vez cada cuatro semanas.

10 Una dosis diaria adecuada del anticuerpo/derivado anti-TrkA variará típicamente de 0,1 mg/kg a 10 mg/kg de peso corporal. Una dosis adecuada del anticuerpo anti-TrkA para el tratamiento del dolor inflamatorio agudo y crónico es de al menos 0,01 mg/kg (véanse los Ejemplos 2 y 3). Una dosis adecuada del anticuerpo anti-TrkA para el tratamiento del dolor osteoartrósico es de al menos 0,1 mg/kg (véase el Ejemplo 4). Una dosis adecuada del anticuerpo anti-TrkA para el tratamiento del dolor neuropático es al menos de 0,01 mg/kg, preferiblemente de 0,1 mg/kg y lo más preferiblemente de 1 mg/kg (véase el Ejemplo 5). Estas dosis se refieren a una condición in vivo solo en ratones. La presente invención se refiere al uso de un anticuerpo anti-TrkA humanizado en el tratamiento del dolor inflamatorio agudo, en el que la hiperalgesia se revierte eficazmente en la misma medida que la observada con la administración de un NSAID. La presente invención también se refiere al uso de un anticuerpo anti-TrkA humanizado en el tratamiento del dolor inflamatorio crónico, en el que la hiperalgesia se revierte eficazmente en la misma medida que la observada con la administración de un AINE. La presente invención también se refiere al uso de un anticuerpo anti-TrkA humanizado en el tratamiento del dolor osteoartrítico, en el que la hiperalgesia se invierte de forma efectiva en la misma medida que la observada con la administración de pregabalina y un opiáceo. La presente invención también se refiere al uso de un anticuerpo anti-TrkA humanizado en el tratamiento del dolor neuropático, en el que la hiperalgesia se invierte efectivamente en la misma medida que la observada con la administración de pregabalina. Pasando ahora a la administración específicamente con respecto a los tumores, la administración puede ser a través de inyección directa y localizada en un tumor o un tejido cerca del sitio del tumor. 25 Para la administración sistémica, las dosis varían de 0,05 mg/kg por día a 500 mg/kg por día, aunque se prefieren las dosis en la región inferior del intervalo porque son más fáciles de administrar. Las dosificaciones pueden calibrarse, por ejemplo, para garantizar un nivel particular en el plasma del anticuerpo/derivado (en el intervalo de aproximadamente 5-30 mg/ml, preferiblemente entre 10-15 mg/ml) y mantener este nivel durante un período dado de tiempo hasta que se logren los resultados clínicos.

30 Los métodos efectivos para medir o evaluar el estadio de los tumores de páncreas o próstata se basan en la medición del antígeno prostático específico (PSA) en sangre, en la medición del tiempo de supervivencia para tumores de páncreas, en la medición de la ralentización o inhibición de la difusión para la metástasis en el caso de ambos tipos de tumores.

35 Para la inyección directa a nivel del sitio del tumor, la dosis depende de diferentes factores, incluidos el tipo, el estadio y el volumen del tumor, junto con muchas otras variables.

Dependiendo del volumen del tumor, las dosis terapéuticas típicas pueden variar de inyecciones de 0,01 mg/ml y 10 mg/ml que se pueden administrar con la frecuencia necesaria.

40 Cualquiera que sea la naturaleza de la terapia, los anticuerpos humanizados pueden eliminarse mucho más lentamente y requieren dosis más bajas para mantener un nivel efectivo en el plasma que los anticuerpos no humanizados. Además, con anticuerpos de alta afinidad, la administración puede ser menos frecuente y menos importante que con anticuerpos que tienen menor afinidad.

La dosificación terapéuticamente efectiva de cada anticuerpo/derivado puede determinarse durante el tratamiento por parte de un médico experto. Si es necesario, las dosis se pueden reducir (por ejemplo, para reducir los efectos secundarios) o aumentar (para aumentar los efectos terapéuticos).

45 Antes de la administración, las preparaciones de los anticuerpos de la invención se pueden almacenar congeladas o liofilizadas. Luego pueden reconstituirse inmediatamente antes del uso en un tampón adecuado. Dado que la liofilización y la reconstitución pueden dar como resultado una pérdida de actividad, los niveles de administración de anticuerpos pueden calibrarse para compensar este hecho. (Para las inmunoglobulinas convencionales, los anticuerpos IgM tienden a tener una mayor pérdida de actividad que los anticuerpos IgG).

50 También se puede asignar una vida útil para que los anticuerpos no se usen después de un cierto período de almacenamiento.

55 Un anticuerpo o derivado del mismo de la presente invención se puede usar en el diagnóstico o pronóstico de cualquiera de las enfermedades/afecciones discutidas anteriormente en relación con los usos médicos. Por ejemplo, puede usarse para facilitar la detección de marcadores tumorales positivos a TrkA, como un marcador precoz de la insurgencia de la enfermedad de Alzheimer, etc.

También se puede usar en el diagnóstico de CIPA ("insensibilidad congénita al dolor con anhidrosis"). Es un síndrome autosómico hereditario, recesivo, caracterizado por fiebre episódica recurrente, anhidrosis, ausencia de

reacción a estímulos nociceptivos, retraso mental y tendencia a la automutilación. Es el resultado de mutaciones en el gen TrkA. De hecho, un anticuerpo o derivado de la presente invención se puede usar en el diagnóstico o pronóstico de una amplia gama de afecciones que implican la expresión aberrante de TrkA (en comparación con la expresión de TrkA en un individuo sano o una muestra de tejido sano) o una actividad aberrante que implica TrkA.

5 La presente invención, por lo tanto, incluye dentro de su alcance un método que comprende obtener una muestra biológica obtenida de un paciente y poner en contacto la muestra con un anticuerpo o derivado de la presente invención. Si se desea, el anticuerpo/derivado puede inmovilizarse. El método puede incluir entonces analizar la unión del anticuerpo/derivado a dicha muestra de una manera cuantitativa o cualitativa. Si se desea, esto se puede hacer con referencia y/o con un control positivo (que indica un estado saludable) o un control negativo (que indica la presencia/probabilidad de un trastorno). Para fines de diagnóstico, los anticuerpos pueden marcarse con un

10 marcador detectable o pueden no estar marcados. (El término "marcador" se usa en el presente documento para incluir marcadores o cualquier otro resto/resto detectable que pueda desencadenar un cambio detectable).

Artículo de fabricación y kit

En otra realización de la descripción, se describe un artículo de fabricación que comprende el anticuerpo o fragmento del mismo, la composición o el inmunoconjugado de la invención para el tratamiento de una o más de las enfermedades/afecciones mencionadas anteriormente. El artículo de fabricación puede comprender un recipiente y una etiqueta o prospecto en o asociado con el recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales o jeringas. Los recipientes pueden formarse a partir de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que puede ser efectiva para tratar la afección y puede tener un

15 puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición puede ser el anticuerpo descrito en este documento. La etiqueta o prospecto puede indicar que la composición puede usarse para tratar la condición de elección.

Además, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende el anticuerpo de la presente invención y (b) un segundo recipiente con una composición contenida en el mismo, en donde la composición comprende un agente terapéutico distinto del anticuerpo. El artículo de fabricación en esta realización de la descripción puede comprender además un prospecto que indique que la primera y la segunda composición se pueden usar en combinación. Tal agente terapéutico puede ser cualquiera de las terapias adjuntas descritas en la sección anterior (p. ej., un agente trombolítico, un agente antiplaquetario, un agente quimioterapéutico, un agente antiangiogénico, un compuesto antihormonal, un cardioprotector y/o un regulador de la función inmune en un mamífero, incluyendo una citoquina). Alternativamente, o adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo (o tercer) recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWF1), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, que incluyen otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

25

30

35

También están dentro del alcance de la presente invención kits que comprenden el anticuerpo, las composiciones o los inmunoconjugados de la invención y las instrucciones de uso. El kit puede contener además uno o más reactivos adicionales, tales como un reactivo inmunosupresor, un agente citotóxico o un agente radiotóxico, o uno o más anticuerpos adicionales de la invención (por ejemplo, un anticuerpo que tenga una actividad complementaria que se una a un epítipo en el antígeno TrkA distinto del primer anticuerpo).

40

Sin más descripción, se cree que cualquier experto en la técnica puede, usando la descripción precedente y los siguientes ejemplos ilustrativos, fabricar y utilizar los agentes de la presente descripción y practicar los métodos reivindicados. Los siguientes ejemplos de trabajo se proporcionan para facilitar la práctica de la presente descripción y no deben interpretarse como limitativos de ninguna manera del resto de la descripción.

45

EJEMPLOS

Los anticuerpos anti-TrkA humanizados descritos en la presente memoria representan un nuevo subgrupo de anticuerpos anti-TrkA, que son altamente eficaces para inhibir la activación funcional de TrkA. El anticuerpo monoclonal de ratón anti-TrkA conocido como MNAC13 descrito en el documento WO00/73344, y sus variantes humanizadas descritas en el documento WO09/098238 no alcanzan el mismo nivel de inhibición, que se desea en determinadas circunstancias, p. ej., para el tratamiento del dolor y el dolor relacionado con el cáncer, donde un alto nivel de inhibición puede conducir a una mayor eficacia del tratamiento. Por lo tanto, sería deseable desarrollar anticuerpos anti-TrkA humanizados que exhiban inhibición de TrkA en alto grado.

50

Los métodos para evaluar la inhibición mediada por anticuerpos de la activación funcional de TrkA son bien conocidos en la técnica e incluyen ensayos de proliferación celular TF-1, en los que se analiza la capacidad de los anticuerpos para bloquear la proliferación celular mediada por TrkA/beta-NGF de la superficie celular usando la línea celular eritroleucémica humana dependiente de factor TF-1 (Kitamura T et al., (1989) J. Cellular Physiology 140 (2): 323 - 34). Los anticuerpos humanizados descritos en el documento WO09/098238 han demostrado actividad inhibidora en ensayos de proliferación de TF-1 con el candidato BXhVH5VL1 que tiene el mayor grado de inhibición

55

entre las variantes humanizadas del anticuerpo de ratón MNAC13. Además, los anticuerpos humanizados descritos en el documento WO09/098238 han demostrado una unión directa a la región extracelular de TrkA usando la técnica de Resonancia de Plasma Superficial (SPR). Por lo tanto, para diseñar nuevas variantes humanizadas del anticuerpo MNAC13 de ratón con afinidades de unión mejoradas al TrkA humano y potencias de inhibición más importantes mejoradas en ensayos de proliferación celular TF-1 sobre la variante humanizada BXhVH5VL1, un subconjunto seleccionado de los anticuerpos humanizados descritos en el documento WO09/098238 se usó como punto de partida para la ingeniería.

Las letras que siguen "BXh" son VH o VL o ambas. VH o VL indican una cadena pesada que tiene el isotipo IGHG1 con un dominio variable específico de la cadena pesada indicado por un número específico, p. ej. BXhVH5, o una cadena ligera que tiene el isotipo kappa con un dominio variable de cadena ligera específico indicado por un número específico, p. ej. BXhVL1, respectivamente. Cuando se presentan tanto una VH con un número específico como una VL con un número específico después de "BXh", p. ej., BXhVH5VL1, indican una molécula de anticuerpo específica que consiste en una combinación específica de cadenas pesadas y ligeras, p. ej., el anticuerpo BXhVH5VL1 se refiere a un anticuerpo que tiene la cadena pesada de BXhVH5 y la cadena ligera de BXhVL1. Las variantes humanizadas recientemente diseñadas basadas en el subconjunto seleccionado de dominios variables VH y VL descritas en el documento WO09/098238 se denominaron anticuerpos "GBR". Por el contrario, el mismo sistema de nomenclatura está en vigor con respecto a los anticuerpos GBR. Las sustituciones específicas realizadas dentro de dominios de cadena pesada variables como se usan en este documento se indican adicionalmente entre paréntesis. Todos los anticuerpos GBR eran de isotipo de cadena pesada IGHG1 con cadenas ligeras de isotipo kappa excepto que se indique lo contrario.

Ejemplo 1: Modificación de anticuerpos

De los cuarenta anticuerpos descritos en el documento WO09/098238, se seleccionaron cinco anticuerpos humanizados como entradas para la modificación: BXhVH1VL1 que tiene VH1 de dominio variable de cadena pesada (SEQ ID NO: 1) y VL1 de dominio variable de cadena ligera (SEQ ID NO: 6), BXhVH3VL1 que tiene VH3 de dominio variable de cadena pesada (SEQ ID NO: 3) y VL1 de dominio variable de cadena ligera, BXhVH3VL3 que tiene VH3 de dominio variable de cadena pesada y VL3 de dominio variable de cadena ligera (SEQ ID NO: 8), BXhVH5VL1 que tiene VH5 de dominio variable de cadena pesada (SEQ ID NO: 5) y VL1 de dominio variable de cadena ligera, y BXhVH5VL3 que tiene VH5 de dominio variable de cadena pesada y VL1 de dominio variable de cadena ligera. El anticuerpo de ratón MNAC13, como se usa en la presente memoria, tiene el dominio variable de cadena pesada MNAC13 VH con la SEQ ID N°: 20, la cadena pesada con la SEQ ID N° 21, y la cadena ligera con la SEQ ID N°: 22.

Sorprendentemente, todos los anticuerpos modificados se beneficiaron de un simple cambio de valina en alanina (mutación de retorno del ratón) en el dominio variable de la cadena pesada en la posición 37 (numeración Kabat (Kabat EA et al., *ibid*). Esta sustitución tenía la propiedad única de potenciar ampliamente la afinidad por TrkA humano entre todos los anticuerpos modificados, medida por SPR. Más importante aún, la misma sustitución condujo a un aumento de potencia en los ensayos de proliferación celular TF-1 para la mayoría de las variantes, que inesperadamente cuando se introdujo en el dominio VH5 emparejado con el dominio VL1 (anticuerpo GBR VH5 (V37A) VL1) fue un aumento de diez veces en comparación con el anticuerpo humanizado BXhVH5VL1. Notablemente, el mismo anticuerpo GBR VH5 (V37A) VL1 también exhibió un aumento de potencia tres veces en los ensayos de proliferación celular TF-1 cuando se comparó con el anticuerpo de ratón MNAC13.

Dado que un aumento en el número de residuos derivados de ratón en anticuerpos humanizados puede aumentar su riesgo de inmunogenicidad (Harding FA et al., (2010) *MAbs* 2 (3): 256-65), se realizó una investigación adicional para reducir el número de residuos en ratones en los anticuerpos modificados. El cambio del residuo lisina de ratón en la posición 3 por una glutamina en el anticuerpo GBR VH5 (V37A) VL1 dio como resultado el anticuerpo GBR VH5 (K3Q, V37A) VL1 que tiene el mismo número de restos de ratón en comparación con el anticuerpo humanizado BXhVH5VL1, pero con un aumento de la afinidad de unión, termoestabilidad de FAB equivalente al anticuerpo MNAC 13 de ratón parental y potencia inhibidora incrementada.

Finalmente, dado que las funciones efectoras mediadas por anticuerpos pueden ser perjudiciales para las terapias en las que solo se requiere el bloqueo de TrkA, es deseable desarrollar anticuerpos anti-TrkA que inhiban TrkA sin mediar la muerte de células que expresan TrkA por células inmunes. El isotipo IGHG4 humano no tiene funciones efectoras tales como ADCC o CDC, y como tal es un formato de anticuerpo particularmente adecuado cuando las funciones efectoras no son necesarias o no son perjudiciales para la terapia. Sin embargo, un inconveniente del isotipo IGHG4 humano que se produce naturalmente se conoce como el fenómeno de "intercambio FAB" mediante el cual se sabe que los anticuerpos IGHG4 humanos que se producen en la naturaleza intercambian cadenas pesadas in vivo (Labrijn AF et al., (2009) *Nat. Biotechnol.* 27(8):767-71). Métodos para bloquear el intercambio de cadena pesada entre los IGHG4 humanos recombinantes y endógenos son conocidos en la técnica y se sabe que el intercambio se bloquea eficazmente mediante la sustitución del residuo de serina en la posición 228 (numeración EU, Edelman GM et al., *ibid.*) localizado en la región bisagra por un residuo de prolina, imitando así la estructura de bisagra conformacional que se encuentra en el isotipo humano IGHG1 (Lewis KB et al., (2009) *Mol. Immunol.* 46(16):3488-94). GBR VH5 (V37A) VL1 y GBR VH5 (K3Q, V37A) VL1 se formatearon como inmunoglobulinas IGHG4 S228P para la finalidad terapéutica antes mencionada y mostraron una potencia equivalente a su contraparte

del isotipo IGHG1, haciendo tanto a GBR VH5 (V37A) VL1 IGHG4 S228P como GBR VH5 (K3Q, V37A) VL1 IGHG4 S228P anticuerpos adecuados para terapias humanas en las que solo se requiere el bloqueo de TrkA.

Métodos

Diseño de variantes modificadas

- 5 Se calculó un modelo tridimensional para el par VH5-VL1 de dominios variables utilizando el servidor de modelado de homología de estructuras SWISS-MODEL (Arnold K et al, (2006) *Bioinformatics* 22 (2): 195-201; <http://swissmodel.expasy.org>) configurado en el modo automático. La plantilla del modelo recuperado fue la estructura MNAC 13 FAB 3D resuelta experimentalmente (PDB code 1 SEQ, www.pdb.org, Berman HM et al., (2000) *Nucleic Acids Res.* 28 (1): 235-42, Covaceuszach S et al., (2005) *Proteins* 58 (3): 717 - 27). La alineación de
- 10 secuencias de los dominios MNAC13 VH, VH1, VH3, VH5 y la línea germinal VH3-023*01 (SEQ ID N°: 23) mostró diferente contenido de aminoácidos en las posiciones: 3, 5, 19, 37, 40, 42, 44, 49, 50, 52A, 53, 60, 62, 74, 82A, 83, 84, 89 y 94 (numeración de Kabat). El análisis del modelo permitió la selección de un subconjunto de posiciones en función de su influencia putativa en las regiones CDR y/o el empaquetamiento del dominio variable de la cadena ligera-cadena pesada. Este subconjunto de posiciones consistió en: 3, 37, 40, 42, 44, 49, 50, 60, 62, 89 y 94
- 15 (numeración de Kabat). Por lo tanto, los anticuerpos modificados tenían dominios variables de cadena pesada que incluían sustituciones en posiciones únicas o múltiples en las secuencias de dominio variable mencionadas anteriormente (VH1, VH3 y VH5 con SEQ ID NO: 1, 3, 5, respectivamente) seleccionadas del subconjunto de posiciones descrito anteriormente. Más específicamente, los anticuerpos modificados por ingeniería genética consistían en los dominios variables de cadena pesada sustituidos como se describió anteriormente emparejados
- 20 con uno de los dos dominios variables VL1 o VL3 de cadena ligera mencionados anteriormente (SEQ ID NO 6 y 8).

Biología Molecular

- Se crearon secuencias de ADN de codificación del dominio variable de cadena pesada (ADNc) mediante técnicas de mutagénesis estándar usando los ADN de vector para BXhVH1, BXhVH3 y BXhVH5 descritos en el documento WO 09/098238 como plantillas de PCR. De manera similar, los ADNc de dominio variable de cadena ligera se
- 25 amplificaron directamente a partir de los ADN de vector para BXhVL1 y BXhVL3 descritos en el documento WO 09/098238. Los ADNc de dominio variable se ensamblaron adicionalmente corriente arriba de sus respectivas secuencias de ADNc de dominio constante usando técnicas de ensamblaje de PCR. Finalmente, los ADNc de cadena pesada y ligera completos se ligaron en vectores independientes que se basan en un vector pcDNA3.1 modificado (Invitrogen, CA, EE.UU.) que lleva el promotor de CMV y una señal de poliadenilación de hormona de
- 30 crecimiento bovina. El vector específico de la cadena ligera permitió la expresión de las cadenas ligeras del isotipo kappa mediante ligación del ADNc del dominio variable de la cadena ligera de interés frente al ADNc del dominio constante de la cadena ligera kappa usando sitios de la enzima de restricción BamHI y BsiWI; mientras que el vector específico de cadena pesada se diseñó para permitir la ligación del ADNc de dominio variable de cadena pesada de interés frente a la secuencia de ADNc que codifica los dominios IGHG1 CH1, IGHG1 de región de bisagra, IGHG1
- 35 CH2 e IGHG1 CH3 usando sitios de enzima de restricción BamHI y Sall. En ambos vectores de expresión de cadena pesada y ligera, la secreción fue conducida por el péptido líder VJ2C murino que contiene el sitio BamHI. El sitio de la enzima de restricción BsiWI está ubicado en el dominio constante kappa; mientras que el sitio de la enzima de restricción Sall se encuentra en el dominio IGHG1 CH1.

- 40 El formato de inmunoglobulina IGHG4 que tiene sustitución S228P se logró reemplazando la secuencia de ADNc que codifica IGHG1 CH1, la región de bisagra IGHG1, los dominios constantes IGHG1 CH2 e IGHG1 CH3 para una secuencia de ADNc que codifica IGHG4 CH1, la región bisagra IGHG4 que tiene la sustitución S228P, IGHG4 CH2, y los dominios constantes IGHG4 CH3 en el vector específico de cadena pesada descrito anteriormente. La sustitución S228P se introdujo en una plantilla de ADNc de cadena pesada de IGHG4 humana mediante técnicas de mutagénesis por PCR convencionales.

45 Producción de anticuerpos

- Para la expresión transitoria de anticuerpos, se cotransfectaron cantidades iguales de vectores de cadenas pesadas y ligeras en células HEK293-EBNA1 adaptadas a la suspensión (número de catálogo ATCC®: CRL-10852) usando polietilenimina jetPEI®, transfección Polyplus, Illkirch Cedex, Francia). Típicamente, se transfectan 100 ml de células
- 50 en suspensión a una densidad de 0,8-1,2 millones de células por ml con una mezcla DNA-jetPEI® que contenía 50 µg de vector de expresión que codifica la cadena pesada y 50 µg de vector de expresión que codifica la cadena ligera. Cuando se introducen vectores de expresión recombinantes que codifican genes de anticuerpos en las células hospedadoras, se producen anticuerpos cultivando adicionalmente las células durante un período de 4 a 5 días para permitir la secreción en el medio de cultivo (EX-CELL 293, HEK293-medio libre de suero Sigma, Buchs, Suiza), complementado con ácido plurónico al 0,1%, glutamina 4 mM y geneticina al 0,25 µg/ml.

- 55 Los anticuerpos se purificaron a partir del sobrenadante libre de células usando medio de línea de proteína A recombinante (GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Suiza), y se intercambiaron tamponados en solución salina tamponada con fosfato antes de los ensayos.

Pruebas de estabilidad utilizando calorimetría de barrido diferencial

Las medidas calorimétricas se llevaron a cabo en un microcalorímetro de barrido diferencial VP-DSC (GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Suiza). El volumen celular fue de 0,128 ml, la velocidad de calentamiento fue de 200°C/h, y el exceso de presión se mantuvo a 65 p.s.i. Todos los anticuerpos se usaron a una concentración de 1 mg/ml en PBS (pH 7,4). La capacidad de calor molar de cada proteína se estimó por comparación con muestras duplicadas que contenían tampón idéntico del cual se había omitido la proteína. Las capacidades de calor molar parcial y las curvas de fusión se analizaron usando procedimientos estándar. Los termogramas se corrigieron en la línea de base y se normalizaron en la concentración antes de analizarlos posteriormente utilizando un modelo que no sea de dos estados en el software Origin (v7.0, GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Suiza).

10 Mediciones de afinidad por SPR

El análisis SPR se usó para medir las constantes de velocidad de asociación y disociación para la cinética de unión de los diferentes anticuerpos (anticuerpos de ratón y humanizados). La cinética de unión del anticuerpo de ratón y las variantes humanizadas se midieron en un instrumento BIACORE 2000 (GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Suiza) a temperatura ambiente, y se analizaron con el software BiaEvaluation (v4.1, GE Healthcare Europe GmbH, Glattbrugg, Suiza).

Dado que los anticuerpos son moléculas bivalentes, lo mejor es inmovilizar los anticuerpos en el chip sensor. Si los anticuerpos se usan como analitos, las mediciones SPR tendrán un componente de valencia además de la afinidad. Aunque el software de evaluación BIACore puede modelar la bivalencia y extraer las constantes de afinidad, es preferible eludir cualquier sesgo de valencia trabajando con un analito monovalente siempre que sea posible. Para este fin, se produjo una forma monovalente de la región extracelular TrkA humana por digestión de una proteína de fusión TrkA-Fc humana recombinante (SEQ ID N°: 24) realizada en células HEK293-EBNA1. La proteína de fusión consistía en la región extracelular TrkA humana (SEQ ID N°: 25) fusionada a una región Fc de IGHC1 en la que se incluía una secuencia de escisión específica de proteasa entre las dos regiones (secuencia de aminoácidos de proteasa de escisión de TEV: ENLYFQS). Después de la escisión de la proteasa, la forma monovalente de la región extracelular de TrkA humana se purificó adicionalmente hasta la homogeneidad usando técnicas cromatográficas estándar que incluían una etapa de proteína A para eliminar los fragmentos de Fc. Finalmente, la proteína de la región extracelular TrkA humana monovalente se intercambió con tampón en PBS antes de diluirse en tampón de funcionamiento Biacore para las mediciones de afinidad. La pureza de la muestra, la homogeneidad y el peso molecular se confirmaron mediante SDS-PAGE y análisis de exclusión por tamaños.

Los anticuerpos se inmovilizaron mediante la captura de su porción de Fc para permitir la orientación correcta en la superficie del chip sensor. Se usó un chip sensor de anticuerpo monoclonal de ratón anti-IgG humana (Fc) para capturar todos los anticuerpos humanizados independientemente de sus isotipos (kit de captura de anticuerpos de humanos, número de catálogo BR-1008-39, GE Healthcare Europe GmbH), y se usó un chip sensor de inmunoglobulina de conejo anti-ratón policlonal para capturar el anticuerpo de ratón MNAC13 (kit de captura de anticuerpos de ratón, número de catálogo BR-1008-38, GE Healthcare Europe GmbH).

Los datos (sensograma: fc2-fc1) se equiparon con un modelo Langmuir 1:1 con transferencia de masa a pesar de tener poca limitación de transferencia de masa en las pruebas de transferencia de masa. Para tener en cuenta las variaciones experimentales en el anticuerpo capturado al comienzo de cada medición, el valor de Rmax se estableció en local en todos los ajustes. Los tiempos de disociación fueron de al menos 350 segundos.

Las mediciones se realizaron por triplicado, e incluyeron muestras de concentración cero para hacer referencia. Tanto Chi2 como los valores residuales se usaron para evaluar la calidad de un ajuste entre los datos experimentales y los modelos de enlace individuales.

Ensayo de proliferación con células TF-1

Se cultivaron células TF-1 adaptadas para suspensión (ATCC® número: CRL-2003) en medio RPMI completo que contenía FCS al 10% y 5 ng/ml de rhuβNGF (beta-NGF humano recombinante, R & D Systems Europe Ltd, Abingdon, Reino Unido). Para el ensayo, las células TF-1 se incubaron durante 5 h en RPMI completo sin beta-NGF humano. Después de esta etapa de inanición, las células se centrifugaron y se sembraron en placas de 96 pocillos de fondo plano con diversas concentraciones de cada anticuerpo y una concentración fija de beta-NGF recombinante. Las células TF-1 se sembraron a una densidad de 7000 células/pocillo y el volumen total de la mezcla anticuerpo-célula fue de 200 µl con 5 ng/ml de beta-NGF humano (concentración final). Esta mezcla se incubó durante 4 días a 37°C con suplementación de CO₂. El día 3, se añadió el colorante colorimétrico Alamar azul (AbD Serotec, Morphosys AbD GmbH, Dusseldorf, Alemania) a cada pocillo sin ningún cambio en las condiciones de incubación. El día 4, se leyó la fluorescencia en un espectrofotómetro/lector de microplacas Bio-Tek Synergy™ 2 (BioTek Instruments GmbH, Luzern, Suiza) con una longitud de onda de excitación de 530 a 560 nm y una longitud de onda de emisión de 590 nm. Los experimentos se realizaron al menos dos veces y las mediciones para cada concentración de anticuerpo se realizaron por triplicado.

Resultados

Ingeniería de nuevos anticuerpos humanizados anti-TrkA basados en BXhVH5VL1

En base a un modelo 3D para el par VH5-VL1 de dominios variables, se seleccionó un subconjunto de posiciones comunes en 3D dentro de los diferentes dominios variables de la cadena pesada (VH1, VH3 y VH5) para mutaciones de ratón-a-humano y humano-a-ratón; este grupo consistió en las posiciones: 3, 37, 40, 42, 44, 49, 50, 60, 62, 89 y 94 (numeración de Kabat). La estrategia de ingeniería con respecto a la combinación de las sustituciones como se usa en este documento se basó en la complementariedad de las diferentes sustituciones en términos de su supuesta influencia sobre las regiones CDR y/o el empaquetamiento del dominio variable y/o la inmunogenicidad.

En un primer enfoque, las mutaciones de ratón a humano y de humano a ratón se diseñaron en el candidato BXhVH5VL1 en el contexto de un formato de isotipo IGHG1.

Las mutaciones de ratón a humano emprendidas incluyeron las siguientes sustituciones: K3Q, T40A, R44G, A49S, Y50A, P60A, T62S y R94K. Los rendimientos de producción y las afinidades de algunos de los anticuerpos anti-TrkA modificados basados en estas sustituciones únicas o combinadas se muestran en las tablas 1 y 2, respectivamente. La combinación de la mayoría o todas las mutaciones de ratón a humano condujeron a rendimientos de producción pobres y a la pérdida completa de la unión a TrkA. Por ejemplo, la sustitución de ratón a humano A49S combinada con Y50A indujo una abrogación completa de la unión, que no fue rescatada por las otras sustituciones de ratón a humano y las sustituciones de ratón a humano K3Q, T40A, R44G y R94K no condujeron a ninguna mejora en la afinidad, ya sea solo o en combinación con otras sustituciones de ratón a ser humano.

Las mutaciones de humano a ratón emprendidas incluyeron las siguientes sustituciones: V37A, G42E y V89L. La sustitución de humano a ratón V37A tuvo el impacto más positivo y condujo a un aumento de afinidad al menos doble (K_D disminuyó en al menos dos veces) (Tabla 2 y Figura 1); se registró un aumento de afinidad de 2,5 veces para el anticuerpo GBR VH5 (V37A) VL1 IGHG1. Este aumento en la afinidad se anuló cuando se combinó la sustitución de humano a ratón V37A con las sustituciones de ratón a humano P60A y T62S, pero se mantuvo cuando se hicieron combinaciones con sustituciones de ratón a humano K3Q y/o R44G. Tomados en conjunto, estos resultados identificaron la importancia de las posiciones 49 y 50 para permitir la unión y la propiedad única de la sustitución V37A de humano a ratón para potenciar la afinidad de BXhVH5VL1 por al menos dos veces. Dado que las funciones efectoras mediadas por anticuerpos pueden ser perjudiciales para terapias en las que solo se requiere el bloqueo de TrkA, el GBR VH5 (V37A) VL1 y GBR VH5 (K3Q, V37A) VL1 se reformatearon en el isotipo IGHG4 mencionado anteriormente que tiene la sustitución S228P. Ambos anticuerpos modificados mostraron afinidades similares a sus contrapartes de isotipo IGHG1, lo que indica que la mejora de afinidad producida por la sustitución de V37A no se vio afectada por el cambio de isotipo.

Ingeniería de nuevos anticuerpos anti-TrkA humanizados basados en BXhVH1VL1, BXhVH3VL1, BXhVH3VL1 y BXhVH5VL3

En un segundo enfoque, la sustitución de V37A se introdujo en los otros candidatos seleccionados procedentes del documento WO 09/098238, y las afinidades de los anticuerpos anti-TrkA modificados por PCR frente a los anticuerpos BXhVH5VL1 y MNAC13 por SPR. Las tablas 3 y 4 muestran, respectivamente, los rendimientos de producción y las afinidades de los anticuerpos sustituidos con V37A. Aunque los anticuerpos modificados tenían diferencias en sus rendimientos de producción, todos los anticuerpos modificados exhibieron una mejora en la afinidad tras la introducción de la sustitución de V37A. Las afinidades mejoraron en 8, 20, 30 y 55% para BXhVH3VL1, BXhVH1VL1, BXhVH3VL3 y BXhVH5VL3, respectivamente. Por lo tanto, la sustitución de V37A de humano a ratón no solo condujo a un aumento de la afinidad cuando se introdujo en BXhVH5VL1 sino que, y de forma más inesperada, también condujo a un aumento de la afinidad entre todas las variantes humanizadas. Notablemente, GBR VH5 (V37A) VL1 o GBR VH5 (K3Q, V37A) VL1, ambos como el isotipo IGHG1 o IGHG4 S228P, tenían afinidades que coincidían con la afinidad medida para el anticuerpo de ratón MNAC13 (Tablas 2 y 4); ambos se incrementaron al menos dos veces en comparación con el anticuerpo BXhVH5VL1 (K_D disminuyó en 2,5 a 2,7 veces, respectivamente).

La Tabla 3 y la Figura 2 incluyen las temperaturas de fusión de las porciones de FAB medidas dentro de los anticuerpos modificados genéticamente. Los perfiles de fusión de los anticuerpos monoclonales son característicos de sus isotipos, pero la temperatura de fusión del punto medio (T_m) del fragmento FAB se puede identificar fácilmente incluso en el contexto de una inmunoglobulina de longitud completa (Garber E y Demarest SJ (2007) Biochem. Biophys. Res. Commun. 355(3):751-7). Tal fusión de punto medio de la porción FAB se usó para controlar la estabilidad de los candidatos modificados. Los fragmentos GBR VH5 (V37A) VL1 y GBR VH5 (K3Q, V37A) VL1 FAB mostraban cada uno una transición única a 73,6 y 73°C respectivamente, ambos con termoestabilidad equivalente con una forma y una amplitud de la transición FAB coherente con una desnaturalización cooperativa que generalmente se observa para un fragmento FAB plegado de forma compacta que indica que el proceso de ingeniería fue exitoso para retener la estabilidad de FAB. Esto se ejemplifica más, cuando se compara la T_m de FAB de GBR VH5 (V37A) VL1 o GBR VH5 (K3Q, V37A) VL1 con la T_m de MNAC13 FAB (74°C), estando las diferencias dentro de 1°C o menos.

Pruebas funcionales de anticuerpos anti-TrkA modificados

Los anticuerpos anti-TrkA modificados genéticamente se analizaron en cuanto a su capacidad para inhibir la activación funcional de TrkA en ensayos de proliferación celular TF-1 (Figura 3). Se calculó la mitad de la concentración inhibitoria máxima (IC50) que es una medida de la eficacia de un compuesto para inhibir la función biológica para cada curva y los resultados se dan en la Tabla 5. Téngase en cuenta que GBR VH1 (V37A) VL1 no se analizó debido a su menor afinidad por SRP.

Se encontró que GBR VH5 (V37A) VL1 fue el mejor ejecutado seguido de GBR VH5 (K3Q, V37A) VL1, GBR VH5 (K3Q, V37A) VL1, IGHG4 S228P y GBR VH3 (V37A) VL1 que tenían IC50 idénticos. Los anticuerpos GBR VH3 (V37A) VL3 y GBR VH5 (V37A) VL3 tenían IC50 ligeramente más altos, pero todos los anticuerpos modificados probados se desempeñaron mejor que BXhVH5VL1, GBR VH5 (V37A) VL1 fue diez veces mejor. Notablemente, el anticuerpo GBR VH5 (V37A) VL1 también exhibió un aumento de potencia de tres veces en ensayos de proliferación de células TF-1 en comparación con el anticuerpo de ratón MNAC13. Todas las variantes de V37A tenían una IC50 equivalente o mejor en comparación con el anticuerpo parental de ratón.

Tabla 1: rendimientos de producción a partir de una selección de anticuerpos anti-TrkA modificados basados en BXhVH5VL1; todos los anticuerpos son del isotipo IGHG1 excepto que se indique lo contrario. (*) Isotipo IGHG4 con la sustitución S228P. † Incluye mutaciones de ratón a ser humano y de ser humano a ratón como se describe en el Ejemplo 1.

Anticuerpos anti-TrkA humanizados	SEQ ID Nos.	Número de mutaciones	Expresión transitoria (mg/l)
BXhVH5VL1	28, 29	8	10
GBR VH5 (K3Q) VL1	50, 29	7	16
GBR VH5 (V37A) VL1	51, 29	9	19
GBR VH5 (V37A) VL1 (*)	52, 29	9	11
GBR VH5 (G42E) VL1	53, 29	9	19
GBR VH5 (V89L) VL1	54, 29	9	17
GBR VH5 (R94K) VL1	55, 29	7	15
GBR VH5 (K3Q, V37A) VL1	56, 29	8	52
GBR VH5 (K3Q, V37A) VL1 (*)	57, 29	8	11
GBR VH5 (K3Q, T40A) VL1	58, 29	6	3
GBR VH5 (P60A, T62S) VL1	59, 29	6	7
GBR VH5 (K3Q, V37A, R44G) VL1	60, 29	7	24
GBR VH5 (K3Q, A49S, Y50A) VL1	61, 29	5	15
GBR VH5 (K3Q, P60A, T62S) VL1	62, 29	5	7
GBR VH5 (K3Q, T40A, P60A, T62S) VL1	63, 29	4	8
GBR VH5 (K3Q, V37A, T40A, P60A, T62S) VL1	64, 29	5	12
GBR VH5 (K3Q, T40A, R44G, A49S, Y50A) VL1	65, 29	3	22
GBR VH5 (K3Q, A49S, Y50A, P60A, T62S) VL1	66, 29	3	16
GBR VH5 (K3Q, T40A, R44G, A49S, Y50A, P60A, T62S) VL1	67, 29	1	3
GBR VH5 (K3Q, T40A, R44G, A49S, Y50A, P60A, T62S, R94K) VL1	68, 29	0	3

ES 2 666 126 T3

Tabla 2: afinidades de una selección de anticuerpos anti-TrkA modificados basados en BXhVH5VL1; todos los anticuerpos son del isotipo IGHG1 excepto que se indique lo contrario. (*) Isotipo IGHG4 con sustitución S228P. N.B. indica que no hay enlace.

Anticuerpos humanizados anti-TrkA	K _D (nM)
BXhVH5VL1	40,9
GBR VH5 (V37A) VL1	16
GBR VH5 (V37A) VL1 (*)	15
GBR VH5 (R94K) VL1	52
GBR VH5 (K3Q, V37A) VL1	15,4
GBR VH5 (K3Q, V37A) VL1 (*)	15
GBR VH5 (K3Q, V37A, R44G) VL1	20
GBR VH5 (K3Q, A49S, Y50A) VL1	N.B.
GBR VH5 (K3Q, V37A, T40A, P60A, T62S) VL1	48
GBR VH5 (K3Q, T40A, R44G, A49S, Y50A) VL1	N.B.
GBR VH5 (K3Q, A49S, Y50A, P60A, T62S) VL1	N.B.
GBR VH5 (K3Q, T40A, R44G, A49S, Y50A, P60A, T62S) VL1	N.B.
GBR VH5 (K3Q, T40A, R44G, A49S, Y50A, P60A, T62S, R94K) VL1	N.B.

5 Tabla 3: rendimientos de producción y datos de termoestabilidad FAB de una selección de anticuerpos anti-TrkA modificados genéticamente; todos los anticuerpos son del isotipo IGHG1.

Anticuerpos anti-TrkA	SEQ ID Nos.	Expresión (mg/l)	T _m Fab (°C)
MNAC13	21,22	5	74
BXhVH1VL1	26,29	10	64,7
GBR VH1(V37A)VL1	69,29	16	65,3
BXhVH3VL1	27,29	9	71,3
GBR VH3(V37A)VL1	70,29	1	70,2
BXhVH3VL3	27,30	6	71
GBR VH3(V37A)VL3	70,30	9	69,3
BXhVH5VL1	28,29	16	76,5
GBR VH5(V37A)VL1	51,29	19	73,6
GBR VH5(K3Q,V37A)VL1	56,29	52	73
BXhVH5VL3	28,30	16	76,4
GBR VH5(V37A)VL3	51,30	19	73,3

Tabla 4: afinidades de los anticuerpos anti-TrkA modificados por ingeniería genética de V37A; todos los anticuerpos son del isotipo IGHG1.

Anticuerpos anti-TrkA	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (nM)
MNAC13	$6,02 \times 10^4$	$1,09 \times 10^{-3}$	18
BXhVH1VL1	$3,13 \times 10^4$	$1,33 \times 10^{-2}$	426
GBR VH1 (V37A) VL1	$1,96 \times 10^4$	$6,63 \times 10^{-3}$	338
BXhVH3VL1	$4,65 \times 10^4$	$6,19 \times 10^{-3}$	133
GBR VH3 (V37A) VL1	$3,82 \times 10^4$	$4,71 \times 10^{-3}$	123
BXhVH3VL3	$3,14 \times 10^4$	$4,59 \times 10^{-3}$	134
GBR VH3 (V37A) VL3	$3,1 \times 10^4$	$2,95 \times 10^{-3}$	95
BXhVH5VL1	$1,04 \times 10^5$	$4,26 \times 10^{-3}$	40,9
GBR VH5 (V37A) VL1	$1,4 \times 10^5$	$2,25 \times 10^{-3}$	16
GBR VH5 (K3Q, V37A) VL1	$1,7 \times 10^5$	$2,62 \times 10^{-3}$	15,4
GBR VH5VL3	$6,23 \times 10^4$	$3,95 \times 10^{-3}$	63
GBR VH5 (V37A) VL3	$7,45 \times 10^4$	$2,05 \times 10^{-3}$	28

5 Tabla 5: Ensayos IC50 de proliferación celular TF-1 para anticuerpos anti-TrkA modificados por V37A, todos los anticuerpos son del isotipo IGHG1 excepto que se indique lo contrario. (*) Isotipo IGHG4 con sustitución S228P. N.D. indica no determinado.

Anticuerpos anti-TrkA	IC50 ($\mu\text{g/ml}$)
MNAC13	0,23
BXhVH5VL1	0,73
GBR VH1(V37A)VL1	N.D.
GBR VH3(V37A)VL1	0,15
GBR VH3(V37A)VL3	0,29
GBR VH5(V37A)VL1	0,075
GBR VH5(K3Q,V37A)VL1	0,15
GBR VH5(K3Q,V37A)VL1(*)	0,15
GBR VH5(V37A)VL3	0,22

Ejemplo 2: anticuerpo anti-TrkA humanizado revierte la hiperalgesia inflamatoria aguda de la pata inducida por inyección intraplantar de CFA.

- 10 La inyección intraplantar de adyuvante completo de Freund (CFA) en una de las patas traseras de los ratones causa hiperalgesia inflamatoria aguda que puede evaluarse usando el método de soporte de peso. Los ratones no modificados normalmente distribuyen su peso corporal por igual entre sus dos patas traseras. Sin embargo, cuando la pata posterior inyectada con CFA está inflamada y es dolorosa, el peso se redistribuye para disminuir el que se coloca en la pata inyectada (ipsilateral) y aumenta éste en la pata trasera no inyectada (contralateral).

15 Métodos

Se midió la carga de peso a través de cada extremidad posterior usando un analizador de la incapacidad (Linton Instruments, Reino Unido). Los ratones se colocaron en el probador de incapacidad con las patas traseras en

sensores separados y la fuerza promedio ejercida por ambas extremidades posteriores se registró durante 2 segundos. Los ratones AMB1 no modificados se aclimataron a la sala de procedimientos en sus jaulas, con alimentos y agua disponibles a voluntad. Los ratones AMB1 se generaron mediante la sustitución del exón 1 de TrkA de ratón por el de su equivalente humano y, como tales, expresan exclusivamente la proteína TrkA humana. La habituación al probador de incapacidad se realizó durante varios días. Las grabaciones del soporte del peso de la línea de base se tomaron antes de la inducción de la agresión. La hiperalgesia inflamatoria fue inducida por inyección intraplantar de CFA (20 μ l de solución de 1,5 mg/ml) en la pata trasera izquierda. Se tomó una lectura del soporte del peso pretratamiento para evaluar la hiperalgesia 23 horas después de la CFA. Los animales se clasificaron y aleatorizaron de acuerdo con la ventana CFA en un diseño de cuadrado latino. 24 horas después de CFA, los animales se trataron con una única inyección i.p. de 0,1 mg/kg del isotipo control i.p. o 0,0001, 0,001, 0,01 y 0,1 mg/kg del anticuerpo GBR VH5 (K3Q, V37A) VL1 IGHG4 S228P i.p. (volumen de dosis de 10 ml/kg). La NSAID indometacina no selectiva se usó como control positivo a 10 mg/kg p.o. (volumen de dosis de 5 ml/kg). Las lecturas de soporte del peso se tomaron a las 4, 8, 24, 48, 72, 96 y 120 horas después del tratamiento con anticuerpo/fármaco.

Las evaluaciones conductuales se realizaron a ciegas. Se tomaron lecturas de carga (g) para las patas traseras ipsilaterales y contralaterales y se expresaron como el % de la diferencia del soporte del peso (% ipsi/contra). Los datos se analizaron comparando los grupos de tratamiento con el grupo de control del isotipo en cada punto de tiempo. El análisis estadístico se realizó como un ANOVA de medidas repetidas seguido de una prueba de comparación planificada usando InVivoStat, ($p < 0,05$ considerado significativo).

20 Resultados

La inyección intraplantar de CFA indujo hiperalgesia marcada como se detectó 23 horas después de CFA por un cambio en el peso soportado de la pata posterior ipsilateral frente a la pata posterior contralateral resultando en una caída en la relación del % ipsi/contra (Fig. 4). El tratamiento de control de isotipo iniciado 24 horas después de CFA no mostró ningún efecto sobre la hiperalgesia. Se observó una reversión significativa de la hiperalgesia con 0,01 y 0,1 mg/kg del anticuerpo GBR VH5 (K3Q, V37A) VL1 IGHG4 S228P de 4 a 48 horas después de la dosis en comparación con el control del isotipo. Las dosis de 0,001 mg/kg del anticuerpo GBR VH5 (K3Q, V37A) VL1 IGHG4 S228P o inferior fueron ineficaces para revertir la hiperalgesia. La indometacina (10 mg/kg) mostró una reversión significativa de la hiperalgesia en todos los puntos de tiempo probados. En conclusión, el anticuerpo GBR VH5 (K3Q, V37A) VL1 IGHG4 S228P produjo una reversión significativa de la hiperalgesia inflamatoria aguda de la pata similar a la indometacina. Además, las dosis efectivas de GBR VH5 (K3Q, V37A) VL1 IGHG4 S228P administradas (0,01 y 0,1 mg/kg) son muchas veces menores que la dosis efectiva de indometacina (10 mg/kg), lo que demuestra que el anticuerpo anti-TrkA puede ser administrado en una dosis mucho más baja que el tratamiento estándar para esta condición.

Ejemplo 3: el anticuerpo humanizado anti-TrkA revierte la hiperalgesia inflamatoria crónica de la articulación de la rodilla inducida por inyección intraarticular de CFA

La inyección intraarticular de CFA en una de las articulaciones de la rodilla de las extremidades posteriores de ratones induce hiperalgesia inflamatoria crónica que puede evaluarse usando el método del soporte del peso. Cuando la articulación inyectada con CFA está inflamada y es dolorosa, el peso se redistribuye para disminuir el que se coloca en la extremidad con la articulación inyectada (ipsilateral) y se aumenta en la extremidad con la articulación no inyectada (contralateral). Se cree que el desarrollo de estos signos en este modelo animal es clínicamente relevante, ya que reflejan los síntomas mostrados por pacientes que presentan dolor articular inflamatorio crónico asociado con afecciones subyacentes tales como la osteoartritis y la artritis reumatoide.

Métodos

Ratones no modificados AMB1 se aclimataron a la sala de procedimientos en sus jaulas, con alimentos y agua disponibles a voluntad. Los ratones AMB1 se generaron mediante la sustitución del exón 1 de TrkA de ratón por el de su equivalente humano y, como tales, expresan exclusivamente la proteína TrkA humana. Se realizó la habituación al probador de incapacidad. Las lecturas del peso de referencia se tomaron inmediatamente antes de la inyección de CFA. Los animales se anestesiaron usando isoflurano y oxígeno mezclado 3:1 en condiciones estériles. El área de la rodilla se rasuró y se limpió con una solución diluida de Hibiscrub. La rodilla izquierda se inyectó con 10 μ l de 10 mg/ml de CFA. Se permitió que los animales se recuperaran en un ambiente cálido antes de regresar a su jaula de origen. Los animales se evaluaron para el desarrollo de hiperalgesia inflamatoria usando el método de soporte de peso los días 4, 7 y 10 después de CFA. Con base en la medición del día 10 posterior a CFA, los animales se clasificaron y aleatorizaron a grupos de tratamiento según su ventana CFA. A los 13 días después del CFA cuando la hiperalgesia estaba bien establecida, los animales se trataron con una única inyección de anticuerpo de control de isotipo a 10 mg/kg i.p. o el anticuerpo GBR VH5 (K3Q, V37A) VL1 IGHG4 S228P a 0,01, 1 y 10 mg/kg i.p. El NSAID selectivo para COX-2 celecoxib se utilizó como control positivo a 60 mg/kg p.o. dos veces al día. Para los grupos tratados con anticuerpo, se midió el soporte de peso a las 4, 8, 24 y 96 horas después de la dosificación. Para el grupo tratado con celecoxib, se midió la carga de peso a las 1 y 8 horas después de la dosificación el día 13 después de CFA y luego a 1 hora después de la dosificación en los días 14-17 post-CFA. Las evaluaciones conductuales se realizaron a ciegas. Se tomaron las lecturas de carga de peso (g) para las extremidades traseras

ipsilaterales y contralaterales y se expresaron como el % de la diferencia de soporte del peso (% ipsi/contra). Los datos se analizaron comparando los grupos de tratamiento con el grupo de control de isotipo en cada punto de tiempo. El análisis estadístico se realizó como un ANOVA de medidas repetidas seguido de una prueba de comparación planificada usando InVivoStat, ($p < 0,05$ considerado significativo).

5 Resultados

La inyección de CFA en la articulación de la rodilla causó hiperalgia marcada y duradera desde el día 3 en adelante, como se detectó por un cambio en el soporte del peso desde la extremidad posterior ipsilateral a la contralateral, resultando en una caída en la relación % ipsi/contra (Fig. 5). El tratamiento con anticuerpo de control de isotipo no tuvo efecto sobre la hiperalgia. Se observó una reversión significativa de la hiperalgia con celecoxib (60 mg/kg) 1 hora después de la dosis durante el transcurso del tratamiento. Se observó una reversión significativa de la hiperalgia con una única inyección de 0,01, 1 y 10 mg/kg del anticuerpo GBR VH5 (K3Q, V37A) VL1 IGHG4 S228P a partir de las 4-72 horas posteriores a la dosis, siendo solo las dos dosis más altas significativas a las 96 horas cuando se comparaba con el control de isotipo. En conclusión, una dosis única de 0,01 mg/kg del anticuerpo GBR VH5 (K3Q, V37A) VL1 IGHG4 S228P o superior produjo una reversión significativa y sostenida de la hiperalgia inflamatoria crónica de la articulación de la rodilla similar a las dosis múltiples de celecoxib. Además, solo se requirió una dosis única de 0,01 mg/kg del anticuerpo GBR VH5 (K3Q, V37A) VL1 IGHG4 S228P para lograr un efecto en comparación con dosis múltiples de celecoxib a 60 mg/kg, lo que indica que el anticuerpo GBR VH5 (K3Q, V37A) VL1 IGHG4 S228P se puede administrar a una dosis mucho más baja y con menor frecuencia que el NSAID celecoxib, que es el estándar actual de atención.

20 Ejemplo 4: el anticuerpo humanizado anti-TrkA revierte la hiperalgia osteoartrítica crónica de la articulación de la rodilla inducida por inyección intraarticular de MIA

La inyección intraarticular de yodoacetato monosódico (MIA) en la articulación de la rodilla de ratones conduce al desarrollo de hiperalgia crónica asociada con la inflamación de las articulaciones locales junto con la degradación del cartílago. Como tal, la hiperalgia medida en el modelo MIA se parece mucho al dolor asociado a la osteoartritis. Además, la degradación del cartílago conduce a un daño neuronal crónico con características de tipo neuropático. Dado que la pregabalina, un fármaco anticonvulsivo es el medicamento de primera línea recomendado en el tratamiento del dolor neuropático, se usa en este caso como un compuesto de comparación. El tramadol, un agonista del receptor μ -opioides débil, se usa cada vez más para el tratamiento de la OA porque, a diferencia de los NSAID, el tramadol no produce hemorragia gastrointestinal o problemas renales ni afecta el cartílago articular. Por esta razón, se utilizó tramadol junto con pregabalina como un comparador del anticuerpo GBR VH5 (K3Q, V37A) VL1 IGHG4 S228P.

Métodos

Los ratones AMB1 sin modificar se aclimataron a la sala de procedimientos en sus jaulas, con alimentos y agua disponibles a voluntad. Los ratones AMB1 se generaron mediante la sustitución del exón 1 de TrkA de ratón por el de su equivalente humano y, como tales, expresan exclusivamente la proteína TrkA humana. La habituación al probador de incapacidad se realizó durante varios días. Se tomaron mediciones de lecturas de carga de la línea de base. Los animales se anestesiaron usando isoflurano y oxígeno mezclado 3:1 en condiciones estériles. El área de la rodilla se rasuró y se limpió con una solución diluida de Hibiscrub. Se inyectó MIA, 5 μ l de 100 mg/ml (500 μ g) o solución salina (simulación) en la articulación de la rodilla de la pata trasera izquierda. Se permitió que los animales se recuperaran en un ambiente cálido, antes de regresar a su jaula de origen. En los días 3 - 23 post-MIA, los animales fueron evaluados a intervalos regulares utilizando el soporte de peso para el desarrollo de la hiperalgia de la articulación de la rodilla. El día 14 post-MIA, se tomaron mediciones de la carga de peso y los animales se clasificaron y aleatorizaron a grupos de tratamiento de acuerdo con su ventana de respuesta de MIA seguido del tratamiento con una única inyección i.p. de 1, 10, 100 μ g/kg del anticuerpo GBR VH5 (K3Q, V37A) VL1 IGHG4 S228P o 100 μ g/kg de anticuerpo de control de isotipo (5 ml/kg de volumen de dosis). Como control de comparación, los animales se trataron el día 14 después de MIA con tramadol a 10 mg/kg o pregabalina a 30 mg/kg p.o. (Volumen de dosis de 5 ml/kg) seguido de tramadol a 30 mg/kg o pregabalina a 100 mg/kg cada dos días los días 16-22 post-MIA (volumen de dosis de 5 ml/kg). Todos los animales se evaluaron usando el peso soportado a las 4, 8 y 24 horas después de la dosificación en el día 14 post MIA seguido de cada 24 horas para los grupos tratados con anticuerpo y 1 y 24 horas después de la dosis para los grupos tratados con tramadol y pregabalina. Las evaluaciones conductuales se realizaron a ciegas. Se tomaron las lecturas de carga de peso (g) para las extremidades traseras ipsilaterales y contralaterales y se expresaron como el % de la diferencia de peso (% ipsi/contra). Los datos se analizaron comparando los grupos de tratamiento con el grupo simulado en cada punto de tiempo (días 3-14 post-MIA), para los efectos del MIA sobre la hiperalgia. Los datos posteriores a la dosificación se analizaron comparando los grupos de tratamiento con el grupo de control de isotipo en cada punto de tiempo. El análisis estadístico se realizó como un ANOVA de medidas repetidas seguido de una prueba de comparación planificada usando InVivoStat, ($p < 0,05$ considerado significativo).

Resultados

La inyección de MIA a 500 µg en la articulación de la rodilla causó una marcada hiperalgesia desde el día 3 en adelante, como se detectó por un cambio en el peso desde la extremidad posterior ipsilateral a la contralateral, resultando en una caída en la relación % ipsi/contra. Se observó una reversión significativa de la hiperalgesia con una sola inyección de 10 y 100 µg/kg del anticuerpo GBR VH5 (K3Q, V37A) VL1 IGHG4 S228P a partir de 4 horas, 7 días después de la dosis en comparación con el control del isotipo en cada punto temporal (Fig. 6A). El anticuerpo GBR VH5 (K3Q, V37A) VL1 IGHG4 S228P a 1 µg/kg no tuvo efecto sobre la hiperalgesia. El tramadol (10 mg/kg) y la pregabalina (30 mg/kg) no tuvieron ningún efecto una hora después de la dosificación el día 14 post MIA, pero mostraron una reversión significativa de la hiperalgesia a las 4 horas después de la dosis (Fig. 6B). Debido a la falta de efecto 1 hora después de la dosificación en el día 14 post-MIA, el tramadol se aumentó a 30 mg/kg y la pregabalina se incrementó a 100 mg/kg, que mostraron una reversión significativa de la hiperalgesia una hora después de la dosis el día 16, 18 y 20 post-MIA. En conclusión, una dosis única de 10 µg/kg del anticuerpo GBR VH5 (K3Q, V37A) VL1 IGHG4 S228P o superior dio una reversión significativa y sostenida de la hiperalgesia osteoarticular crónica de la articulación de la rodilla similar a las dosis múltiples de tramadol y pregabalina. Además, solo se requirió una dosis única del anticuerpo GBR VH5 (K3Q, V37A) VL1 IGHG4 S228P a 10 µg/kg para lograr un efecto en comparación con las dosis múltiples de dos fármacos, el tramadol y la pregabalina, utilizados en dosis mucho más altas (30 mg/kg y 100 mg/kg, respectivamente). Por lo tanto, el anticuerpo anti-TrkA se puede administrar a una dosis mucho más baja y con una frecuencia de dosificación más baja que la pregabalina y el tramadol.

Ejemplo 5: el anticuerpo humanizado anti-TrkA revierte la hiperalgesia neuropática periférica y la alodinia inducida por la lesión por constricción crónica del nervio ciático

El dolor neuropático periférico es una forma crónica de dolor que surge de una lesión, disfunción o enfermedad del sistema nervioso periférico. Típicamente comprende hiperalgesia (respuesta aumentada a estímulos dolorosos) así como alodinia (respuesta dolorosa a estímulos no dolorosos). El dolor neuropático puede ser inducido en animales por lesión experimental de los nervios periféricos y esto se logra típicamente por una lesión por constricción crónica (CCI) del nervio ciático mediante ligadura suelta (Bennett y Xie (1998) Pain, 33: 87-107). Como la pregabalina es el medicamento de primera línea recomendado en el tratamiento del dolor neuropático, se usa en este documento como un compuesto comparador.

Métodos

La cirugía de CCI se realizó en ratones AMB1 machos y hembras bajo anestesia con ketamina xilazina (100 y 10 mg/kg/10 ml, i.p.). Los ratones AMB1 se generaron mediante la sustitución del exón 1 de TrkA de ratón por el de su equivalente humano y, como tales, expresan exclusivamente la proteína TrkA humana. Después del recorte del cabello, el nervio ciático izquierdo se expuso a la mitad del muslo, de forma aséptica. Se colocaron tres ligaduras sueltas (usando seda negra 4-0) alrededor del nervio ciático a 1-2 mm antes de la ramificación del nervio. El sitio quirúrgico se trató con solución de betadina después de la sutura de la piel. Se permitió que los animales se recuperaran durante los siguientes siete días. Un día antes del experimento, los animales se aclimataron al dispositivo de medición (placa fría) y se registraron los umbrales de retirada de la pata previa a la dosis (0 h). Los animales fueron reagrupados en seis grupos. Al día siguiente, los animales fueron tratados con una sola inyección i.p. de anticuerpo de control de isotipo (1000 µg/kg/10 ml) o diferentes dosis del anticuerpo GBR VH5 (K3Q, V37A) VL1 IGHG4 S228P (10, 100 y 1000 µg/kg/10 ml). Se administraron pregabalina (30 mg/kg/10ml, p.o.) o solución salina una vez al día durante un período de siete días después de la dosis. Las lecturas posteriores a la dosis se registraron a las 4 h, 24 h y luego cada dos días hasta el 7º día después de la dosis. Las lecturas posteriores a la dosis se registraron 1 h después de la administración de pregabalina o solución salina todos los días. Las lecturas posteriores a la dosis se registraron primero para la hiperalgesia mecánica y 5 minutos más tarde para la alodinia en frío. La hiperalgesia mecánica se midió como la fuerza umbral (g) requerida para provocar la retirada de la pata usando un esteticómetro plantar dinámico (instrumento Plantar Von Frey, Ugo Basile Srl, Italia). La alodinia en frío se midió como el tiempo necesario para retirar la pata de una placa fría en segundos (IITC Life Science Inc., EE.UU.).

Resultados

Siete días después de la cirugía CCI, los ratones exhibieron una marcada hiperalgesia mecánica (Fig. 7A) y alodinia en frío (Fig. 7B) como se ve por una fuerte reducción en el umbral de la retirada de la pata y el tiempo de latencia de la retirada de la pata, respectivamente. Todas las dosis del anticuerpo GBR VH5 (K3Q, V37A) VL1 IGHG4 S228P dieron una reversión de la hiperalgesia mecánica, como se ve por un aumento en el umbral de la retirada de la pata (Fig. 7A) y la alodinia en frío (Fig. 7B), como se ve por un aumento en la latencia de la retirada de la pata. El alcance y la duración de esta reversión fueron claramente dependientes de la dosis y fueron comparables a la pregabalina en la dosis más alta de 1 mg/kg (1000 µg/kg) para ambas lecturas. Esta dosis del anticuerpo GBR VH5 (K3Q, V37A) VL1 IGHG4 S228P de 1 mg/kg fue efectiva cuando se administró en una sola dosis, en comparación con dosis múltiples de pregabalina de 30 mg/kg, mostrando nuevamente que el anticuerpo anti-TrkA puede administrarse a una dosis más baja y una frecuencia de dosificación más baja en comparación con el tratamiento estándar de pregabalina.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Glenmark Pharmaceuticals S.A.

<120> Anticuerpos anti-Trka con mejores propiedades inhibitoras y derivados de los mismos

5 <130> PCT

<150> US 61/657,184
 <151>08-06- 2012

10 <160> 116

<170> PatentIn versión 3.3

15 <210> 1
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Dominio VH1

<400> 1
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30
 Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Tyr Ile Ser Lys Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

25 <210> 2
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Dominio VH2

<400> 2

ES 2 666 126 T3

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 3
<211> 123
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Dominio VH3

10 <400> 3
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

Ala Tyr Ile Ser Lys Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Lys Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

15 <210> 4
<211> 123

ES 2 666 126 T3

<212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Dominio VH4

<400> 4
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30
 Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Tyr Ile Ser Lys Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

10 <210> 5
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Dominio VH5

<400> 5

ES 2 666 126 T3

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 6
<211> 106
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Dominio VL1

10 <400> 6
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 Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

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

Thr Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
85 90 95

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

15 <210> 7
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial

ES 2 666 126 T3

<220>

<223> Dominio VL2

<400> 7

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 Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

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

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

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

Asp Ala Ala Asp Tyr Tyr Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
 85 90 95

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

<210> 8

<211> 106

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> Dominio VL3

15 <400> 8

Gln 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 Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

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

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

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

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
 85 90 95

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

20 <210> 9

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial

ES 2 666 126 T3

<220>

<223> Dominio VL4

<400> 9

Gln 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 Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

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

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

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

Asp Ala Ala Asp Tyr Tyr Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
85 90 95

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

<210> 10

<211> 106

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> Dominio VL5

15 <400> 10

Gln 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 Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

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

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

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

Asp Ala Ala Asp Tyr Tyr Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
85 90 95

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

<210> 11

<211> 106

20 <212> PRT

ES 2 666 126 T3

<213> Artificial

<220>

<223> Dominio VL6

5

<400> 11

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

Glu Glu Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

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

Thr Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Thr Phe Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Asp Tyr Tyr Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
85 90 95

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

10

<210> 12

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial

15

<220>

<223> Dominio VL7

<400> 12

Gln 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 Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

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

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

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

Asp Ala Ala Asp Tyr Tyr Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
85 90 95

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

20

<210> 13

<211> 106

<212> PRT

ES 2 666 126 T3

<213> Artificial

<220>
<223> Dominio VL8

5 <400> 13
 Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Glu Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

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

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

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

Asp Ala Ala Asp Tyr Tyr Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
 85 90 95

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

10 <210> 14
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> CDR1 del dominio variable de la cadena pesada

<400> 14
 Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Thr Met Ser
 1 5 10

20 <210> 15
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> CDR2 del dominio variable de la cadena pesada

<400> 15
 Tyr Ile Ser Lys Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys
 1 5 10 15

30 Gly

<210> 16
 <211> 14
 <212> PRT

35 <213> Artificial

<220>
 <223> CDR3 del dominio variable de la cadena pesada

40 <400> 16

ES 2 666 126 T3

Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 17
 <211> 10
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> CDR1 del dominio variable de la cadena ligera

10 <400> 17
 Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
 1 5 10

15 <210> 18
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> CDR2 del dominio variable de la cadena ligera

<400> 18
 Thr Thr Ser Asn Leu Ala Ser
 1 5

25 <210> 19
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> CDR3 del dominio variable de la cadena ligera

<400> 19
 His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr Phe
 1 5 10

35 <210> 20
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> Dominio VH de MNAC13

<400> 20
 Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 45 1 5 10 15

ES 2 666 126 T3

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 21
<211> 446
<212> PRT
<213> Artificial

5

<220>
<223> Cadena pesada de MNAC13

10

<400> 21
Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

ES 2 666 126 T3

Ala Arg Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Lys Thr Thr Pro Pro
115 120 125

Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met
130 135 140

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

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

Ala Val Leu Glu Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Pro Arg Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His
195 200 205

Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys
210 215 220

Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe
225 230 235 240

Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro
245 250 255

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

Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr
275 280 285

Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu
290 295 300

Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys
305 310 315 320

Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
325 330 335

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

ES 2 666 126 T3

Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile
 355 360 365

Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly
 370 375 380

Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asn Thr Asn
 385 390 395 400

Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp
 405 410 415

Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His
 420 425 430

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

<210> 22
 <211> 212
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cadena ligera de MNAC13

10 <400> 22
 Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Glu Glu Ile Thr Leu Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45

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

Gly Ser Gly Thr Phe Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Val Glu Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Asp Tyr Tyr Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
 85 90 95

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

ES 2 666 126 T3

Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala
 115 120 125

Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val
 130 135 140

Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser
 145 150 155 160

Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr
 165 170 175

Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys
 180 185 190

Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn
 195 200 205

Arg Asn Glu Cys
 210

<210> 23
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<220>
 <221> Dominio VH3-23*01
 <222> (1)..(98)

10

<400> 23
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Lys

15

<210> 24
 <211> 628
 <212> PRT
 <213> Artificial

20

<220>
 <223> Proteína de fusión TrkA-Fc humana

<400> 24

ES 2 666 126 T3

Ala Ala Pro Cys Pro Asp Ala Cys Cys Pro His Gly Ser Ser Gly Leu
 1 5 10 15

Arg Cys Thr Arg Asp Gly Ala Leu Asp Ser Leu His His Leu Pro Gly
 20 25 30

Ala Glu Asn Leu Thr Glu Leu Tyr Ile Glu Asn Gln Gln His Leu Gln
 35 40 45

His Leu Glu Leu Arg Asp Leu Arg Gly Leu Gly Glu Leu Arg Asn Leu
 50 55 60

Thr Ile Val Lys Ser Gly Leu Arg Phe Val Ala Pro Asp Ala Phe His
 65 70 75 80

Phe Thr Pro Arg Leu Ser Arg Leu Asn Leu Ser Phe Asn Ala Leu Glu
 85 90 95

Ser Leu Ser Trp Lys Thr Val Gln Gly Leu Ser Leu Gln Glu Leu Val
 100 105 110

Leu Ser Gly Asn Pro Leu His Cys Ser Cys Ala Leu Arg Trp Leu Gln
 115 120 125

Arg Trp Glu Glu Glu Gly Leu Gly Gly Val Pro Glu Gln Lys Leu Gln
 130 135 140

Cys His Gly Gln Gly Pro Leu Ala His Met Pro Asn Ala Ser Cys Gly
 145 150 155 160

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

Asp Asp Val Leu Leu Arg Cys Gln Val Glu Gly Arg Gly Leu Glu Gln
 180 185 190

ES 2 666 126 T3

Ala Gly Trp Ile Leu Thr Glu Leu Glu Gln Ser Ala Thr Val Met Lys
 195 200 205

Ser Gly Gly Leu Pro Ser Leu Gly Leu Thr Leu Ala Asn Val Thr Ser
 210 215 220

Asp Leu Asn Arg Lys Asn Val Thr Cys Trp Ala Glu Asn Asp Val Gly
 225 230 235 240

Arg Ala Glu Val Ser Val Gln Val Asn Val Ser Phe Pro Ala Ser Val
 245 250 255

Gln Leu His Thr Ala Val Glu Met His His Trp Cys Ile Pro Phe Ser
 260 265 270

Val Asp Gly Gln Pro Ala Pro Ser Leu Arg Trp Leu Phe Asn Gly Ser
 275 280 285

Val Leu Asn Glu Thr Ser Phe Ile Phe Thr Glu Phe Leu Glu Pro Ala
 290 295 300

Ala Asn Glu Thr Val Arg His Gly Cys Leu Arg Leu Asn Gln Pro Thr
 305 310 315 320

His Val Asn Asn Gly Asn Tyr Thr Leu Leu Ala Ala Asn Pro Phe Gly
 325 330 335

Gln Ala Ser Ala Ser Ile Met Ala Ala Phe Met Asp Asn Pro Phe Glu
 340 345 350

Phe Asn Pro Glu Asp Pro Ile Pro Val Ser Phe Ser Pro Val Asp Thr
 355 360 365

Asn Ser Thr Ser Gly Asp Pro Val Glu Lys Lys Asp Glu Thr Pro Phe
 370 375 380

Gly Val Ser Val Ala Val Gly Ala Ala Ala Glu Asn Leu Tyr Phe Gln
 385 390 395 400

Ser Gly Ser Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 405 410 415

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 420 425 430

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 435 440 445

ES 2 666 126 T3

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
450 455 460

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
465 470 475 480

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
485 490 495

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
500 505 510

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
515 520 525

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
530 535 540

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
545 550 555 560

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
565 570 575

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
580 585 590

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
595 600 605

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
610 615 620

Ser Pro Gly Lys
625

<210> 25

<211> 391

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> Región extracelular TrkA humana

10 <222> (1)..(391)

<400> 25

Ala Ala Pro Cys Pro Asp Ala Cys Cys Pro His Gly Ser Ser Gly Leu

ES 2 666 126 T3

Gln Leu His Thr Ala Val Glu Met His His Trp Cys Ile Pro Phe Ser
260 265 270

Val Asp Gly Gln Pro Ala Pro Ser Leu Arg Trp Leu Phe Asn Gly Ser
275 280 285

Val Leu Asn Glu Thr Ser Phe Ile Phe Thr Glu Phe Leu Glu Pro Ala
290 295 300

Ala Asn Glu Thr Val Arg His Gly Cys Leu Arg Leu Asn Gln Pro Thr
305 310 315 320

His Val Asn Asn Gly Asn Tyr Thr Leu Leu Ala Ala Asn Pro Phe Gly
325 330 335

Gln Ala Ser Ala Ser Ile Met Ala Ala Phe Met Asp Asn Pro Phe Glu
340 345 350

Phe Asn Pro Glu Asp Pro Ile Pro Val Ser Phe Ser Pro Val Asp Thr
355 360 365

Asn Ser Thr Ser Gly Asp Pro Val Glu Lys Lys Asp Glu Thr Pro Phe
370 375 380

Gly Val Ser Val Ala Val Gly
385 390

<210> 26
<211> 453
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> Cadena pesada de BXhVH1

<400> 26
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

Ser Tyr Ile Ser Lys Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

ES 2 666 126 T3

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 325 330 335

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

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 355 360

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 27
 <211> 453
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cadena pesada de BXhVH3

10

<400> 27
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

ES 2 666 126 T3

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 325 330 335

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

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 355 360

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 28
 <211> 453
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cadena pesada de BXhVH5

10 <400> 28
 Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

ES 2 666 126 T3

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 325 330 335

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

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 355 360

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 29
 <211> 213
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cadena ligera de BXhVL1

10

<400> 29
 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 Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu

ES 2 666 126 T3

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

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
85 90 95

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

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 31

<211> 123

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Dominio variable de la cadena pesada de GBR VH5(K3Q)

<400> 31

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

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

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

ES 2 666 126 T3

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

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

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

Ala Arg Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 32
<211> 123
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> Dominio variable de la cadena pesada de GBR VH5(V37A)

<400> 32
Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

15 <210> 33
<211> 123
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
20 <223> Dominio variable de la cadena pesada de GBR VH5(G42E)

<400> 33

ES 2 666 126 T3

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 34
<211> 123
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> Dominio variable de la cadena pesada de GBR VH5(V89L)

<400> 34
Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Tyr Ile Ser Lys Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

15 <210> 35
<211> 123

ES 2 666 126 T3

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
5 <223> Dominio variable de la cadena pesada de GBR VH5(R94K)

<400> 35
 Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30
 Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Tyr Ile Ser Lys Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

10 <210> 36
<211> 123
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
<223> Dominio variable de la cadena pesada de GBR VH5(K3Q,V37A)

<400> 36

ES 2 666 126 T3

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 37
<211> 123
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> Dominio variable de la cadena pesada de GBR VH5(K3Q,T40A)

<400> 37
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Tyr Ile Ser Lys Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

15 <210> 38
<211> 123

ES 2 666 126 T3

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
5 <223> Dominio variable de la cadena pesada de GBR VH5(P60A,T62S)

<400> 38
 Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30
 Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Tyr Ile Ser Lys Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

10 <210> 39
<211> 123
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
<223> Dominio variable de la cadena pesada de GBR VH5(K3Q,V37A,R44G)
<400> 39

ES 2 666 126 T3

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 40
<211> 123
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> Dominio variable de la cadena pesada de GBR VH5(K3Q,A49S,Y50A)

<400> 40
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Ser Lys Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

15 <210> 41
<211> 123

ES 2 666 126 T3

<212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 5 <223> Dominio variable de la cadena pesada de GBR VH5(K3Q,P60A,T62S)

<400> 41
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30
 Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Tyr Ile Ser Lys Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

10 <210> 42
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Dominio variable de la cadena pesada de GBR VH5(K3Q,T40A,P60A,T62S)
 <400> 42

ES 2 666 126 T3

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

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

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

Ala Tyr Ile Ser Lys Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 43
<211> 123
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> Dominio variable de la cadena pesada de GBR VH5(K3Q,V37A,T40A,P60A,T62S)

<400> 43
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Thr Met Ser Trp Ala Arg Gln Ala Pro Gly Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Tyr Ile Ser Lys Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

15 <210> 44
<211> 123

ES 2 666 126 T3

<212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 5 <223> Dominio variable de la cadena pesada de GBR VH5(K3Q,T40A,R44G,A49S,Y50A)

<400> 44
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

10 <210> 45
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Dominio variable de la cadena pesada de GBR VH5(K3Q,A49S,Y50A,P60A,T62S)

<400> 45

ES 2 666 126 T3

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

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

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

Ser Ala Ile Ser Lys Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 46
<211> 123
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> Dominio variable de la cadena pesada de GBR VH5(K3Q,T40A,R44G,A49S,Y50A,P60A,T62S)

<400> 46
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Ser Lys Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

15 <210> 47
<211> 123

ES 2 666 126 T3

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
5 <223> Dominio variable de la cadena pesada de GBR VH5(K3Q,T40A,R44G,A49S,Y50A,P60A,T62S,R94K)

<400> 47
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30
 Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Lys Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

10 <210> 48
<211> 123
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
<223> Dominio variable de la cadena pesada de GBR VH1(V37A)

<400> 48

ES 2 666 126 T3

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

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

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

Ser Tyr Ile Ser Lys Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 49
<211> 123
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> Dominio variable de la cadena pesada de GBR VH3(V37A)

<400> 49
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Lys Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

ES 2 666 126 T3

<210> 50
<211> 453
<212> PRT
<213> Artificial

5

<220>
<223> IGHG1 de cadena pesada de GBR VH5(K3Q)

<400> 50
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30
Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Tyr Ile Ser Lys Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

10

ES 2 666 126 T3

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 130 135 140

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

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

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255

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

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 325 330 335

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

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala

ES 2 666 126 T3

370

375

380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 51
<211> 453
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> IGHG1 de cadena pesada de GBR VH5(V37A)

<400> 51
Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

ES 2 666 126 T3

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 130 135 140

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

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

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255

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

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 325 330 335

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

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala

ES 2 666 126 T3

370

375

380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 52

<211> 450

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> IGHG4 S228P de cadena pesada de GBR VH5(V37A)

<400> 52

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

ES 2 666 126 T3

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser
 130 135 140

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

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

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val
 195 200 205

Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys
 210 215 220

Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly
 225 230 235 240

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

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu
 260 265 270

Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu
 325 330 335

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

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

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp

ES 2 666 126 T3

370

375

380

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

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 53

<211> 453

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> IGHG1 de cadena pesada de GBR VH5(G42E)

<400> 53

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

ES 2 666 126 T3

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 130 135 140

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

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

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255

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

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 325 330 335

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

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala

ES 2 666 126 T3

370

375

380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 54

<211> 453

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> IGHG1 de cadena pesada de GBR VH5(V89L)

<400> 54

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

ES 2 666 126 T3

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 130 135 140

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

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

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255

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

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 325 330 335

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

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala

ES 2 666 126 T3

370

375

380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 55

<211> 453

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> IGHG1 de cadena pesada de GBR VH5(R94K)

<400> 55

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

ES 2 666 126 T3

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 130 135 140

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

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

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255

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

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 325 330 335

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

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala

ES 2 666 126 T3

370

375

380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 56

<211> 453

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> IGHG1 de cadena pesada de GBR VH5(K3Q,V37A)

<400> 56

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

ES 2 666 126 T3

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 130 135 140

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

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

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255

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

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 325 330 335

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

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala

ES 2 666 126 T3

370

375

380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 57

<211> 450

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> IGHG4 S228P de cadena pesada de GBR VH5(K3Q,V37A)

<400> 57

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

ES 2 666 126 T3

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser
 130 135 140

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

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

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val
 195 200 205

Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys
 210 215 220

Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly
 225 230 235 240

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

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu
 260 265 270

Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu
 325 330 335

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

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

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp

ES 2 666 126 T3

370

375

380

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

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 58

<211> 453

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> IGHG1 de cadena pesada de GBR VH5(K3Q,T40A)

<400> 58

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

ES 2 666 126 T3

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 130 135 140

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

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

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255

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

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 325 330 335

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

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala

ES 2 666 126 T3

370

375

380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 59

<211> 453

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> IGHG1 de cadena pesada de GBR VH5(P60A,T62S)

<400> 59

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

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

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

Ala Tyr Ile Ser Lys Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

ES 2 666 126 T3

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 130 135 140

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

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

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255

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

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 325 330 335

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

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala

ES 2 666 126 T3

370

375

380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 60

<211> 453

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> IGHG1 de cadena pesada de GBR VH5(K3Q,V37A,R44G)

<400> 60

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

ES 2 666 126 T3

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 130 135 140

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

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

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255

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

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 325 330 335

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

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala

ES 2 666 126 T3

370

375

380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 61
<211> 453
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> IGHG1 de cadena pesada de GBR VH5(K3Q,A49S,Y50A)

<400> 61
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

ES 2 666 126 T3

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 130 135 140

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

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

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255

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

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 325 330 335

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

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala

ES 2 666 126 T3

370

375

380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 62
<211> 453
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> IGHG1 de cadena pesada de GBR VH5(K3Q,P60A,T62S)

<400> 62
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

Ala Tyr Ile Ser Lys Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

ES 2 666 126 T3

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 130 135 140

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

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

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255

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

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 325 330 335

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

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala

ES 2 666 126 T3

370

375

380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 63

<211> 453

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> IGHG1 de cadena pesada de GBR VH5(K3Q,T40A,P60A,T62S)

<400> 63

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

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

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

Ala Tyr Ile Ser Lys Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

ES 2 666 126 T3

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 130 135 140

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

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

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255

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

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 325 330 335

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

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala

ES 2 666 126 T3

370

375

380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 64

<211> 453

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> IGHG1 de cadena pesada de GBR VH5(K3Q,V37A,T40A,P60A,T62S)

<400> 64

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

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

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

Ala Tyr Ile Ser Lys Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

ES 2 666 126 T3

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 130 135 140

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

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

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255

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

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 325 330 335

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

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala

ES 2 666 126 T3

370

375

380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 65
<211> 453
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> IGHG1 de cadena pesada de GBR VH5(K3Q,T40A,R44G,A49S,Y50A)

<400> 65
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

ES 2 666 126 T3

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 130 135 140

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

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

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255

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

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 325 330 335

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

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala

ES 2 666 126 T3

370

375

380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 66

<211> 453

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> IGHG1 de cadena pesada de GBR VH5(K3Q,A49S,Y50A,P60A,T62S)

<400> 66

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

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

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

Ser Ala Ile Ser Lys Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

ES 2 666 126 T3

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 130 135 140

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

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

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255

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

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 325 330 335

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

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala

ES 2 666 126 T3

370

375

380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 67

<211> 453

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> IGHG1 de cadena pesada de GBR VH5(K3Q,T40A,R44G,A49S,Y50A,P60A,T62S)

<400> 67

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

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

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

Ser Ala Ile Ser Lys Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

ES 2 666 126 T3

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 130 135 140

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

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

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255

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

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 325 330 335

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

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala

ES 2 666 126 T3

370

375

380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 68

<211> 453

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> IGHG1 de cadena pesada de GBR VH5(K3Q,T40A,R44G,A49S,Y50A,P60A,T62S,R94K)

<400> 68

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

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

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

Ser Ala Ile Ser Lys Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

ES 2 666 126 T3

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 130 135 140

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

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

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255

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

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 325 330 335

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

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala

ES 2 666 126 T3

370

375

380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 69
<211> 453
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> IGHG1 de cadena pesada de GBR VH1(V37A)

<400> 69
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

Ser Tyr Ile Ser Lys Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

ES 2 666 126 T3

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 130 135 140

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

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

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255

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

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 325 330 335

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

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala

ES 2 666 126 T3

370

375

380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 70

<211> 453

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> IGHG1 de cadena pesada de GBR VH3(V37A)

<400> 70

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Gly Ala Met Tyr Gly Asn Asp Phe Phe Tyr Pro Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

ES 2 666 126 T3

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 130 135 140

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

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

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255

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

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 325 330 335

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

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala

ES 2 666 126 T3

<400> 72

Met Leu Arg Gly Gly Arg Arg Gly Gln Leu Gly Trp His Ser Trp Ala
 1 5 10 15

Ala Gly Pro Gly Ser Leu Leu Ala Trp Leu Ile Leu Ala Ser Ala Gly
 20 25 30

Ala Ala Pro Cys Pro Asp Ala Cys Cys Pro His Gly Ser Ser Gly Leu
 35 40 45

Arg Cys Thr Arg Asp Gly Ala Leu Asp Ser Leu His His Leu Pro Gly
 50 55 60

Ala Glu Asn Leu Thr Glu Leu Tyr Ile Glu Asn Gln Gln His Leu Gln
 65 70 75 80

His Leu Glu Leu Arg Asp Leu Arg Gly Leu Gly Glu Leu Arg Asn Leu
 85 90 95

Thr Ile Val Lys Ser Gly Leu Arg Phe Val Ala Pro Asp Ala Phe His
 100 105 110

Phe Thr Pro Arg Leu Ser Arg Leu Asn Leu Ser Phe Asn Ala Leu Glu
 115 120 125

Ser Leu Ser Trp Lys Thr Val Gln Gly Leu Ser Leu Gln Glu Leu Val
 130 135 140

Leu Ser Gly Asn Pro Leu His Cys Ser Cys Ala Leu Arg Trp Leu Gln
 145 150 155 160

Arg Trp Glu Glu Glu Gly Leu Gly Gly Val Pro Glu Gln Lys Leu Gln
 165 170 175

Cys His Gly Gln Gly Pro Leu Ala His Met Pro Asn Ala Ser Cys Gly
 180 185 190

Val Pro Thr Leu Lys Val Gln Val Pro Asn Ala Ser Val Asp Val Gly

ES 2 666 126 T3

Gly Ile Asn Arg Pro Ala Val Leu Ala Pro Glu Asp Gly Leu Ala Met
450 455 460

Ser Leu His Phe Met Thr Leu Gly Gly Ser Ser Leu Ser Pro Thr Glu
465 470 475 480

Gly Lys Gly Ser Gly Leu Gln Gly His Ile Ile Glu Asn Pro Gln Tyr
485 490 495

Phe Ser Asp Ala Cys Val His His Ile Lys Arg Arg Asp Ile Val Leu
500 505 510

Lys Trp Glu Leu Gly Glu Gly Ala Phe Gly Lys Val Phe Leu Ala Glu
515 520 525

Cys His Asn Leu Leu Pro Glu Gln Asp Lys Met Leu Val Ala Val Lys
530 535 540

Ala Leu Lys Glu Ala Ser Glu Ser Ala Arg Gln Asp Phe Gln Arg Glu
545 550 555 560

Ala Glu Leu Leu Thr Met Leu Gln His Gln His Ile Val Arg Phe Phe
565 570 575

Gly Val Cys Thr Glu Gly Arg Pro Leu Leu Met Val Phe Glu Tyr Met
580 585 590

Arg His Gly Asp Leu Asn Arg Phe Leu Arg Ser His Gly Pro Asp Ala
595 600 605

Lys Leu Leu Ala Gly Gly Glu Asp Val Ala Pro Gly Pro Leu Gly Leu
610 615 620

Gly Gln Leu Leu Ala Val Ala Ser Gln Val Ala Ala Gly Met Val Tyr
625 630 635 640

Leu Ala Gly Leu His Phe Val His Arg Asp Leu Ala Thr Arg Asn Cys
645 650 655

Leu Val Gly Gln Gly Leu Val Val Lys Ile Gly Asp Phe Gly Met Ser
660 665 670

Arg Asp Ile Tyr Ser Thr Asp Tyr Tyr Arg Val Gly Gly Arg Thr Met
675 680 685

Leu Pro Ile Arg Trp Met Pro Pro Glu Ser Ile Leu Tyr Arg Lys Phe
690 695 700

ES 2 666 126 T3

Thr Thr Glu Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Val Leu Trp Glu Ile
705 710 715 720

Phe Thr Tyr Gly Lys Gln Pro Trp Tyr Gln Leu Ser Asn Thr Glu Ala
725 730 735

Ile Asp Cys Ile Thr Gln Gly Arg Glu Leu Glu Arg Pro Arg Ala Cys
740 745 750

Pro Pro Glu Val Tyr Ala Ile Met Arg Gly Cys Trp Gln Arg Glu Pro
755 760 765

Gln Gln Arg His Ser Ile Lys Asp Val His Ala Arg Leu Gln Ala Leu
770 775 780

Ala Gln Ala Pro Pro Val Tyr Leu Asp Val Leu Gly
785 790 795

5 <210> 73
<211> 369
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> ADNc de dominio variable de la cadena pesada de GBR VH5(K3Q)

<400> 73
gaagtgcagc tgctggaaag cggcggaggc ctggtgcagc ctggcgggaag cctgagactg 60
agctgtgccg ccagcgggett caccttcagc acctacacca tgagctgggt cgcacagacc 120
cccggcaagc ggctggaatg ggtggcctac atcagcaagg gcgaggcag cacctactac 180
cccgcaccg tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240
ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgtgc cagaggcgct 300
atgtacggca acgacttctt ctaccctatg gactactggg gccagggcac caccgtgacc 360
gtgtctagc 369

15 <210> 74
<211> 369
<212> ADN
<213> Artificial

20 <220>
<223> ADNc de dominio variable de la cadena pesada de GBR VH5(V37A)

<400> 74
gaagtgaaac tgctggaaag cggcggaggc ctggtgcagc ctggcgggaag cctgagactg 60
agctgtgccg ccagcgggett caccttcagc acctacacca tgagctgggc cgcacagacc 120
cccggcaagc ggctggaatg ggtggcctac atcagcaagg gcgaggcag cacctactac 180
cccgcaccg tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240
ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgtgc cagaggcgct 300
atgtacggca acgacttctt ctaccctatg gactactggg gccagggcac caccgtgacc 360
gtgtctagc 369

25

ES 2 666 126 T3

<210> 75
 <211> 369
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> ADNc de dominio variable de la cadena pesada de GBR VH5(G42E)
 <400> 75
 gaagtgaaac tgctggaag cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggaag cctgagactg 60
 agctgtgccg ccagcggcct caccttcagc acctacacca tgagctgggt ccgacagacc 120
 cccgaaaagc ggctggaatg ggtggcctac atcagcaagc ggggaggcag cacctactac 180
 cccgacaccg tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240
 ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgtgc cagaggcgct 300
 atgtacggca acgacttctt ctaccctatg gactactggg gccagggcac caccctgacc 360
 10 gtgtctagc 369
 <210> 76
 <211> 369
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADNc de dominio variable de la cadena pesada de GBR VH5(V89L)
 20 <400> 76
 gaagtgaaac tgctggaag cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggaag cctgagactg 60
 agctgtgccg ccagcggcct caccttcagc acctacacca tgagctgggt ccgacagacc 120
 cccggcaagc ggctggaatg ggtggcctac atcagcaagc ggggaggcag cacctactac 180
 cccgacaccg tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240
 ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccctgt actactgtgc cagaggcgct 300
 atgtacggca acgacttctt ctaccctatg gactactggg gccagggcac caccctgacc 360
 gtgtctagc 369
 <210> 77
 <211> 369
 25 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADNc de dominio variable de la cadena pesada de GBR VH5(R94K)
 30 <400> 77
 gaagtgaaac tgctggaag cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggaag cctgagactg 60
 agctgtgccg ccagcggcct caccttcagc acctacacca tgagctgggt ccgacagacc 120
 cccggcaagc ggctggaatg ggtggcctac atcagcaagc ggggaggcag cacctactac 180
 cccgacaccg tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240
 ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgtgc caagggcgct 300
 atgtacggca acgacttctt ctaccctatg gactactggg gccagggcac caccctgacc 360
 gtgtctagc 369

ES 2 666 126 T3

<210> 78
 <211> 369
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> ADNc de dominio variable de la cadena pesada de GBR VH5(K3Q,V37A)
 <400> 78
 gaagtgcagc tgctggaaag cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggaag cctgagactg 60
 agctgtgccg ccagcggcct caccttcagc acctacacca tgagctgggc cgcacagacc 120
 cccggcaagc ggctggaatg ggtggcctac atcagcaagc ggggaggcag cacctactac 180
 cccgacaccg tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240
 ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgtgc cagaggcgct 300
 atgtacggca acgacttctt ctaccctatg gactactggg gccagggcac caccgtgacc 360
 10 gtgtctagc 369
 <210> 79
 <211> 369
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADNc de dominio variable de la cadena pesada de GBR VH5(K3Q,T40A)
 20 <400> 79
 gaagtgcagc tgctggaaag cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggaag cctgagactg 60
 agctgtgccg ccagcggcct caccttcagc acctacacca tgagctgggt cgcacaggcc 120
 cccggcaagc ggctggaatg ggtggcctac atcagcaagc ggggaggcag cacctactac 180
 cccgacaccg tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240
 ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgtgc cagaggcgct 300
 atgtacggca acgacttctt ctaccctatg gactactggg gccagggcac caccgtgacc 360
 gtgtctagc 369
 25 <210> 80
 <211> 369
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> ADNc de dominio variable de la cadena pesada de GBR VH5(P60A,T62S)
 <400> 80
 gaagtgaaac tgctggaaag cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggaag cctgagactg 60
 agctgtgccg ccagcggcct caccttcagc acctacacca tgagctgggt cgcacagacc 120
 cccggcaagc ggctggaatg ggtggcctac atcagcaagc ggggaggcag cacctactac 180
 gccgacagcg tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240
 ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgtgc cagaggcgct 300
 atgtacggca acgacttctt ctaccctatg gactactggg gccagggcac caccgtgacc 360
 gtgtctagc 369
 35

ES 2 666 126 T3

<210> 81
 <211> 369
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> ADNc de dominio variable de la cadena pesada de GBR VH5(K3Q,V37A,R44G)
 <400> 81
 gaagtgcagc tgctggaaag cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggaag cctgagactg 60
 agctgtgccg ccagcggcctt caccttcagc acctacacca tgagctgggc cgcacagacc 120
 cccggcaagg ggtggaatg ggtggcctac atcagcaagg ggggaggcag cacctactac 180
 cccgacaccg tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240
 ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgtgc cagaggcgct 300
 atgtacggca acgacttctt ctaccctatg gactactggg gccagggcac caccgtgacc 360
 10 gtgtctagc 369
 <210> 82
 <211> 369
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADNc de dominio variable de la cadena pesada de GBR VH5(K3Q,A49S,Y50A)
 20 <400> 82
 gaagtgcagc tgctggaaag cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggaag cctgagactg 60
 agctgtgccg ccagcggcctt caccttcagc acctacacca tgagctgggt cgcacagacc 120
 cccggcaagg ggtggaatg ggtgagcgc atcagcaagg ggggaggcag cacctactac 180
 cccgacaccg tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240
 ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgtgc cagaggcgct 300
 atgtacggca acgacttctt ctaccctatg gactactggg gccagggcac caccgtgacc 360
 gtgtctagc 369
 25 <210> 83
 <211> 369
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> ADNc de dominio variable de la cadena pesada de GBR VH5(K3Q,P60A,T62S)
 <400> 83
 gaagtgcagc tgctggaaag cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggaag cctgagactg 60
 agctgtgccg ccagcggcctt caccttcagc acctacacca tgagctgggt cgcacagacc 120
 cccggcaagg ggtggaatg ggtggcctac atcagcaagg ggggaggcag cacctactac 180
 gccgacagcg tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240
 ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgtgc cagaggcgct 300
 atgtacggca acgacttctt ctaccctatg gactactggg gccagggcac caccgtgacc 360
 gtgtctagc 369
 35

ES 2 666 126 T3

<210> 84
 <211> 369
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> ADNc de dominio variable de la cadena pesada de GBR VH5(K3Q,T40A,P60A,T62S)
 <400> 84
 gaagtgcagc tgctggaaag cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggaag cctgagactg 60
 agctgtgccg ccagcggcctt caccttcagc acctacacca tgagctgggt ccgacaggcc 120
 cccggcaagc ggctggaatg ggtggcctac atcagcaagg ggggaggcag cacctactac 180
 gccgacagcg tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240
 ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgtgc cagaggcgct 300
 atgtacggca acgacttctt ctaccctatg gactactggg gccagggcac caccctgacc 360
 10 gtgtctagc 369
 <210> 85
 <211> 369
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADNc de dominio variable de la cadena pesada de GBR VH5(K3Q,V37A,T40A,P60A,T62S)
 20 <400> 85
 gaagtgcagc tgctggaaag cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggaag cctgagactg 60
 agctgtgccg ccagcggcctt caccttcagc acctacacca tgagctgggc ccgacaggcc 120
 cccggcaagc ggctggaatg ggtggcctac atcagcaagg ggggaggcag cacctactac 180
 gccgacagcg tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240
 ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgtgc cagaggcgct 300
 atgtacggca acgacttctt ctaccctatg gactactggg gccagggcac caccctgacc 360
 gtgtctagc 369
 <210> 86
 <211> 369
 25 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADNc de dominio variable de la cadena pesada de GBR VH5(K3Q,T40A,R44G,A49S,Y50A)
 30 <400> 86
 gaagtgcagc tgctggaaag cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggaag cctgagactg 60
 agctgtgccg ccagcggcctt caccttcagc acctacacca tgagctgggt ccgacaggcc 120
 cccggcaagg gcctggaatg ggtgagcggc atcagcaagg ggggaggcag cacctactac 180
 cccgacaccg tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240
 ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgtgc cagaggcgct 300
 atgtacggca acgacttctt ctaccctatg gactactggg gccagggcac caccctgacc 360
 gtgtctagc 369

ES 2 666 126 T3

<210> 87
 <211> 369
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> ADNc de dominio variable de la cadena pesada de GBR VH5(K3Q,A49S,Y50A,P60A,T62S)

<400> 87
 gaagtgcagc tgctggaaag cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggaag cctgagactg 60
 agctgtgccg ccagcggcctt caccttcagc acctacacca tgagctgggt ccgacagacc 120
 cccggcaagg ggctggaatg ggtgagcgc atcagcaagg gcgagggcag cacctactac 180
 10 gccgacagcg tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240
 ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgcctgt actactgtgc cagaggcgt 300
 atgtacggca acgacttctt ctaccctatg gactactggg gccagggcac caccgtgacc 360
 gtgtctagc 369

15

<210> 88
 <211> 369
 <212> ADN
 <213> Artificial

20

<220>
 <223> ADNc de dominio variable de la cadena pesada de GBR VH5(K3Q,T40A,R44G,A49S,Y50A,P60A,T62S)

<400> 88
 gaagtgcagc tgctggaaag cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggaag cctgagactg 60
 agctgtgccg ccagcggcctt caccttcagc acctacacca tgagctgggt ccgacaggcc 120
 cccggcaagg gcctggaatg ggtgagcgc atcagcaagg gcgagggcag cacctactac 180
 gccgacagcg tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240
 ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgcctgt actactgtgc cagaggcgt 300
 atgtacggca acgacttctt ctaccctatg gactactggg gccagggcac caccgtgacc 360
 gtgtctagc 369

25

<210> 89
 <211> 369
 <212> ADN
 <213> Artificial

30

<220>
 <223> ADNc de dominio variable de la cadena pesada de GBR VH5(K3Q,T40A,R44G,A49S,Y50A,P60A,T62S,R94K)

<400> 89

ES 2 666 126 T3

gaagtgcagc tgctggaaag cggcggaggg ctggtgcagc ctggcggaaag cctgagactg 60
 agctgtgccg ccagcggcctt caccttcagc acctacacca tgagctgggt ccgacaggcc 120
 cccggcaagg gcctggaatg ggtgagcgc atcagcaagg gcgagggcag cacctactac 180
 gccgacagcg tgaagggcgg gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240
 ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgtgc caagggcgct 300
 atgtacggca acgacttctt ctaccctatg gactactggg gccagggcac caccgtgacc 360
 gtgtctagc 369
 <210> 90
 <211> 369
 5 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 10 <223> ADNc de dominio variable de la cadena pesada de GBR VH1(V37A)
 <400> 90
 gaagtgcagc tgctggaaag cggcggaggg ctggtgcagc caggcggcag cctgaggctg 60
 tcctgcgccg ccagcggcctt caccttcagc acctacacca tgagctgggc ccgacaggcc 120
 ccaggcaagg gcctggaatg ggtgtcctac atcagcaagg gcgaggaag cacctactac 180
 cccgacaccg tgaagggcag gttcaccatc agcagggaca acagcaagaa caccctgtac 240
 ctgcagatga acagcctgag ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc caagggcgcc 300
 atgtacggca acgacttttt ctaccctatg gactactggg ggcagggcac caccgtgacc 360
 gtgtctagc 369
 <210> 91
 15 <211> 369
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 20 <223> ADNc de dominio variable de la cadena pesada de GBR VH3(V37A)
 <400> 91
 gaagtgcagc tgctggaaag cggcggaggg ctggtgcagc caggcggcag cctgaggctg 60
 tcctgcgccg ccagcggcctt caccttcagc acctacacca tgagctgggc ccgacagacc 120
 cccggcaaga ggctggaatg ggtggcctac atcagcaagg gcgaggaag cacctactac 180
 cccgacaccg tgaagggcag gttcaccatc agcagggaca acagcaagaa caccctgtac 240
 ctgcagatga acagcctgag ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc caagggcgcc 300
 atgtacggca acgacttttt ctaccctatg gactactggg ggcagggcac caccgtgacc 360
 gtgtctagc 369
 <210> 92
 25 <211> 1359
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 30 <223> ADNc deIGHG1 de cadena pesada de GBR VH5(K3Q)
 <400> 92

ES 2 666 126 T3

gaagtgcagc tgctggaaag cggcggaggc ctggtgcagc ctggcgggaag cctgagactg 60
agctgtgccg ccagcggcctt caccttcagc acctacacca tgagctgggt ccgacagacc 120
cccggcaagc ggctggaatg ggtggcctac atcagcaagg gcgagggcag cacctactac 180
cccgacaccg tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240
ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgcoctgt actactgtgc cagagggcgt 300
atgtacggca acgacttctt ctaccctatg gactactggg gccagggcac caccgtgacc 360
gtgtctagcg cgtcgaccaa gggcccacg gtgttcccgc tagccccag cagcaagagc 420
accagcggcg gcacagccgc cctgggctgc ctggtgaag actacttccc cgagccctgtg 480
accgtgtcct ggaactctgg agccctgacc tccggcgtgc acaccttccc cgcctgtctc 540
cagagcagcg gcctgtacag cctgagcagc gtggtgacag tgcccagcag cagcctggga 600
accagacct acatctgcaa cgtgaaccac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaag 660
gtggagccca agagctgcga caagaccac acctgcccc cctgccctgc ccctgagctg 720
ctggcgggac cctccgtgtt cctgttcccc cccaagccca aggacaccct gatgatcagc 780
cggacccccg aggtgacctg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaggacce tgaggtgaag 840
ttcaattggt acgtggacgg cgtggaggtg cacaacgcca agaccaagcc cggggaggaa 900
cagtacaaca gcacctaccg ggtggtgtcc gtgtgaccg tgctgcacca ggactggctg 960
aacggcaagg aatacaagtg caaggtctcc aacaaggccc tgcctgcccc catcgaaaag 1020
accatcagca aggccaaggg ccagcccagg gagccccagg tgtacaccct gccccctcc 1080
cgggacgagc tgaccaagaa ccaggtgtcc ctgacctgtc tgggtgaaggg cttctacccc 1140
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaac ggcagcccc agaacaacta caagaccacc 1200
ccccctgtgc tggacagcga cggcagcttc ttctgtaca gcaagctgac cgtggacaag 1260
agccggtggc agcagggcaa cgtgttcagc tgctccgtga tgcacgaggc cctgcacaac 1320
cactacacc cagaagagcct gagcctgtcc cccggcaag 1359

<210> 93
5 <211> 1359
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
10 <223> ADNc de IGHG1 de cadena pesada de GBR VH5(V37A)

<400> 93

ES 2 666 126 T3

gaagtgaaac tgctggaaag oggocggagoc ctggtgcagc ctggcggaaag cctgagactg 60
 agctgtgccg ccagcggcctt caccttcagc acctacacca tgagctgggc ccgacagacc 120
 cccggcaagc ggctggaatg ggtggcctac atcagcaagg gcccaggcag cacctactac 180
 cccgacaccg tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240
 ctgcagatga acagcctgcg gggcggagac accgcccgtgt actactgtgc cagaggcgcct 300
 atgtacggca acgacttctt ctaccctatg gactactggg gccagggcac caccgtgacc 360
 gtgtctagcg cgtcgaccaa gggccccagc gtgttcccgc tagccccag cagcaagagc 420
 accagcggcg gcacagccgc cctgggctgc ctggtgaagg actacttccc cgagcccgtg 480
 accgtgtcct ggaactctgg agccctgacc tccggcgtgc acaccttccc cgccgtgctc 540
 cagagcagcg gcctgtacag cctgagcagc gtggtgacag tgcccagcag cagcctggga 600
 acccagacct acatctgcaa cgtgaaccac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaag 660
 gtggagccca agagctgcga caagaccac acctgcccc cctgccctgc ccctgagctg 720
 ctggcgggac cctccgtgtt cctggtcccc cccaagccca aggacaccct gatgatcagc 780
 cggacccccg aggtgacctg cgtggtggtg gactgtgagc acgaggacc tgaggtgaag 840
 ttcaattggt acgtggacgg cgtggaggtg cacaacgcca agaccaagcc cggggaggaa 900
 cagtacaaca gcacctaccg ggtggtgtcc gtgtgaccg tgctgcacca ggactggctg 960
 aacggcaagg aatacaagtg caaggtctcc aacaaggccc tgccctgcccc catcgaaaag 1020
 accatcagca aggccaagg ccagcccagg gagccccagg tgtacaccct gccccctcc 1080
 cgggacgagc tgaccaagaa ccaggtgtcc ctgacctgtc tgggtgaaggg cttctacccc 1140
 agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaac gggcagcccg agaacaacta caagaccacc 1200
 ccccctgtgc tggacagcga cggcagcttc ttctgtaca gcaagctgac cgtggacaag 1260
 agccggtggc agcagggcaa cgtgttcagc tgctccgtga tgcacgaggc cctgcacaac 1320
 cactacacc agaagagcct gagcctgtcc cccggcaag 1359

- <210> 94
- 5 <211> 1350
- <212> ADN
- <213> Artificial
- <220>
- 10 <223> ADNc de IGHG4 S228P de cadena pesada de GBR VH5(V37A)
- <400> 94

ES 2 666 126 T3

gaagtgaaac tgctggaaag cggcggaggc ctggtgcagc ctggcgggaag cctgagactg 60
 agctgtgccg ccagcggcctt caccttcagc acctacacca tgagctgggc ccgacagacc 120
 cccggcaagc ggctggaatg ggtggcctac atcagcaagg ggggagcag cacctactac 180
 cccgacaccg tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240
 ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgtgc cagaggcgct 300
 atgtacggca acgacttctt ctaccctatg gactactggg gccagggcac caccgtgacc 360
 gtgtctagcg cgtcgaccaa gggccccagc gtgttcccc tggccccctg cagcagaagc 420
 accagcgagt ccacagccgc cctgggctgt ctggtgaagg actacttccc cgagcccgctg 480
 accgtgtcct ggaacagcgg agccctgacc agcggcgtgc acaccttccc cgccgtgctg 540
 cagagcagcg gcctgtacag cctgagcagc gtggtgacag tgcccagcag cagcctgggc 600
 accaagacct acacctgcaa cgtggaccac aagcccagca acaccaaggt ggacaagagg 660
 gtggagagca agtacggccc accctgcccc ccatgccag cccccgagtt cctgggcgga 720
 ccctccgtgt tcctgttccc ccccaagccc aaggacacce tgatgatcag caggaccccc 780
 gaggtgacct gcgtggtggt ggacgtgagc caggaggacc cagaggtcca gttcaactgg 840
 tacgtggacg gcgtggaggt gcacaacgcc aagaccaagc ccagagagga gcagttaac 900
 agcacctaca gggtggtgtc cgtgctgacc gtgtgcacc aggactggct gaacggcaag 960
 gaatacaagt gcaaggtctc caacaagggc ctgcccagct ccatcgagaa aaccatcagc 1020
 aaggccaagg gccagccacg ggagccccag gtgtacacce tgccaccctc ccaggaggag 1080
 atgaccaaga accaggtgtc cctgacctgc ctggtgaagg gcttctaccc cagcgacatc 1140
 gccgtggagt gggagagcaa cggccagccc gagaacaact acaagaccac cccccagtg 1200
 ctggacagcg acggcagctt ctctctgtac agcaggctga ccgtggacaa gtccaggtgg 1260
 caggagggca acgtcttttag ctgcagcgtg atgcacgagg ccctgcacaa ccactacacc 1320
 cagaagagcc tgagcctgtc cctgggcaag 1350

5 <210> 95
 <211> 1359
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> ADNc de IGHG1 de cadena pesada de GBR VH5(G42E)

<400> 95

ES 2 666 126 T3

gaagtgaaac tgctggaaa gggcggaggc ctggtgcagc ctggcggaaag cctgagactg 60
 agctgtgccg ccagcggcctt caccttcagc acctacacca tgagctgggt ccgacagacc 120
 cccgaaaagc ggctggaatg ggtggcctac atcagcaag ggggagcag cacctactac 180
 cccgacaccg tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240
 ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgtgc cagaggcgct 300
 atgtacggca acgacttctt ctaccctatg gactactggg gccagggcac caccgtgacc 360
 gtgtctagcg cgtcgaccaa gggccccagc gtgttcccgc tagccccag cagcaagagc 420
 accagcggcg gcacagccgc cctgggctgc ctggtgaag actacttccc cgagcccgctg 480
 accgtgtcct ggaactctgg agccctgacc tccggcgtgc acaccttccc cgccgtgctc 540
 cagagcagcg gcctgtacag cctgagcagc gtggtgacag tgcccagcag cagcctggga 600
 acccagacct acatctgcaa cgtgaaccac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaag 660
 gtggagccca agagctgcga caagaccac acctgcccc cctgccctgc ccctgagctg 720
 ctggcgggac cctccgtgtt cctgttcccc cccaagccca aggacaccct gatgatcagc 780
 cggacccccg aggtgacctg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaggacc tgaggtgaag 840
 ttcaattggt acgtggacg cgtggaggtg cacaacgcca agaccaagcc ccgggaggaa 900
 cagtacaaca gcaacctacc ggtggtgtcc gtgtgaccg tgctgcacca ggactggctg 960
 aacggcaagg aatacaagt caaggtctcc aacaaggccc tgctgcccc catcgaaaag 1020
 accatcagca aggccaaagg ccagcccagg gagccccagg tgtacaccct gccccctcc 1080
 cgggacgagc tgaccaagaa ccaggtgtcc ctgacctgtc tggggaaggg cttctacccc 1140
 agcgacatcg ccgtggagt ggagagcaac ggcagcccg agaacaacta caagaccacc 1200
 ccccctgtgc tggacagcga cggcagcttc ttctgtaca gcaagctgac cgtggacaag 1260
 agccggtggc agcagggcaa cgtgttcagc tgctccgtga tgcacgaggc cctgcacaac 1320
 cactacacc agaagagcct gagcctgtcc cccggcaag 1359

5 <210> 96
 <211> 1359
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> ADNc de IGHG1 de cadena pesada de GBR VH5(V89L)

<400> 96

ES 2 666 126 T3

gaagtgaaac tgctggaaag cggcggaggg ctggtgcagc ctggcgggaag cctgagactg 60
agctgtgccg ccagcggcct caccttcagc acctacacca tgagctgggt ccgacagacc 120
cccggcaagc ggctggaatg ggtggcctac atcagcaagg gcgagggcag cacctactac 180
cccgacaccg tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240
ctgcagatga acagcctgcg gggcggagac accgcctgt actactgtgc cagaggcgct 300
atgtacggca acgacttctt ctaccctatg gactactggg gccagggcac caccgtgacc 360
gtgtctagcg cgtcgaccaa gggccccagc gtgttcccgc tagccccag cagcaagagc 420
accagcggcg gcacagccgc cctgggctgc ctggtgaagg actacttccc cgagcccgctg 480
accgtgtcct ggaactctgg agccctgacc tccggcgtgc acaccttccc cgccgtgctc 540
cagagcagcg gcctgtacag cctgagcagc gtggtgacag tgcccagcag cagcctggga 600
accagacct acatctgcaa cgtgaaccac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaag 660
gtggagccca agagctgcga caagaccac acctgcccc cctgccctgc ccctgagctg 720
ctgggcggac cctccgtgtt cctgttcccc cccaagccca aggacaccct gatgatcagc 780
cggacccccg aggtgacctg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaggacc cagaggtgaag 840
ttcaattggt acgtggacg cgtggaggtg cacaacgcca agaccaagcc ccgggaggaa 900
cagtacaaca gcaectaccg ggtggtgtcc gtgctgaccg tgctgcacca ggactggctg 960
aacggcaagg aatacaagt caaggtctcc aacaaggccc tgctgcccc catcgaaaag 1020
accatcagca aggccaagg ccagcccagg gagccccagg tgtacaccct gccccctcc 1080
cgggacgagc tgaccaagaa ccaggtgtcc ctgacctgtc tgggaagg cttctacccc 1140
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaac ggcagcccg agaacaacta caagaccacc 1200
ccccctgtgc tggacagcga cggcagcttc ttctgtaca gcaagctgac cgtggacaag 1260
agccggtggc agcagggcaa cgtgttcagc tgctccgtga tgcacgaggc cctgcacaac 1320
cactacacc agaagagcct gagcctgtcc cccggcaag 1359

5 <210> 97
<211> 1359
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> ADNc deIGHG1 de cadena pesada de GBR VH5(R94K)
<400> 97

ES 2 666 126 T3

gaagtgaaac tgctggaaag cggcggaggg ctggtgcagc ctggcgggaag cctgagactg 60
 agctgtgccg ccagcggcctt caccttcagc acctacacca tgagctgggt ccgacagacc 120
 cccggcaagc ggctggaatg ggtggcctac atcagcaagg gcgagggcag cacctactac 180
 cccgacaccg tgaagggcgg gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240
 ctgcagatga acagcctgcg gggcggaggac accgccgtgt actactgtgc caagggcgct 300
 atgtacggca acgacttctt ctaccctatg gactactggg gccagggcac caccgtgacc 360
 gtgtctagcg cgtcgaccaa gggccccagc gtgttcccgc tagccccag cagcaagagc 420
 accagcggcg gcacagccgc cctgggctgc ctggtgaagg actacttccc cgagcccgctg 480
 accgtgtcct ggaactctgg agccctgacc tccggcgtgc acaccttccc cgccgtgctc 540
 cagagcagcg gcctgtacag cctgagcagc gtggtgacag tgcccagcag cagcctggga 600
 acccagacct acatctgcaa cgtgaaccac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaag 660
 gtggagccca agagctgcga caagaccac acctgcccc cctgccctgc ccctgagctg 720
 ctgggcggac cctccgtgtt cctgttcccc cccaagccca aggacaccct gatgatcagc 780
 cggacccccg aggtgacctg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaggacc ccgaggtgaag 840
 ttcaattggt acgtggacgg cgtggaggtg cacaacgcca agaccaagcc ccgggaggaa 900
 cagtacaaca gcacctaccg ggtggtgtcc gtgtgaccg tgctgcacca ggactggctg 960
 aacggcaagg aatacaagtg caaggtctcc aacaaggccc tgctgcccc catcgaaaag 1020
 accatcagca aggccaaggg ccagcccagg gagccccagg tgtacaccct gccccctcc 1080
 cgggacgagc tgaccaagaa ccaggtgtcc ctgacctgtc tgggtgaaggg cttctacccc 1140
 agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaac ggcagcccg agaacaacta caagaccacc 1200
 ccccctgtgc tggacagcga cggcagcttc ttctgtaca gcaagctgac cgtggacaag 1260
 agccggtggc agcagggcaa cgtgttcagc tgctccgtga tgcacgaggc cctgcacaac 1320
 cactacacc cagaagagcct gagcctgtcc cccggcaag 1359

<210> 98
 <211> 1359
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> ADNc de IGHG1 de cadena pesada de GBR VH5(K3Q,V37A)

10

<400> 98

ES 2 666 126 T3

gaagtgcagc tgctggaaag cggcggaggg ctggtgcagc ctggcggaaag cctgagactg 60
 agctgtgccg ccagcggcctt caccttcagc acctacacca tgagctgggc ccgacagacc 120
 cccggcaagc ggctggaatg ggtggcctac atcagcaagc gcgaggcag cacctactac 180
 cccgacaccg tgaagggcgg gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240
 ctgcagatga acagcctgcg ggcgaggac accgccgtgt actactgtgc cagaggcgct 300
 atgtacggca acgacttctt ctaccctatg gactactggg gccagggcac caccgtgacc 360
 gtgtctagcg cgtcgaccaa gggccccagc gtgttccgc tagccccag cagcaagagc 420
 accagcggcg gcacagccgc cctgggctgc ctggtgaagc actacttccc cgagcccgctg 480
 accgtgtcct ggaactctgg agccctgacc tccggcgtgc acaccttccc cgccgtgctc 540
 cagagcagcg gcctgtacag cctgagcagc gtggtgacag tgcccagcag cagcctggga 600
 acccagacct acatctgcaa cgtgaaccac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaag 660
 gtggagccca agagctgcga caagaccac acctgcccc cctgccttgc ccctgagctg 720
 ctgggcggac cctccgtgtt cctgttcccc cccaagccca aggacaccct gatgatcagc 780
 cggacccccg aggtgacctg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaggacc tgaggtgaag 840
 ttcaattggt acgtggacgg cgtggaggtg cacaacgcca agaccaagcc ccgggaggaa 900
 cagtacaaca gcacctaccg ggtggtgtcc gtgtgaccg tgctgcacca ggactggctg 960
 aacggcaagg aatacaagt caaggtctcc aacaaggccc tgctgcccc catcgaaaag 1020
 accatcagca aggccaagg ccagcccagg gagccccagg tgtacaccct gccccctcc 1080
 cgggacgagc tgaccaagaa ccaggtgtcc ctgacctgtc tgggtgaaggg cttctacccc 1140
 agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaac ggcagcccg agaacaacta caagaccacc 1200
 ccccctgtgc tggacagcga cggcagcttc ttctgtaca gcaagctgac cgtggacaag 1260
 agccggtggc agcagggcaa cgtgttcagc tgctccgtga tgcacgaggc cctgcacaac 1320
 cactacacc agaagagcct gagcctgtcc cccggcaag 1359

<210> 99
 <211> 1350
 5 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 10 <223> ADNc de IGHG4 S228P de cadena pesada de GBR VH5(K3Q,V37A)

<400> 99

ES 2 666 126 T3

gaagtgcagc tgctggaaag cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggaaag cctgagactg 60
 agctgtgccg ccagcggcctt caccttcagc acctacacca tgagctgggc ccgacagacc 120
 cccggcaagc ggctggaatg ggtggcctac atcagcaagg gcggaggcag cacctactac 180
 cccgacaccg tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240
 ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgtgc cagaggcgct 300
 atgtacggca acgacttctt ctaccctatg gactactggg gccagggcac caccgtgacc 360
 gtgtctagcg cgtcgaccaa gggccccagc gtgttcccc tggccccctg cagcagaagc 420
 accagcagct ccacagcccg cctgggctgt ctggtgaag actacttccc cgagcccgctg 480
 accgtgtcct ggaacagcgg agccctgacc agcggcgtgc acaccttccc cgccgtgctg 540
 cagagcagcg gcctgtacag cctgagcagc gtggtgacag tgcccagcag cagcctgggc 600
 accaagacct acacctgcaa cgtggaccac aagcccagca acaccaaggt ggacaagagg 660
 gtggagagca agtacggccc accctgcccc ccatgccag cccccgagtt cctgggggga 720
 ccctccgtgt tctctgttccc ccccaagccc aaggacacc tgatgatcag caggaccccc 780
 gaggtgacct gcgtgggtgt ggacgtgagc caggaggacc cagaggtcca gttcaactgg 840
 tacgtggacg gcgtggaggt gcacaacgcc aagaccaagc ccagagagga gcagtttaac 900
 agcacctaca ggggtgtgtc cgtgctgacc gtgtgcacc aggactggct gaacggcaag 960
 gaatacaagt gcaaggtctc caacaagggc ctgcccagct ccatcgagaa aaccatcagc 1020
 aaggccaagg gccagccacg ggagccccag gtgtacacc tgccaccctc ccaggaggag 1080
 atgaccaaga accaggtgtc cctgacctgc ctggtgaag gcttctacce cagcgacatc 1140
 gccgtggagt gggagagcaa gggccagccc gagaacaact acaagaccac cccccagtg 1200
 ctggacagcg acggcagctt ctctcctgtac agcaggctga ccgtggacaa gtccagggtg 1260
 caggagggca acgtctttag ctgcagcgtg atgcacgagg ccctgcacaa ccactacacc 1320
 cagaagagcc tgagcctgtc cctgggcaag 1350

<210> 100
 <211> 1359
 5 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 10 <223> ADNc de IGHG1 de cadena pesada de GBR VH5(K3Q,T40A)

<400> 100
 gaagtgcagc tgctggaaag cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggaaag cctgagactg 60
 agctgtgccg ccagcggcctt caccttcagc acctacacca tgagctgggt ccgacaggcc 120
 cccggcaagc ggctggaatg ggtggcctac atcagcaagg gcggaggcag cacctactac 180

ES 2 666 126 T3

cccgacaccg tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240
 ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgtgc cagaggcgct 300
 atgtacggca acgacttctt ctaccctatg gactactggg gccagggcac caccgtgacc 360
 gtgtctagcg cgtcgaccaa gggccccagc gtgttcccgc tagccccag cagcaagagc 420
 accagcggcg gcacagccgc cctgggctgc ctggtgaagg actacttccc cgagcccgctg 480
 accgtgtcct ggaactctgg agccctgacc tccggcgtgc acaccttccc cgccgtgctc 540
 cagagcagcg gcctgtacag cctgagcagc gtggtgacag tgcccagcag cagcctggga 600
 acccagacct acatctgcaa cgtgaaccac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaag 660
 gtggagccca agagctgcga caagaccac acctgcccc cctgccctgc cctgagctg 720
 ctggcgggac cctccgtgtt cctgttcccc cccaagccca aggacaccct gatgatcagc 780
 cggacccccg aggtgacctg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaggacc tgaggtgaag 840
 ttcaattggt acgtggacgg cgtggaggtg cacaacgcca agaccaagcc ccgggaggaa 900
 cagtacaaca gcacctaccg ggtggtgtcc gtgctgaccg tgctgcacca ggactggctg 960
 aacggcaagg aatacaagtg caaggtctcc aacaaggccc tgcctgcccc catcgaaaag 1020
 accatcagca aggccaaggg ccagcccagg gagccccagg tgtacaccct gccccctcc 1080
 cgggacgagc tgaccaagaa ccaggtgtcc ctgacctgtc tgggtgaaggg cttctacccc 1140
 agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaac ggcagcccc agaacaacta caagaccacc 1200
 ccccctgtgc tggacagcga cggcagcttc ttctgtaca gcaagctgac cgtggacaag 1260
 agccggtggc agcagggcaa cgtgttcagc tgetccgtga tgcacgaggc cctgcacaac 1320
 cactacacc cagaagagcct gagcctgtcc cccggcaag 1359

<210> 101
 <211> 1359
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> ADNc de IGHG1 de cadena pesada de GBR VH5(P60A,T62S)

10

<400> 101
 gaagtgaaac tgctggaaag cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggaa cctgagactg 60
 agctgtgccg ccagcggcctt caccttcagc acctacacca tgagctgggt ccgacagacc 120
 cccggcaagc ggctggaatg ggtggcctac atcagcaagg gcgaggcag cacctactac 180
 gccgacagcg tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240
 ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgtgc cagaggcgct 300
 atgtacggca acgacttctt ctaccctatg gactactggg gccagggcac caccgtgacc 360

ES 2 666 126 T3

gtgtctagcg cgtcgaccaa gggccccagc gtgttcccgc tagccccag cagcaagagc 420
 accagcggcg gcacagccgc cctgggctgc ctggtgaagg actacttccc cgagcccgctg 480
 accgtgtcct ggaactctgg agccctgacc tccggcgtgc acaccttccc cgccgtgctc 540
 cagagcagcg gcctgtacag cctgagcagc gtggtgacag tgcccagcag cagcctggga 600
 acccagacct acatctgcaa cgtgaaccac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaag 660
 gtggagccca agagctgcga caagaccac acctgcccc cctgccctgc cctgagctg 720
 ctgggcggac cctccgtgtt cctgttcccc cccaagcca aggacaccct gatgatcagc 780
 cggacccccg aggtgacctg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaggacc tgaggtgaag 840
 ttcaattggt acgtggacgg cgtggagggtg cacaacgcca agaccaagcc ccgggaggaa 900
 cagtacaaca gcacctaccg ggtggtgtcc gtgctgaccg tgctgcacca ggactggctg 960
 aacggcaagg aatacaagtg caaggtctcc aacaaggccc tgccctgcccc catcgaaaag 1020
 accatcagca aggccaaggg ccagcccagg gagccccagg tgtacaccct gccccctcc 1080
 cgggacgagc tgaccaagaa ccagggtgcc ctgacctgtc tggggaaggg cttctacccc 1140
 agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaac ggcagcccg agaacaacta caagaccacc 1200
 ccccctgtgc tggacagcga cggcagcttc ttctgtaca gcaagctgac cgtggacaag 1260
 agccggtggc agcagggcaa cgtgttcagc tgctccgtga tgcacgagge cctgcacaac 1320
 cactacacc agaagagcct gagcctgtcc cccggcaag 1359

<210> 102
 <211> 1359
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> ADNc de IGHG1 de cadena pesada de GBR VH5(K3Q,V37A,R44G)

10

<400> 102
 gaagtgcagc tgctggaaag cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggaag cctgagactg 60
 agctgtgccg ccagcggcctt caccttcagc acctacacca tgagctgggc ccgacagacc 120
 cccggcaagg ggctggaatg ggtggcctac atcagcaagg gcggaggcag cacctactac 180
 cccgacaccg tgaagggcgg gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240
 ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgcccgtgt actactgtgc cagaggcgct 300
 atgtacggca acgacttctt ctaccctatg gactactggg gccagggcac caccgtgacc 360
 gtgtctagcg cgtcgaccaa gggccccagc gtgttcccgc tagccccag cagcaagagc 420
 accagcggcg gcacagccgc cctgggctgc ctggtgaagg actacttccc cgagcccgctg 480
 accgtgtcct ggaactctgg agccctgacc tccggcgtgc acaccttccc cgccgtgctc 540
 cagagcagcg gcctgtacag cctgagcagc gtggtgacag tgcccagcag cagcctggga 600

ES 2 666 126 T3

acccagacct acatctgcaa cgtgaaccac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaag 660
 gtggagccca agagctgcga caagaccac acctgcccc cctgccctgc ccctgagctg 720
 ctggcgcgac cctccgtgtt cctggtcccc cccaagccca aggacaccct gatgatcagc 780
 cggacccccg aggtgacctg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaggacc tgaggtgaag 840
 ttcaattggt acgtggacg cgtggaggtg cacaacgcca agaccaagcc ccgggaggaa 900
 cagtacaaca gcacctaccg ggtggtgtcc gtgctgaccg tgctgcacca ggactggctg 960
 aacggcaagg aatacaagtg caaggtctcc aacaaggccc tgcctgcccc catcgaaaag 1020
 accatcagca aggccaagg ccagcccagg gagccccagg tgtacaccct gccccctcc 1080
 cgggacgagc tgaccaagaa ccaggtgtcc ctgacctgtc tgggtgaaggg cttctacccc 1140
 agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaac ggcagcccc agaacaacta caagaccacc 1200
 cccccgtg cgtgacagcga cggcagcttc ttctgtaca gcaagctgac cgtggacaag 1260
 agccggtggc agcagggcaa cgtgttcagc tgctccgtga tgcacgaggc cctgcacaac 1320
 cactacacc agaagagcct gagcctgtcc cccggaag 1359

<210> 103
 <211> 1359
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> ADNc de IGHG1 de cadena pesada de GBR VH5(K3Q,A49S,Y50A)

10

<400> 103
 gaagtgcagc tgctggaaag cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggaaag cctgagactg 60
 agctgtgccg ccagcggcct caccttcagc acctacacca tgagctgggt ccgacagacc 120
 cccggaagc ggctggaatg ggtgagcgc atcagcaagg ggggagcag cacctactac 180
 cccgacaccg tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240
 ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgtgc cagaggcgct 300
 atgtacggca acgacttctt ctaccctatg gactactggg gccagggcac caccgtgacc 360
 gtgtctagcg cgtcgaccaa gggccccagc gtgttcccgc tagccccag cagcaagagc 420
 accagcggcg gcacagcccg cctgggctgc ctggtgaagg actacttccc cgagcccgctg 480
 accgtgtcct ggaactctg agccctgacc tccggcgtgc acaccttccc cgccgtgctc 540
 cagagcagcg gcctgtacag cctgagcagc gtggtgacag tgcccagcag cagcctggga 600
 acccagacct acatctgcaa cgtgaaccac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaag 660
 gtggagccca agagctgcga caagaccac acctgcccc cctgccctgc ccctgagctg 720
 ctggcgcgac cctccgtgtt cctggtcccc cccaagccca aggacaccct gatgatcagc 780

ES 2 666 126 T3

cggacccccg aggtgacctg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaggacct tgaggtgaag 840
 ttcaattggt acgtggacgg cgtggaggtg cacaacgcca agaccaagcc ccgggaggaa 900
 cagtacaaca gcacctaccg ggtggtgtcc gtgctgaccg tgctgcacca ggactggctg 960
 aacggcaagg aatacaagtg caaggtctcc aacaaggccc tgctgcccc catcgaaaag 1020
 accatcagca aggccaaggg ccagcccagg gagccccagg tgtacaccct gccccctcc 1080
 cgggacgagc tgaccaagaa ccaggtgtcc ctgacctgtc tggggaaggg cttctacccc 1140
 agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaac ggcagcccc agaacaacta caagaccacc 1200
 ccccctgtgc tggacagcga cggcagcttc ttctgtaca gcaagctgac cgtggacaag 1260
 agccggtggc agcagggcaa cgtgttcagc tgctccgtga tgcacgaggc cctgcacaac 1320
 cactacaccc agaagagcct gagcctgtcc cccggcaag 1359

<210> 104
 <211> 1359
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> ADNc de IGHG1 de cadena pesada de GBR VH5(K3Q,P60A,T62S)

10

<400> 104
 gaagtgcagc tgctggaaag cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggaaag cctgagactg 60
 agctgtgccg ccagcggcct caccttcagc acctacacca tgagctgggt ccgacagacc 120
 cccggcaagc ggctggaatg ggtggcctac atcagcaagc ggggaggcag cacctactac 180
 gccgacagcg tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240
 ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgtgc cagaggcgct 300
 atgtacggca acgacttctt ctaccctatg gactactggg gccagggcac caccgtgacc 360
 gtgtctagcg cgtcgaccaa gggccccagc gtgttcccgc tagccccag cagcaagagc 420
 accagcggcg gcacagccgc cctgggctgc ctggtgaagg actacttccc cgagcccgctg 480
 accgtgtect ggaactctgg agccctgacc tccggcgtgc acaccttccc cgccgtgctc 540
 cagagcagcg gcctgtacag cctgagcagc gtggtgacag tgcccagcag cagcctggga 600
 acccagacct acatctgcaa cgtgaaccac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaag 660
 gtggagccca agagctgcga caagaccac acctgcccc cctgcccctgc ccctgagctg 720
 ctgggcggac cctccgtgtt cctgttcccc cccaagccca aggacaccct gatgatcagc 780
 cggacccccg aggtgacctg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaggacct tgaggtgaag 840
 ttcaattggt acgtggacgg cgtggaggtg cacaacgcca agaccaagcc ccgggaggaa 900
 cagtacaaca gcacctaccg ggtggtgtcc gtgctgaccg tgctgcacca ggactggctg 960
 aacggcaagg aatacaagtg caaggtctcc aacaaggccc tgctgcccc catcgaaaag 1020

ES 2 666 126 T3

accatcagca aggccaaggg ccagcccagg gagccccagg tgtacaccct gccccctcc 1080
 cgggacgagc tgaccaagaa ccaggtgtcc ctgacctgtc tggatgaagg cttctacccc 1140
 agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaac ggcagccccg agaacaacta caagaccacc 1200
 ccccctgtgc tggacagcga cggcagcttc ttctgtaca gcaagctgac cgtggacaag 1260
 agccggtggc agcagggcaa cgtgttcagc tgctccgtga tgcacgaggc cctgcacaac 1320
 cactacacc agaagagcct gagcctgtcc cccggcaag 1359

<210> 105
 <211> 1359
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> ADNc de IGHG1 de cadena pesada de GBR VH5(K3Q,T40A,P60A,T62S)

10

<400> 105
 gaagtgcagc tgctggaaa cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggaa cctgagactg 60
 agctgtgccg ccagcggcct caccctcagc acctacacca tgagctgggt ccgacaggcc 120
 cccggcaagc ggctggaatg ggtggcctac atcagcaagg ggggaggcag cacctactac 180
 gccgacagc tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240
 ctgcagatga acagcctgag ggcagaggac accgccgtgt actactgtgc cagaggcgct 300
 atgtacggca acgacttctt ctaccctatg gactactggg gccagggcac caccctgacc 360
 gtgtctagc cgtcgaccaa gggccccagc gtgttcccgc tagccccag cagcaagagc 420
 accagcggcg gcacagccgc cctgggctgc ctggtgaagg actacttccc cgagcccgctg 480
 accgtgtcct ggaactctgg agccctgacc tccggcgtgc acaccttccc cgccgtgctc 540
 cagagcagc gcctgtacag cctgagcagc gtggtgacag tgcccagcag cagcctggga 600
 acccagacct acatctgcaa cgtgaaccac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaag 660
 gtggagccca agagctgcga caagaccac acctgcccc cctgccctgc ccctgagctg 720
 ctggcgggac cctccgtgtt cctgttcccc cccaagcca aggacaccct gatgatcagc 780
 cggacccccg aggtgacctg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaggacc tgaggtgaag 840
 ttcaattggt acgtggacgg cgtggaggtg cacaacgcca agaccaagcc cgggaggaa 900
 cagtacaaca gcacctaccg ggtggtgtcc gtgctgaccg tgctgcacca ggactggctg 960
 aacggcaagg aatacaagtg caaggtctcc aacaaggccc tgcctgcccc catcgaagaa 1020
 accatcagca aggccaaggg ccagcccagg gagccccagg tgtacaccct gccccctcc 1080
 cgggacgagc tgaccaagaa ccaggtgtcc ctgacctgtc tggatgaagg cttctacccc 1140
 agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaac ggcagccccg agaacaacta caagaccacc 1200
 ccccctgtgc tggacagcga cggcagcttc ttctgtaca gcaagctgac cgtggacaag 1260
 agccggtggc agcagggcaa cgtgttcagc tgctccgtga tgcacgaggc cctgcacaac 1320
 cactacacc agaagagcct gagcctgtcc cccggcaag 1359

15

<210> 106
 <211> 1359
 <212> ADN

ES 2 666 126 T3

<213> Artificial

<220>

<223> ADNc de IGHG1 de cadena pesada de GBR VH5(K3Q,V37A,T40A,P60A,T62S)

5

<400> 106

```

gaagtgcagc tgctggaaag cggcggagggc ctggtgcagc ctggcggaaag cctgagactg      60
agctgtgccg ccagcggcctt caccttcagc acctacacca tgagctgggc ccgacaggcc      120
cccggcaagc ggctggaatg ggtggcctac atcagcaagg ggggaggcag cacctactac      180
gccgacagcg tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac      240
ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgtgc cagaggcgct      300
atgtacggca acgacttctt ctaccctatg gactactggg gccagggcac caccgtgacc      360
gtgtctagcg cgtcgaccaa gggccccagc gtgttcccgc tagccccagc cagcaagagc      420
accagcggcg gcacagccgc cctgggctgc ctggtgaagg actacttccc cgagcccgtg      480
accgtgtcct ggaactctg agccctgacc tccggcgtgc acaccttccc cgccgtgctc      540
cagagcagcg gcctgtacag cctgagcagc gtggtgacag tgcccagcag cagcctggga      600
accagacctt acatctgcaa cgtgaaccac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaag      660
gtggagccca agagctgcga caagaccac acctgcccc cctgccctgc ccctgagctg      720
ctggcgggac cctccgtgtt cctgttcccc cccaagccca aggacaccct gatgatcagc      780
cggacccccg aggtgacctg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaggacc tgaggtgaag      840
ttcaattggt acgtggacg cgtggaggtg cacaacgcca agaccaagcc ccgggaggaa      900
cagtacaaca gcacctaccg ggtggtgtcc gtgctgaccg tgctgcacca ggactggctg      960
aacggcaagg aatacaagtg caaggtctcc aacaaggccc tgctgcccc catcgaaaag     1020
accatcagca aggccaagg ccagcccagg gagccccagg tgtacaccct gccccctcc     1080
cgggacgagc tgaccaagaa ccaggtgtcc ctgacctgtc tgggtgaaggg cttctacccc     1140
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaac ggccagcccg agaacaacta caagaccacc     1200
ccccctgtgc tggacagcga cggcagcttc ttctgtaca gcaagctgac cgtggacaag     1260
agccggtggc agcagggcaa cgtgttcagc tgctccgtga tgcacgagge cctgcacaac     1320
cactacacc cagaagagcct gagcctgtcc cccggcaag                               1359

```

<210> 107

<211> 1359

<212> ADN

<213> Artificial

10

<220>

<223> ADNc de IGHG1 de cadena pesada de GBR VH5(K3Q,T40A,R44G,A49S,Y50A)

15

<400> 107

ES 2 666 126 T3

gaagtgcagc tgctggaaag cggcggaggg ctggtgcagc ctggcggaaag cctgagactg 60
agctgtgccg ccagcggcctt caccttcagc acctacacca tgagctgggt ccgacaggcc 120
cccggcaagg gcctggaatg ggtgagcgcc atcagcaagg gcgagggcag cacctactac 180
cccgacaccg tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240
ctgcagatga acagcctgcg gggcgaggac accgccgtgt actactgtgc cagaggcgct 300
atgtacggca acgacttctt ctaccctatg gactactggg gccagggcac caccgtgacc 360
gtgtctagcg cgtcgaccaa gggccccagc gtgttcccgc tagccccag cagcaagagc 420
accagcggcg gcacagcccg cctgggctgc ctggtgaagg actacttccc cgagcccgctg 480
accgtgtcct ggaactctgg agccctgacc tccggcgtgc acaccttccc cgccgtgctc 540
cagagcagcg gcctgtacag cctgagcagc gtggtgacag tgcccagcag cagcctggga 600
accagacct acatctgcaa cgtgaaccac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaag 660
gtggagccca agagctgcga caagaccac acctgcccc cctgccctgc ccctgagctg 720
ctgggcggac cctccgtgtt cctgttcccc cccaagccca aggacaccct gatgatcagc 780
cggacccccg aggtgacctg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaggacc cagaggtgaag 840
ttcaattggt acgtggacgg cgtggaggtg cacaacgcca agaccaagcc ccgggaggaa 900
cagtacaaca gcacctaccg ggtggtgtcc gtgtgaccg tgctgcacca ggactggctg 960
aacggcaagg aatacaagtg caaggtctcc aacaaggccc tgctgcccc catcgaaaag 1020
accatcagca aggccaagg ccagcccagg gagccccagg tgtacaccct gccccctcc 1080
cgggacgagc tgaccaagaa ccaggtgtcc ctgacctgtc tgggtgaaggg cttctacccc 1140
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaac ggcagcccg agaacaacta caagaccacc 1200
ccccctgtgc tggacagcga cggcagcttc ttctgtaca gcaagctgac cgtggacaag 1260
agccggtggc agcagggcaa cgtgttcagc tgctccgtga tgcacgaggc cctgcacaac 1320
cactacacc cagaagacct gagcctgtcc cccggcaag 1359

<210> 108
<211> 1359
5 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
10 <223> ADNc de IGHG1 de cadena pesada de GBR VH5(K3Q,A49S,Y50A,P60A,T62S)

<400> 108

ES 2 666 126 T3

gaagtgcagc tgctggaaag cggcggaggg ctggtgcagc ctggcggaag cctgagactg 60
 agctgtgccg ccagcggcctt caccttcagc acctacacca tgagctgggt ccgacagacc 120
 cccggcaagc ggctggaatg ggtgagcgcc atcagcaagg gcgagggcag cacctactac 180
 gccgacagcg tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240
 ctgcagatga acagcctgcg gggcgaggac accgccgtgt actactgtgc cagaggcgct 300
 atgtacggca acgacttctt ctaccctatg gactactggg gccagggcac caccgtgacc 360
 gtgtctagcg cgtcgaccaa gggccccagc gtgttcccgc tagccccag cagcaagagc 420
 accagcggcg gcacagcccg cctgggctgc ctggtgaagg actacttccc cgagcccgctg 480
 accgtgtcct ggaactctgg agccctgacc tccggcgtgc acaccttccc cgccgtgctc 540
 cagagcagcg gcctgtacag cctgagcagc gtggtgacag tgcccagcag cagcctggga 600
 acccagacct acatctgcaa cgtgaaccac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaag 660
 gtggagccca agagctgcga caagaccac acctgcccc cctgccctgc ccctgagctg 720
 ctgggcggac cctccgtgtt cctgttcccc cccaagccca aggacaccct gatgatcagc 780
 cggacccccg aggtgacctg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaggacc cagagtgaa 840
 ttcaattggt acgtggacgg cgtggaggtg cacaacgcca agaccaagcc ccgggaggaa 900
 cagtacaaca gcacctaccg ggtggtgtcc gtgtgaccg tgctgcacca ggactggctg 960
 aacggcaagg aatacaagt caaggtctcc aacaaggccc tgctgcccc catcgaaaag 1020
 accatcagca aggccaagg ccagcccagg gagccccagg tgtacaccct gccccctcc 1080
 cgggacgagc tgaccaagaa ccaggtgtcc ctgacctgtc tgggtgaagg cttctacccc 1140
 agcgacatcg ccgtggagt ggagagcaac ggcagcccg agaacaacta caagaccacc 1200
 ccccctgtgc tggacagcga cggcagcttc ttctgtaca gcaagctgac cgtggacaag 1260
 agccggtggc agcagggcaa cgtgttcagc tgctccgtga tgcacgaggc cctgcacaac 1320
 cactacacc agaagagcct gagcctgtcc cccggcaag 1359

<210> 109
 <211> 1359
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> ADNc de IGHG1 de cadena pesada de GBR VH5(K3Q,T40A,R44G,A49S,Y50A,P60A,T62S)

10

<400> 109
 gaagtgcagc tgctggaaag cggcggaggg ctggtgcagc ctggcggaag cctgagactg 60
 agctgtgccg ccagcggcctt caccttcagc acctacacca tgagctgggt ccgacaggcc 120
 cccggcaagg gcctggaatg ggtgagcgcc atcagcaag gcgagggcag cacctactac 180

ES 2 666 126 T3

gccgacagcg tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240
ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgtgc cagaggcgct 300
atgtacggca acgacttctt ctaccctatg gactactggg gccagggcac caccgtgacc 360
gtgtctagcg cgtcgaccaa gggccccagc gtgttcccgc tagccccag cagcaagagc 420
accagcggcg gcacagccgc cctgggctgc ctggtgaagg actacttccc cgagcccgctg 480
accgtgtcct ggaactctgg agccctgacc tccggcgtgc acaccttccc cgccgtgctc 540
cagagcagcg gcctgtacag cctgagcagc gtggtgacag tgcccagcag cagcctggga 600
accagacct acatctgcaa cgtgaaccac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaag 660
gtggagccca agagctgcga caagaccac acctgcccc cctgccctgc cctgagctg 720
ctggcgggac cctccgtgtt cctgttcccc cccaagccca aggacaccct gatgatcagc 780
cggacccccg aggtgacctg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaggacc tgaggtgaag 840
ttcaattggt acgtggacgg cgtggaggtg cacaacgcca agaccaagcc ccgggaggaa 900
cagtacaaca gcacctaccg ggtggtgtcc gtgctgaccg tgctgcacca ggactggctg 960
aacggcaagg aatacaagtg caaggtctcc aacaaggccc tgcctgcccc catcgaaaag 1020
accatcagca aggccaaggg ccagcccagg gagccccagg tgtacaccct gccccctcc 1080
cgggacgagc tgaccaagaa ccaggtgtcc ctgacctgtc tgggtgaaggg cttctacccc 1140
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaac gccagcccg agaacaacta caagaccacc 1200
ccccctgtgc tggacagcga cggcagcttc ttctgtaca gcaagctgac cgtggacaag 1260
agccggtggc agcagggcaa cgtgttcagc tgetccgtga tgcacgaggc cctgcacaac 1320
cactacacc cagaagagcct gagcctgtcc cccggcaag 1359

<210> 110
<211> 1359
5 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
10 <223> ADNc de IGHG1 de cadena pesada de GBR VH5(K3Q,T40A,R44G,A49S,Y50A,P60A,T62S,R94K)

<400> 110
gaagtgcagc tgctggaaag cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggaa cctgagactg 60
agctgtgccg ccagcggcct cacctcagc acctacacca tgagctgggt ccgacaggcc 120
cccggcaagg gcctggaatg ggtgagcgc atcagcaagg gcggaggcag cacctactac 180
gccgacagcg tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240
ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccgtgt actactgtgc caagggcgct 300
atgtacggca acgacttctt ctaccctatg gactactggg gccagggcac caccgtgacc 360

ES 2 666 126 T3

gtgtctagcg cgtcgaccaa gggccccagc gtgttcccgc tagccccag cagcaagagc 420
accagcggcg gcacagccgc cctgggctgc ctggtgaagg actacttccc cgagcccgctg 480
accgtgtcct ggaactctgg agccctgacc tccggcgtgc acaccttccc cgccgtgctc 540
cagagcagcg gcctgtacag cctgagcagc gtggtgacag tgcccagcag cagcctggga 600
accagacct acatctgcaa cgtgaaccac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaag 660
gtggagccca agagctgcga caagaccac acctgcccc cctgccctgc ccctgagctg 720
ctgggcggac cctccgtgtt cctgttcccc cccaagcca aggacaccct gatgatcagc 780
cggacccccg aggtgacctg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaggacc tgaggtgaag 840
ttcaattggt acgtggacgg cgtggagggtg cacaacgcca agaccaagcc ccgggaggaa 900
cagtacaaca gcacctaccg ggtggtgtcc gtgctgaccg tgctgcacca ggactggctg 960
aacggcaagg aatacaagtg caaggtctcc aacaaggccc tgctgcccc catcgaaaag 1020
accatcagca aggccaaggg ccagcccagg gagccccagg tgtacaccct gccccctcc 1080
cgggacgagc tgaccaagaa ccagggtgcc ctgacctgtc tggggaaggg cttctacccc 1140
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaac ggcagcccg agaacaacta caagaccacc 1200
ccccctgtgc tggacagcga cggcagcttc ttctgtaca gcaagctgac cgtggacaag 1260
agccggtggc agcagggcaa cgtgttcagc tgctccgtga tgcacgagge cctgcacaac 1320
cactacacc agaagagcct gagcctgtcc cccggcaag 1359

<210> 111
<211> 1359
5 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
10 <223> ADNc de IGHG1 de cadena pesada de GBR VH1(V37A)

<400> 111
gaagtgcagc tgctggaaag cggcggaggc ctggtgcagc caggcggcag cctgaggctg 60
tcctgcgccg ccagcggcct caccttcagc acctacacca tgagctgggc ccgacaggcc 120
ccaggcaagg gcctggaatg ggtgtcctac atcagcaagg gcggaggaag cacctactac 180
cccgacaccg tgaagggcag gttcaccatc agcagggaca acagcaagaa caccctgtac 240
ctgcagatga acagcctgag ggccgaggac accgcccgtg actactgcgc caagggcgcc 300
atgtacggca acgacttttt ctaccccatg gactactggg ggcagggcac caccgtgacc 360
gtgtctagcg cgtcgaccaa gggccccagc gtgttcccgc tagccccag cagcaagagc 420
accagcggcg gcacagccgc cctgggctgc ctggtgaagg actacttccc cgagcccgctg 480
accgtgtcct ggaactctgg agccctgacc tccggcgtgc acaccttccc cgccgtgctc 540

ES 2 666 126 T3

cagagcagcg gcctgtacag cctgagcagc gtggtgacag tgcccagcag cagcctggga 600
 acccagacct acatctgcaa cgtgaaccac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaag 660
 gtggagccca agagctgcga caagaccac acctgcccc cctgccctgc ccctgagctg 720
 ctgggaggac cctccgtgtt cctgttcccc cccaagccca aggacaccct gatgatcagc 780
 cggacccccg aggtgacctg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaggacce tgaggtgaag 840
 ttcaattggt acgtggacgg cgtggaggtg cacaacgcca agaccaagcc ccgggaggaa 900
 cagtacaaca gcacctaccg ggtggtgtcc gtgctgaccg tgctgcacca ggactggctg 960
 aacggcaagg aatacaagtg caaggtctcc aacaaggccc tgcctgcccc catcgaaaag 1020
 accatcagca aggccaaggg ccagcccagg gagccccagg tgtacaccct gccccctcc 1080
 cgggacgagc tgaccaagaa ccaggtgtcc ctgacctgtc tgggtaaggg cttctacccc 1140
 agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaac ggccagcccg agaacaacta caagaccacc 1200
 ccccctgtgc tggacagcga cggcagcttc ttctgtaca gcaagctgac cgtggacaag 1260
 agccggtggc agcagggcaa cgtgttcagc tgetccgtga tgcacgaggc cctgcacaac 1320
 cactacacc cagaagagcct gagcctgtcc cccggcaag 1359

<210> 112
 <211> 1359
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> ADNc de IGHG1 de cadena pesada de GBR900 VH3(V37A)

10

<400> 112
 gaagtgcagc tgctggaaag cggcggaggg ctggtgcagc caggcggcag cctgaggctg 60
 tcctgcgccg ccagcggcct caccttcagc acctacacca tgagctgggc ccgacagacc 120
 cccggcaaga ggctggaatg ggtggcctac atcagcaagg ggggaggaag cacctactac 180
 cccgacaccg tgaagggcag gttcaccatc agcagggaca acagcaagaa caccctgtac 240
 ctgcagatga acagcctgag ggccgaggac accgccgtgt actactgccc caagggcgcc 300
 atgtacggca acgacttttt ctaccccatg gactactggg ggcagggcac caccgtgacc 360
 gtgtctagcg cgtcgaccaa gggccccagc gtgttcccgc tagccccag cagcaagagc 420
 accagcggcg gcacagccgc cctgggctgc ctggtgaagg actacttccc cgagcccgtg 480
 accgtgtcct ggaactctgg agccctgacc tccggcgtgc acaccttccc cgccgtgctc 540
 cagagcagcg gcctgtacag cctgagcagc gtggtgacag tgcccagcag cagcctggga 600
 acccagacct acatctgcaa cgtgaaccac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaag 660
 gtggagccca agagctgcga caagaccac acctgcccc cctgccctgc ccctgagctg 720
 ctgggaggac cctccgtgtt cctgttcccc cccaagccca aggacaccct gatgatcagc 780

ES 2 666 126 T3

cggacccccg aggtgacctg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaggaccc tgaggtgaag 840
 ttcaattggt acgtggacgg cgtggaggtg cacaacgcca agaccaagcc ccgggaggaa 900
 cagtacaaca gcacctaccg ggtggtgtcc gtgctgaccg tgctgcacca ggactggctg 960
 aacggcaagg aatacaagtg caaggtctcc aacaaggccc tgcctgcccc catcgaaaag 1020
 accatcagca aggccaaggg ccagcccagg gagccccagg tgtacaccct gccccctcc 1080
 cgggacgagc tgaccaagaa ccaggtgtcc ctgacctgtc tggggaaggg cttctacccc 1140
 agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaac ggcagccccg agaacaacta caagaccacc 1200
 ccccctgtgc tggacagcga cggcagcttc ttctgtaca gcaagctgac cgtggacaag 1260
 agccggtggc agcagggcaa cgtgttcagc tgctccgtga tgcacgaggc cctgcacaac 1320
 cactacaccc agaagagcct gagcctgtcc cccggcaag 1359

 <210> 113
 <211> 318
 5 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> ADNc de dominio variable de VL1
 10
 <400> 113
 gagatcgtgc tgacctagag ccccgccacc ctgtctctga gccctggcga gagagccacc 60
 ctgagctgta gcgcctccag cagcgtgtcc tacatgcaact ggtatcagca gaagcccggc 120
 caggccccca gactgctgat ctacaccacc agcaacctgg ccagcggcat ccccgccaga 180
 tttctggca gcggcagcgg caccgacttc accctgacca tcagcagcct ggaaccogag 240
 gatttcgccg tgtattattg ccaccagtgg tccagctacc cctggacctt cggccagggg 300
 accaagctgg aaatcaag 318

 <210> 114
 <211> 318
 15 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> ADNc de dominio variable de VL3
 20
 <400> 114
 cagatcgtgc tgacctagag ccccgccacc ctgagcctga gccagggcga gagggccacc 60
 ctgtcctgca gcgccagcag cagcgtgagc tacatgcaact ggtaccagca gaagcccggc 120
 cagagcccaa gactgctgat ctacaccacc tccaacctgg ccagcggcat cccagcaggg 180
 ttcagcggca gcggctccgg cacctctac accctgacca tcagcagcct ggaaccogag 240
 gacttcgccg tgtactactg ccaccagtgg agcagctacc cctggacctt cggcggcggg 300
 accaagctgg aaatcaag 318
 25
 <210> 115
 <211> 639
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> ADNc de cadena ligera de BXhVL1

ES 2 666 126 T3

<400> 115
gagatcgtgc tgaccagag ccccgccacc ctgtctctga gccctggcga gagagccacc 60
ctgagctgta gcgcctccag cagcgtgtcc tacatgcaact ggtatcagca gaagcccggc 120
caggccccca gactgctgat ctacaccacc agcaacctgg ccagcggcat ccccgccaga 180
ttttctggca gcggcagcgg caccgacttc accctgacca tcagcagcct ggaaccogag 240
gatttcgccg tgtattattg ccaccagtgg tccagctacc cctggacctt cggccagggg 300
accaagctgg aaatcaagcg tacggtggcc gctcccagcg tgttcatctt cccccccagc 360
gacgagcagc tgaagagcgg caccgcctcc gtggtgtgcc tgctgaacaa cttctacccc 420
cgggaggcca aggtgcagtg gaaggtggac aacgccctcc agagcggcaa cagccaggaa 480
agcgtcaccg agcaggacag caaggactcc acctacagcc tgagcagcac cctgaccctg 540
agcaaggccg actacgagaa gcacaaggtg tacgcctgcg aggtgaccca ccagggcctg 600
tccagccccg tgaccaagag cttcaaccgg ggcgagtgc 639

<210> 116
<211> 639
<212> ADN
<213> Artificial

5

<220>
<223> ADNc de cadena ligera de BXhVL3

10

<400> 116
cagatcgtgc tgaccagag ccccgccacc ctgagcctga gccagcga gagggccacc 60
ctgtcctgca gcgccagcag cagcgtgagc tacatgcaact ggtaccagca gaagcccggc 120
cagagcccaa gactgctgat ctacaccacc tccaacctgg ccagcggcat ccccagcagg 180
ttcagcggca gcggctccgg caccttctac accctgacca tcagcagcct ggaaccogag 240
gacttcgccg tgtactactg ccaccagtgg agcagctacc cctggacctt cggcggcggg 300
accaagctgg aaatcaagcg tacggtggcc gctcccagcg tgttcatctt cccccccagc 360
gacgagcagc tgaagagcgg caccgcctcc gtggtgtgcc tgctgaacaa cttctacccc 420
cgggaggcca aggtgcagtg gaaggtggac aacgccctcc agagcggcaa cagccaggaa 480
agcgtcaccg agcaggacag caaggactcc acctacagcc tgagcagcac cctgaccctg 540
agcaaggccg actacgagaa gcacaaggtg tacgcctgcg aggtgaccca ccagggcctg 600
tccagccccg tgaccaagag cttcaaccgg ggcgagtgc 639

15

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-TrkA humanizado o fragmento del mismo que se une a TrkA humano que comprende una de las siguientes combinaciones de dominio variable de cadena pesada y ligera que comprende las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, y SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 8 en donde la región no CDR del dominio variable de cadena pesada comprende una sustitución de aminoácido en una posición de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en V37A o K3Q y V37A, en donde la posición de aminoácido de cada miembro de grupo se indica utilizando el sistema de numeración establecido en Kabat.
2. El anticuerpo anti-TrkA humanizado o fragmento del mismo de la reivindicación 1, en donde la sustitución de aminoácidos de la región no CDR del dominio variable de cadena pesada del anticuerpo o el fragmento del mismo comprende V37A o K3Q y V37A, en donde la posición del aminoácido se indica utilizando el sistema de numeración establecido en Kabat.
3. Un anticuerpo anti-TrkA humanizado o fragmento del mismo de la reivindicación 1 ó 2 que comprende:
- a) un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 31-34, 36, 48-49, y
 - b) un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 6 y 8.
4. El anticuerpo anti-TrkA humanizado o fragmento del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además regiones constantes pesadas y/o ligeras y una región bisagra, en el que la región constante pesada y la región bisagra son de isotipoIGHG1 humano o del isotipoIGHG4 humano, en particular la región constante pesada y la región bisagra son del isotipoIGHG4 humano, en donde la región bisagra comprende la sustitución de aminoácido S228P, en donde la posición del aminoácido se indica utilizando el sistema de numeración EU.
5. El anticuerpo humanizado anti-TrkA o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 que comprende:
- a) una cadena pesada que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 50-54, 56, 57, 69 y 70 y
 - b) una cadena ligera que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 29 y 30.
6. El anticuerpo anti-TrkA humanizado o fragmento del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa o en el que:
- el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en Fab, Fab', Fab'-SH, Fd, Fv, dAb, F(ab')₂, scFv, dímeros Fv de cadena única biespecíficos, diacuerpos, triacuerpos y scFv genéticamente fusionados al mismo o diferente anticuerpo.
7. El anticuerpo anti-TrkA humanizado o fragmento del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el anticuerpo anti-TrkA humanizado o fragmento del mismo es capaz de inhibir la activación funcional de TrkA.
8. El anticuerpo anti-TrkA humanizado o fragmento del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el anticuerpo anti-TrkA humanizado o fragmento del mismo se une al TrkA humano con una afinidad (KD) de 500 nM o menos.
9. El anticuerpo anti-TrkA humanizado o fragmento del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el anticuerpo anti-TrkA humanizado o fragmento del mismo tiene al menos una IC50 equivalente o menor en un ensayo de proliferación celular de TF-1 que el correspondiente anticuerpo murino parental.
10. El anticuerpo anti-TrkA humanizado o fragmento del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el anticuerpo anti-TrkA humanizado tiene una temperatura de termoestabilidad de fragmento FAB superior a 65°C que es equivalente a la temperatura de termoestabilidad del fragmento FAB del anticuerpo murino parental.
11. Una composición que comprende el anticuerpo anti-TrkA humanizado o fragmento del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
12. La composición de la reivindicación 11 que comprende adicionalmente otro agente farmacéuticamente activo en el que dicho otro agente farmacéuticamente activo es uno o más de:
- a) un agente analgésico

b) otro anticuerpo anti-TrkA

c) NGF

d) un agente anticáncer

e) un anticuerpo anti-NGF.

5 13. El anticuerpo humanizado anti-TrkA o fragmento del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, la composición de la reivindicación 11 ó 12, para su uso en el tratamiento del dolor.

10 14. El anticuerpo humanizado anti-TrkA o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, la composición de la reivindicación 11 ó 12, para su uso en el tratamiento del dolor asociado con uno o más de los siguientes: dolor inflamatorio, post-quirúrgico dolor, dolor postoperatorio (incluido dolor dental), dolor neuropático, neuropatía periférica, neuropatía diabética, nefropatía diabética, dolor de fractura, dolor en las articulaciones de la gota, neuralgia postherpética, dolor por cáncer, dolor por osteoartritis o artritis reumatoide, ciática, dolores asociados con crisis de células falciformes, dolores de cabeza (p. ej., migrañas, cefalea tensional, cefalea en racimos), dismenorrea, endometriosis, fibromas uterinos, dolor musculoesquelético, dolor lumbar crónico, fibromialgia, esguinces, dolor visceral, quistes ováricos, prostatitis, síndrome de dolor pélvico crónico, cistitis, cistitis intersticial, síndrome de vejiga dolorosa y/o síndrome doloroso de vejiga, dolor asociado con prostatitis abacteriana crónica, dolor incisional, migraña, neuralgia del trigémino, dolor por quemaduras y/o heridas, dolor asociado a traumatismos, dolor asociado con enfermedades musculoesqueléticas, espondilitis anquilosante, patologías periarticulares, dolor por metástasis óseas, dolor por VIH, eritromelalgia o dolor causado por pancreatitis o cálculos renales, melanoma maligno, síndrome de Sjogren, asma (por ejemplo, asma no controlada con hipersensibilidad grave a las vías respiratorias), tos intratable, enfermedades desmielinizantes, alcoholismo crónico, apoplejía, síndrome de dolor talámico, dolor por toxinas, dolor por quimioterapia, trastornos inflamatorios del intestino, síndrome del intestino irritable, trastornos oculares inflamatorios, trastornos inflamatorios o inestables de la vejiga, psoriasis, afecciones cutáneas con componentes inflamatorios, quemaduras solares, carditis, dermatitis, miositis, neuritis, enfermedades vasculares del colágeno, afecciones inflamatorias crónicas, dolor inflamatorio y asociado a hiperalgesia y alodinia, dolor neuropático y asociado a hiperalgesia o alodinia, dolor por neuropatía diabética, causalgia, dolor mantenido por simpatía, síndromes de desaferenciación, daño o disfunción del tejido epitelial, alteraciones de la motilidad visceral en regiones respiratorias, genitourinarias, gastrointestinales o vasculares, reacciones cutáneas alérgicas, prurito, vitiligo, trastornos gastrointestinales generales, colitis, ulceración gástrica, úlceras duodenales, rinitis vasomotora o alérgica, trastornos bronquiales, dispepsia, reflujo gastroesofágico, pancreatitis, visceralgia, displasia fibrosa ósea (DF), dolor oncológico, infección por VIH, enfermedad de Crohn y adherencias posquirúrgicas, cálculos de la vesícula biliar.

15 15. Un artículo de fabricación que comprende el anticuerpo anti-TrkA humanizado o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o la composición de la reivindicación 11 y 12.

FIG. 1A

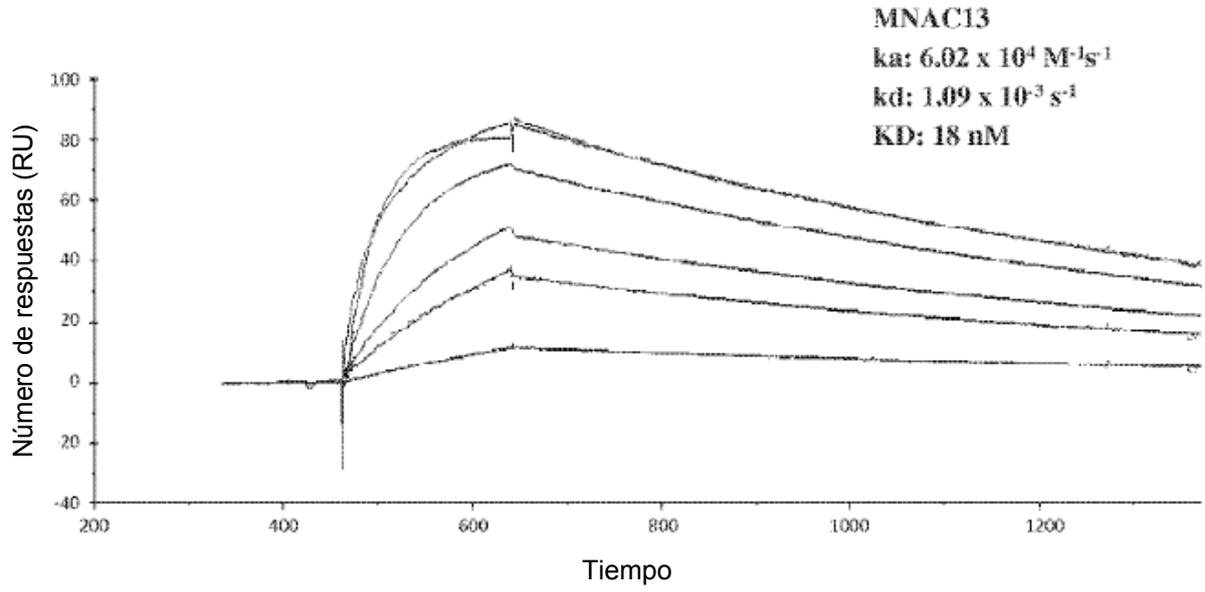


FIG. 1B

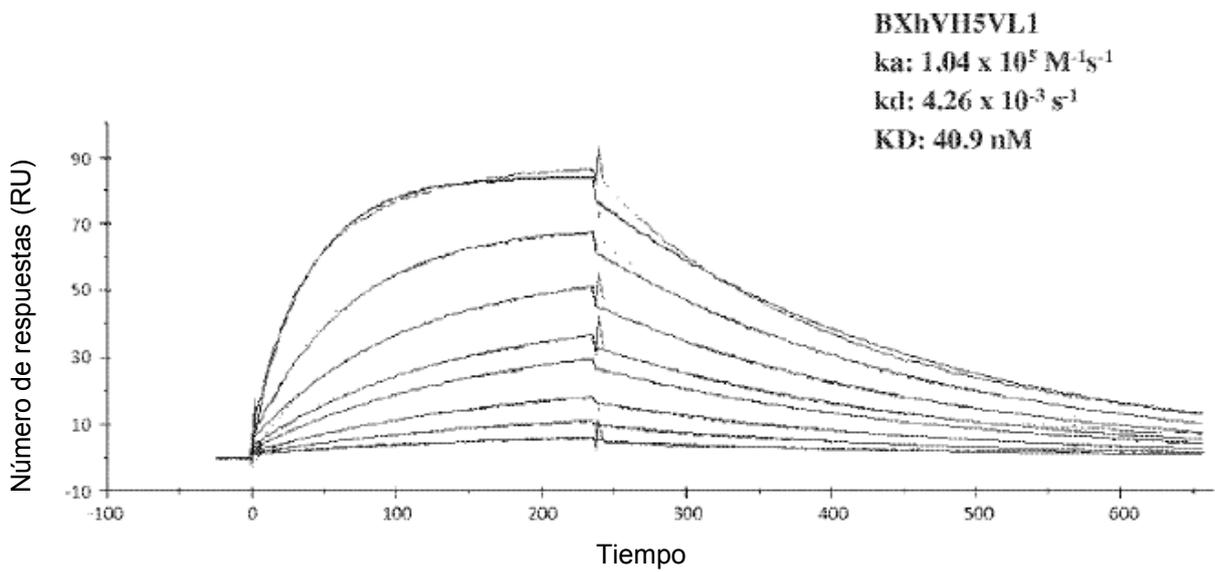


FIG. 1C

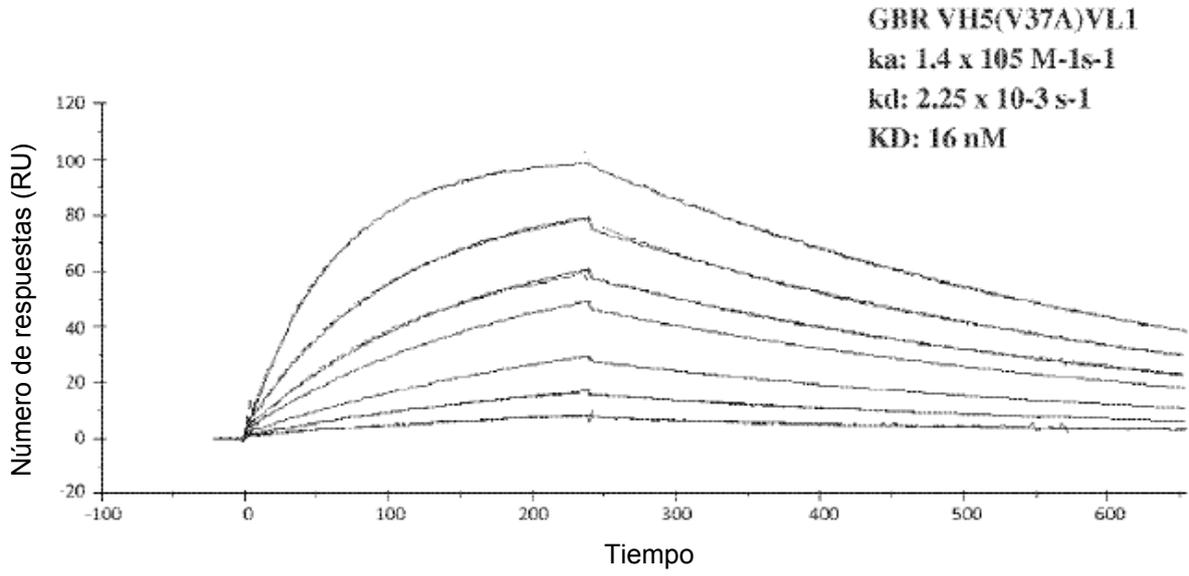


FIG. 1D

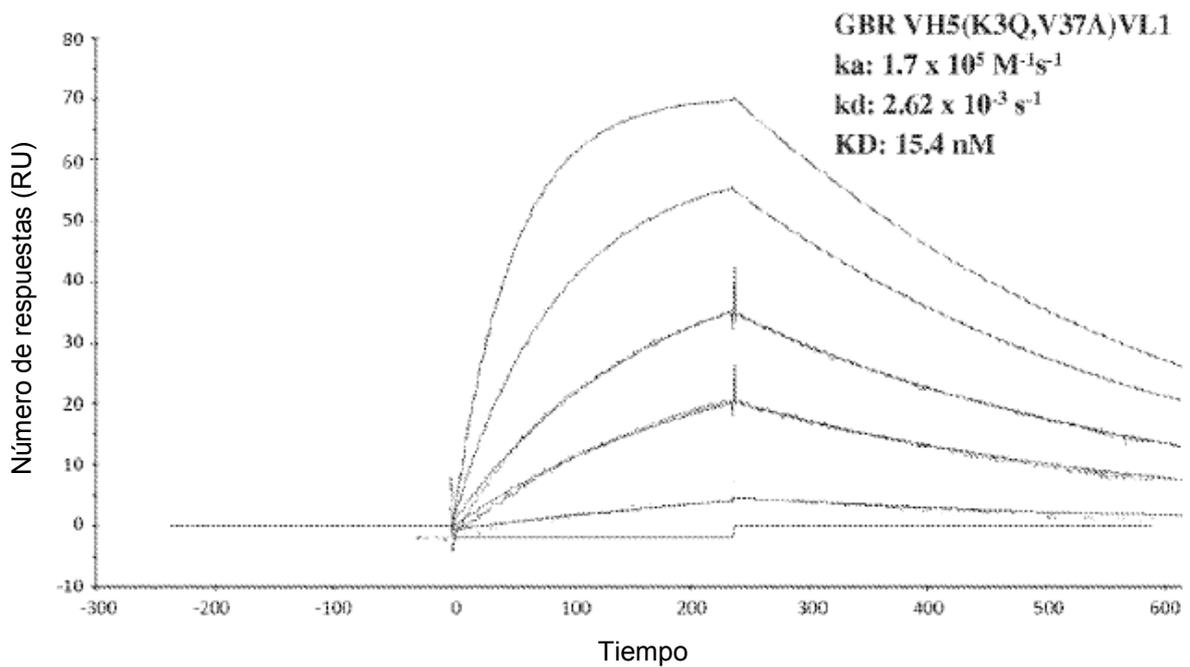


FIG. 2A

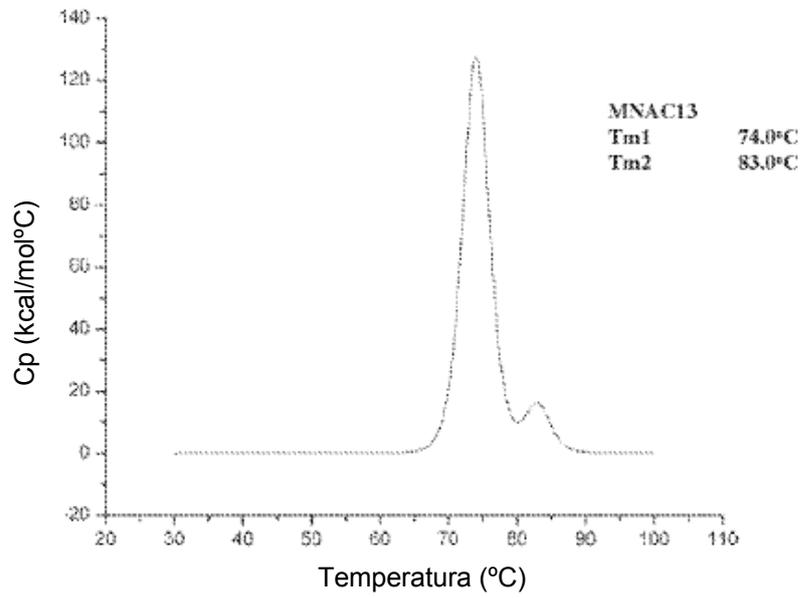


FIG. 2B

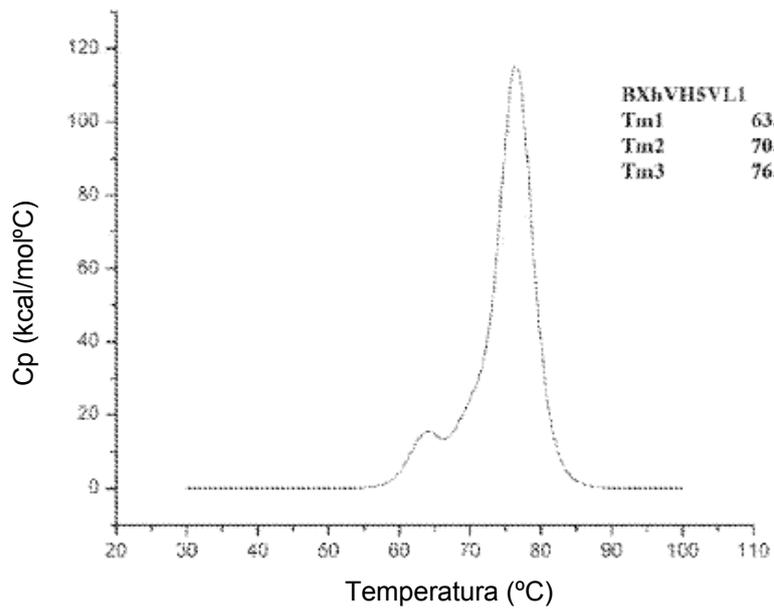


FIG. 2C

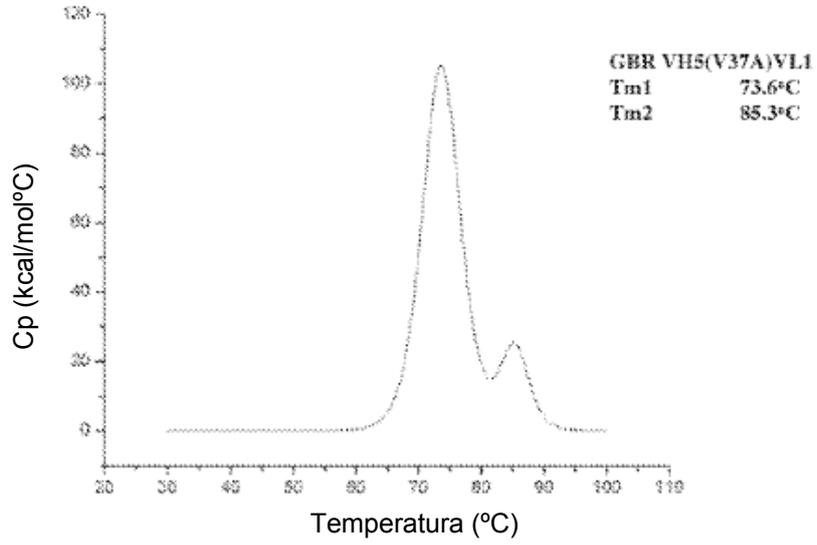


FIG. 2D

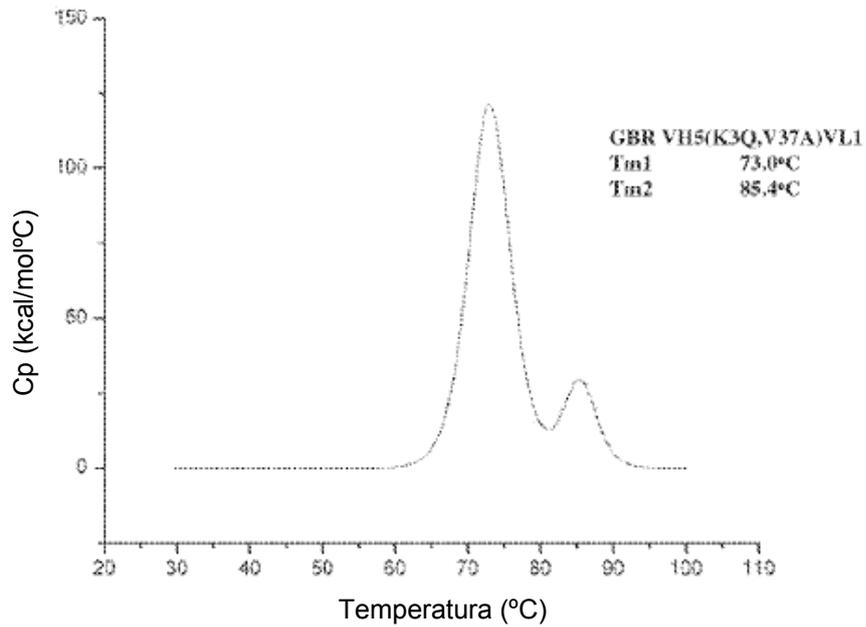


FIG. 2E

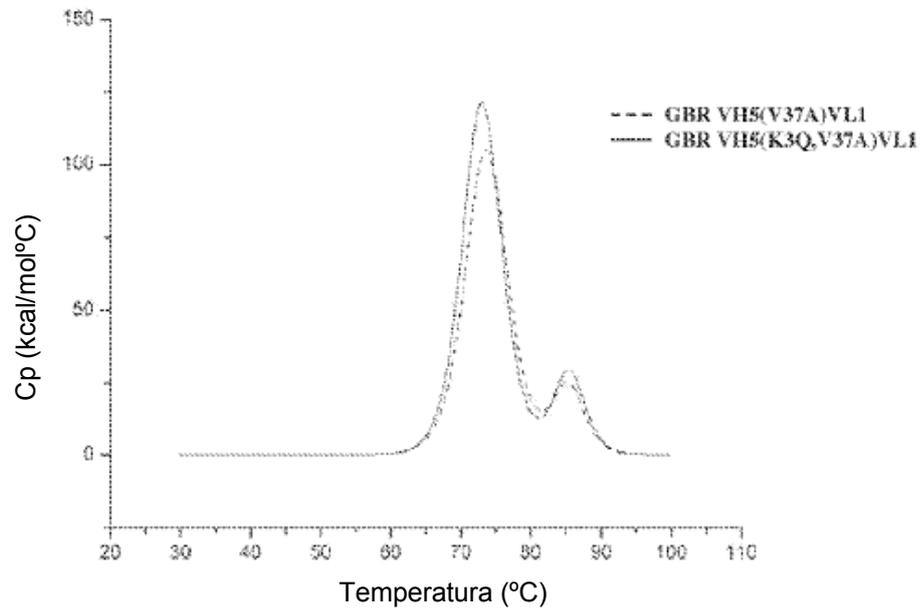


FIG. 2F

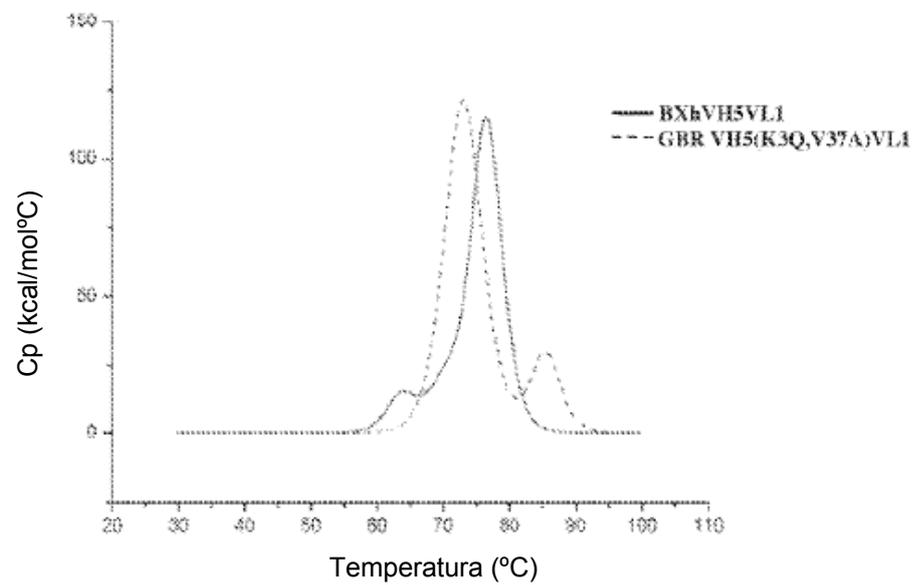


FIG. 2G

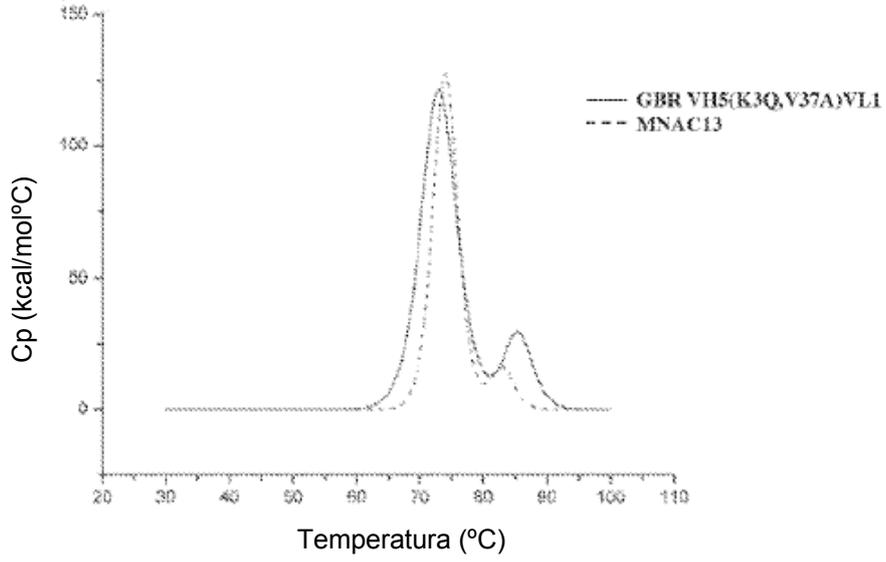


FIG. 3A

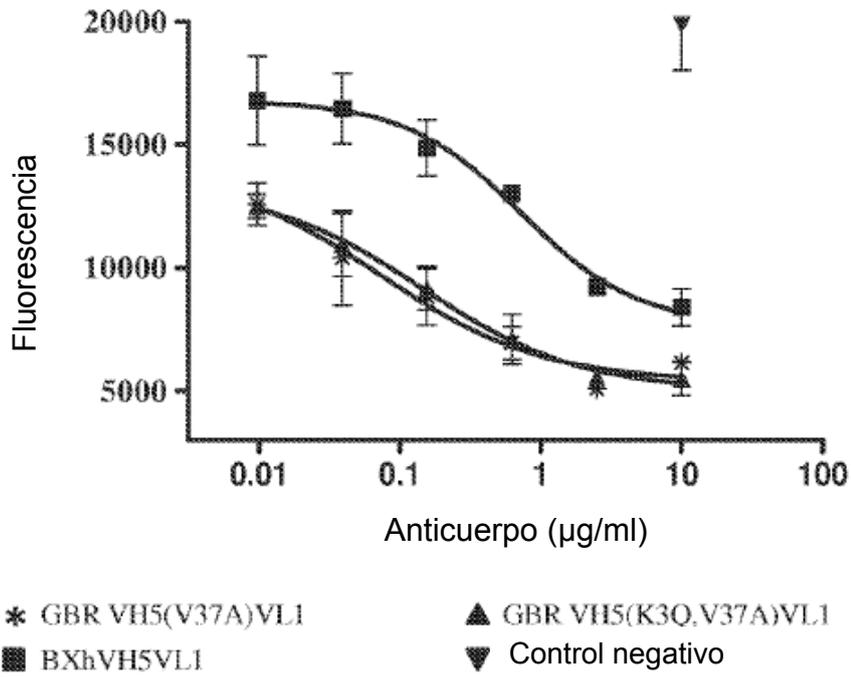
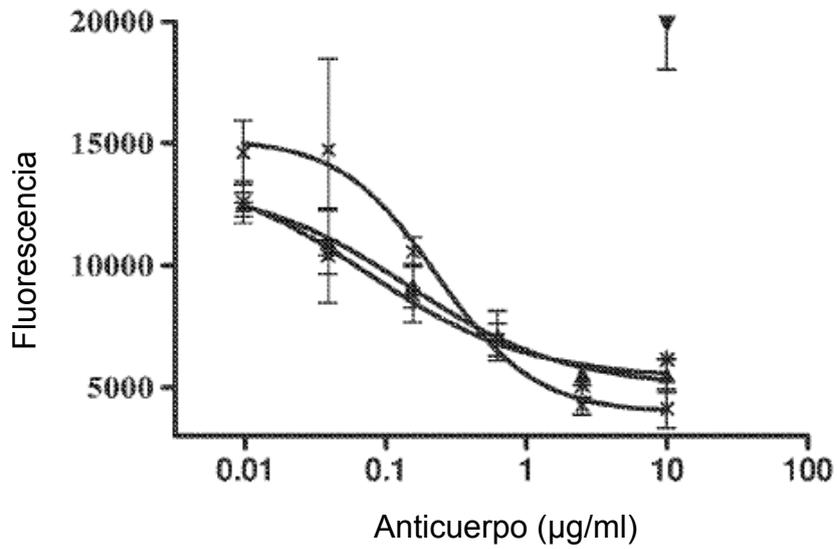
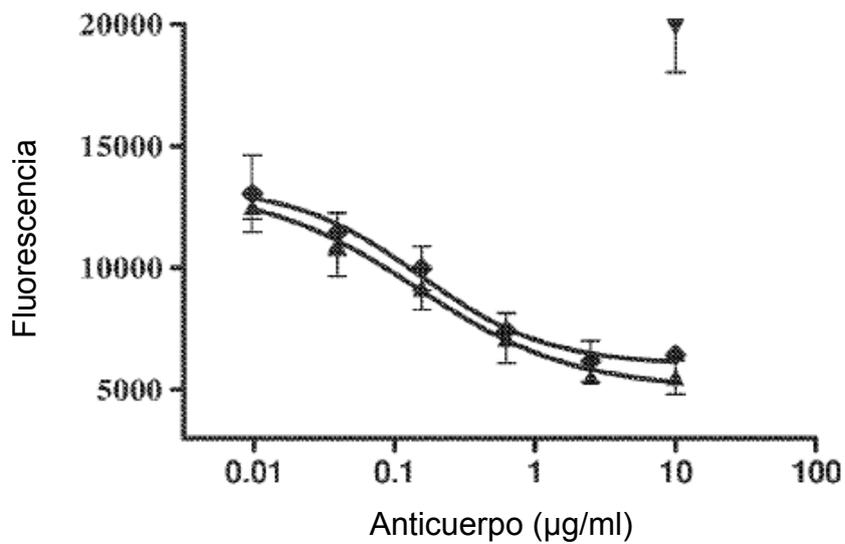


FIG. 3B



* GBR VH5(V37A)VL1 ▲ GBR VH5(K3Q,V37A)VL1
 X MNAC13 ▼ Control negativo

FIG. 3C



▲ GBR VH5(K3Q,V37A)VL1
 ◆ GBR VH5(K3Q,V37A)VL1 IGHG4 S228P
 ▼ Control negativo

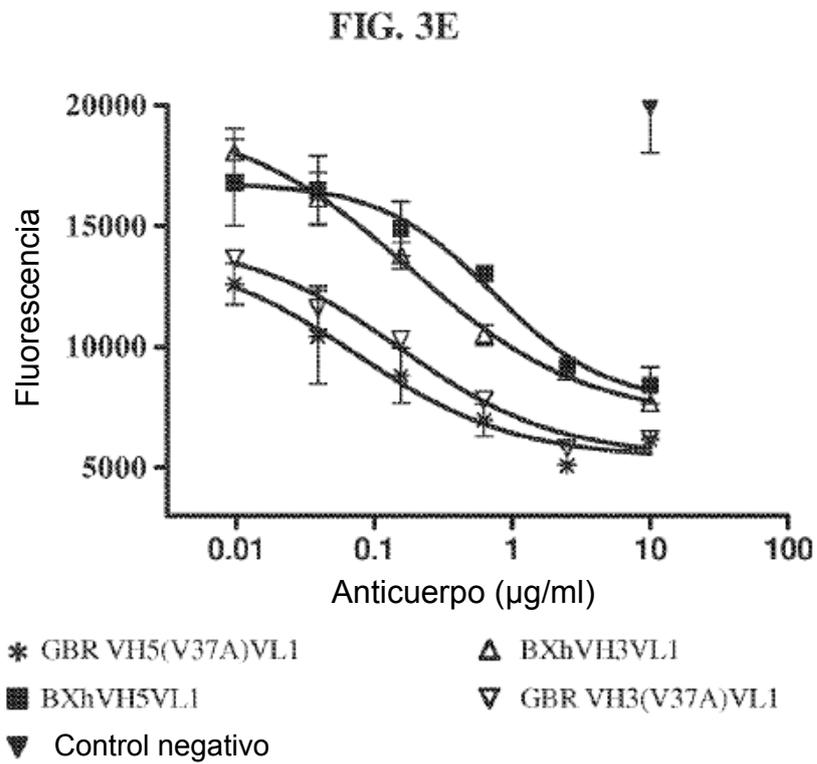
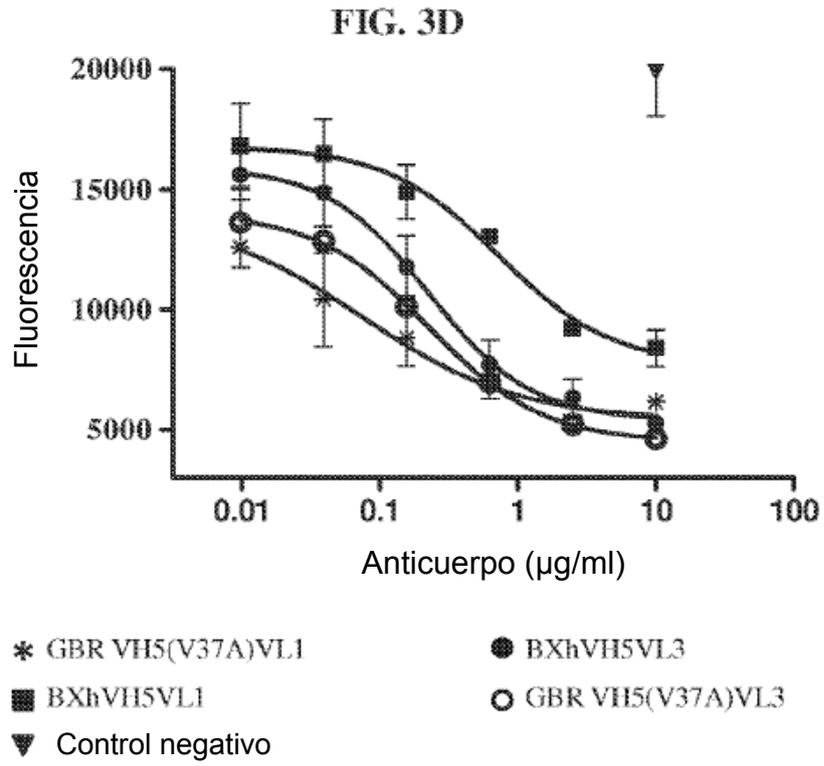


FIG. 4

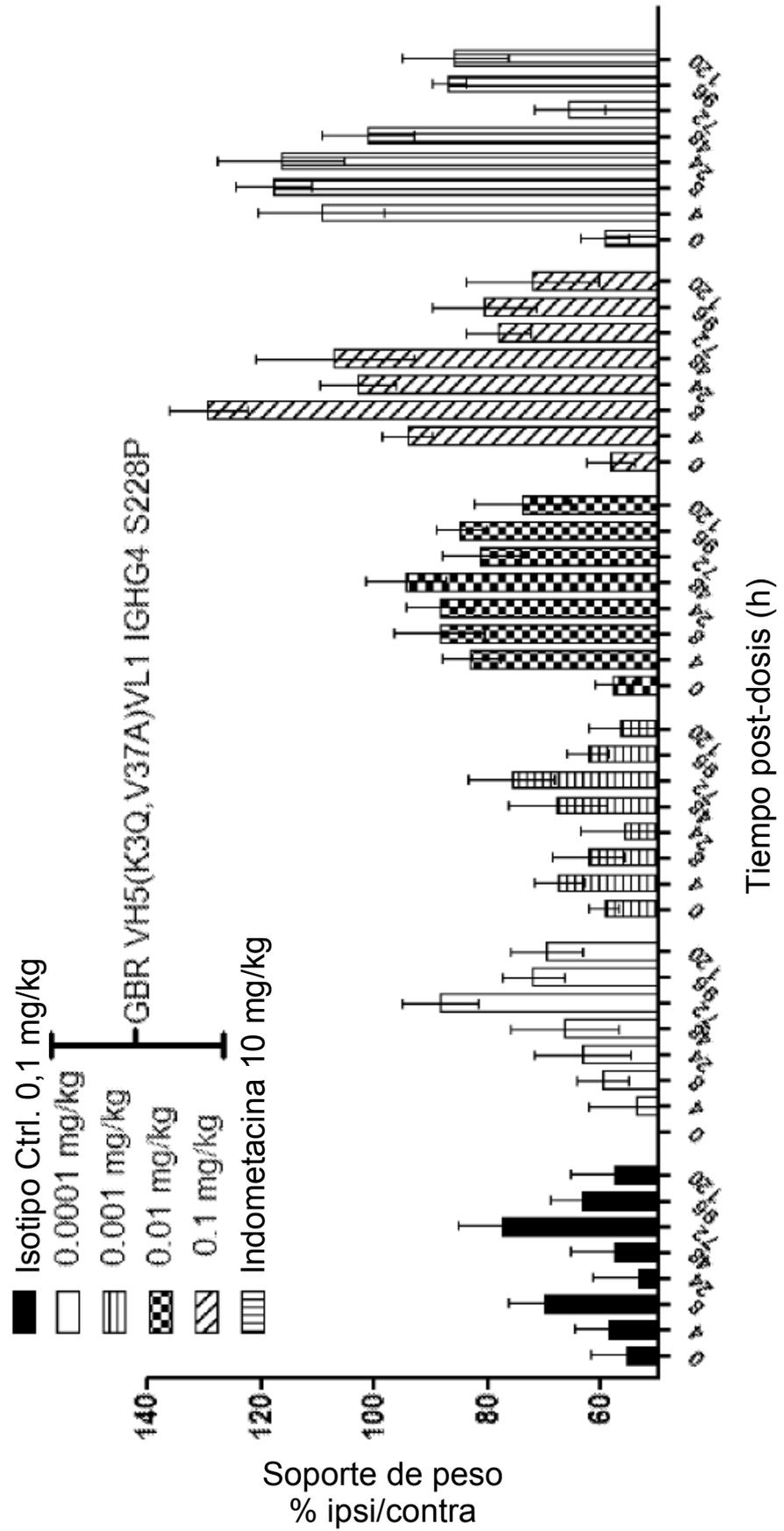


FIG. 5

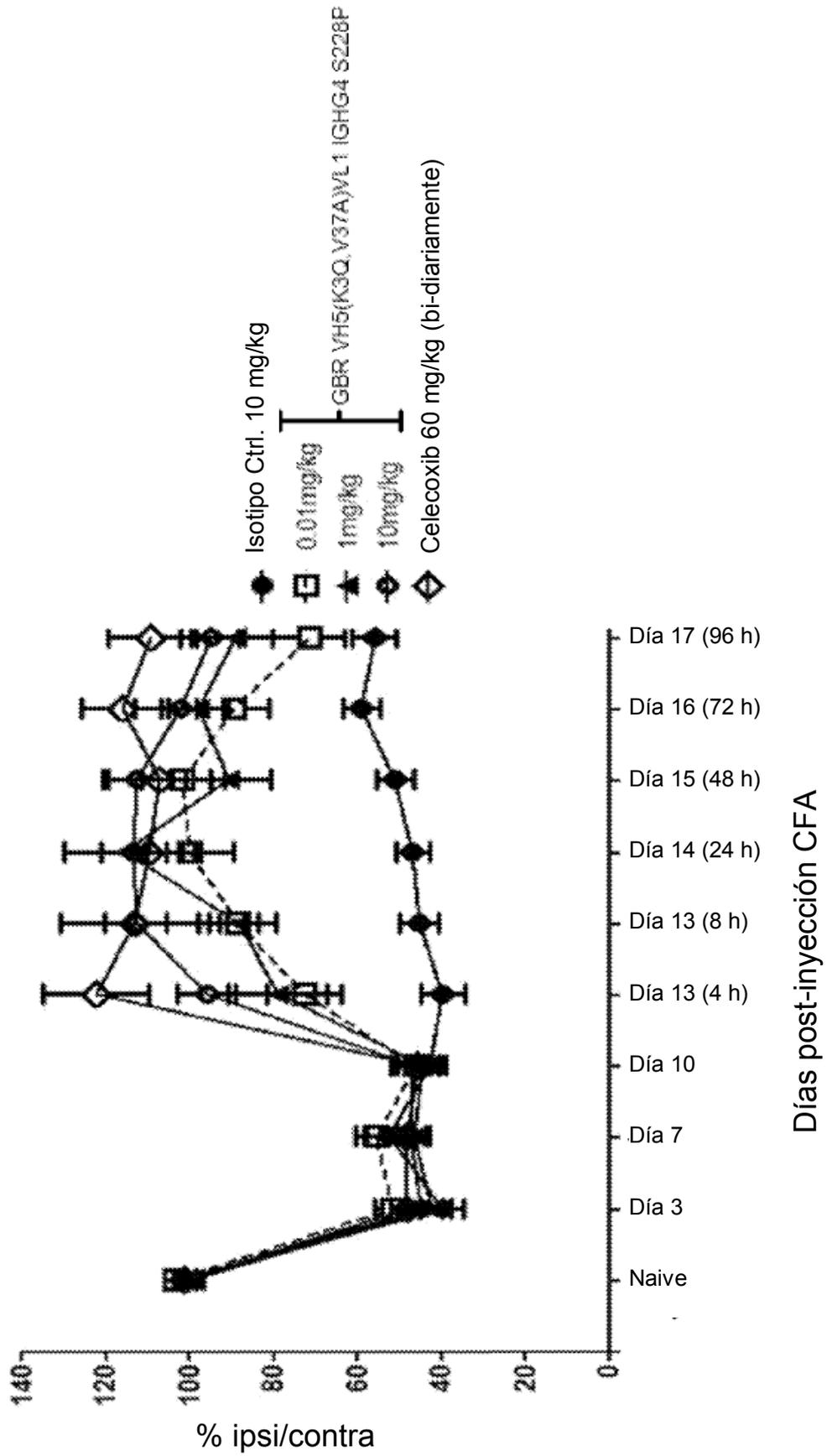


FIG. 6A

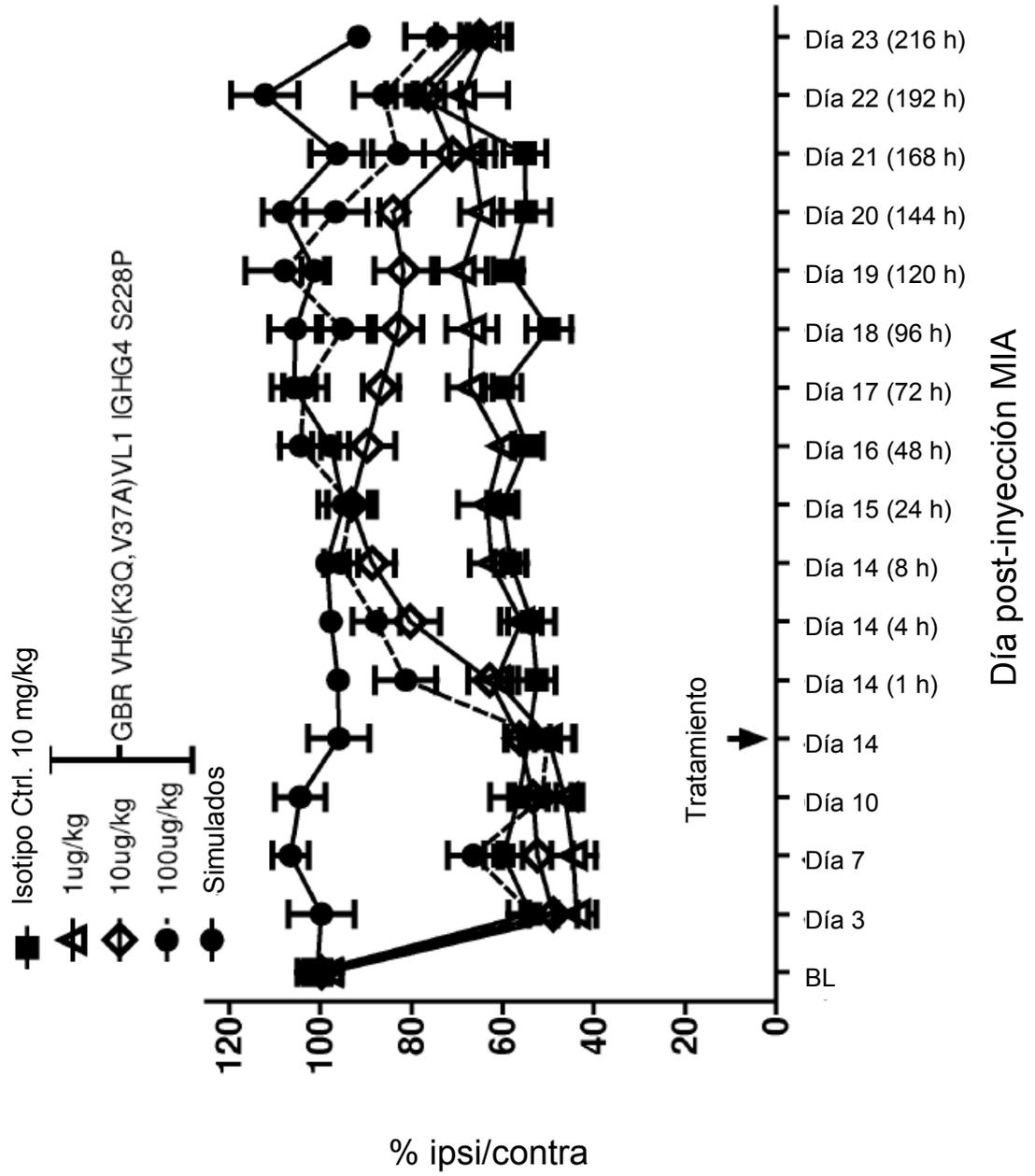


FIG. 6B

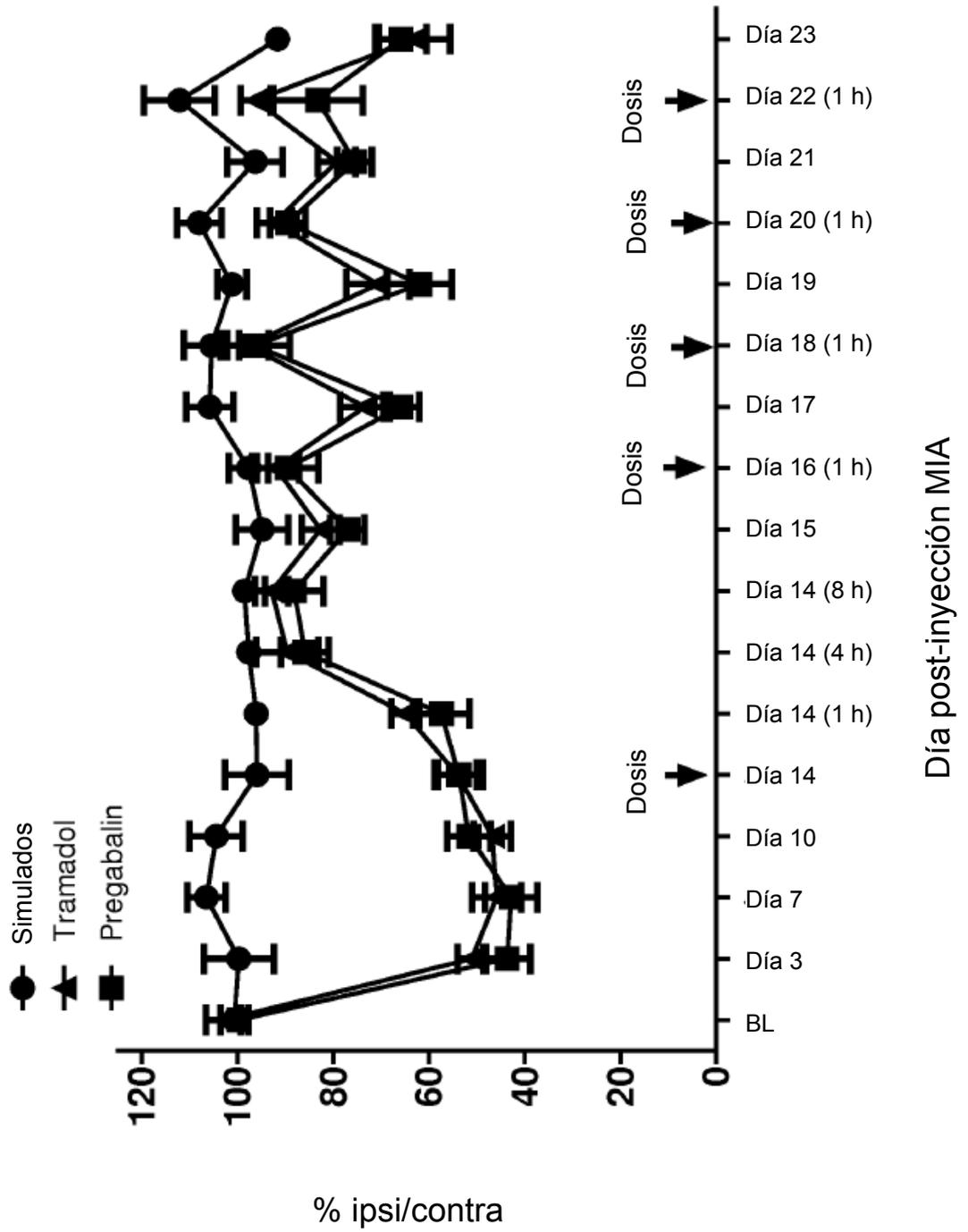


FIG. 7A

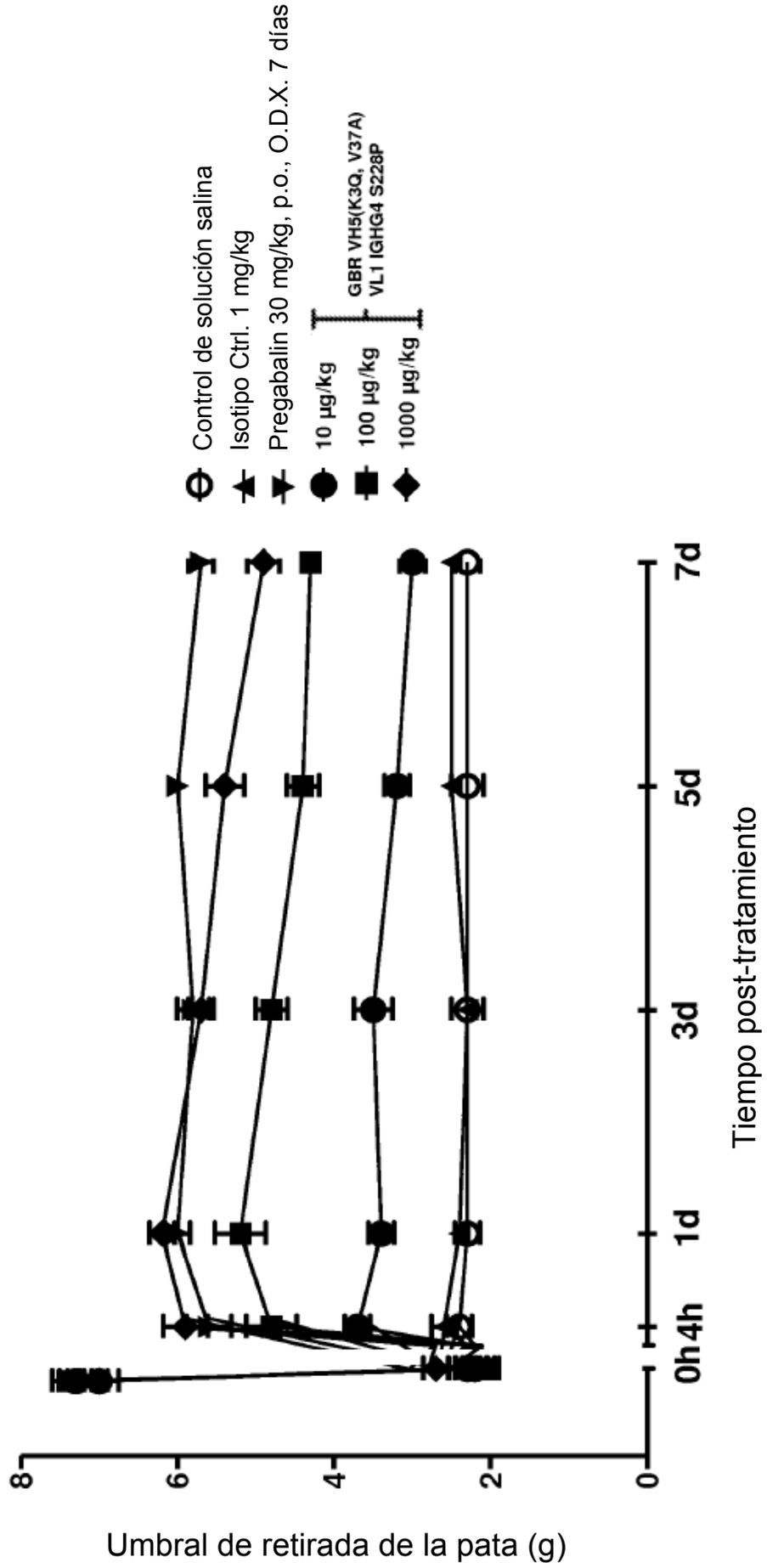


FIG. 7B

