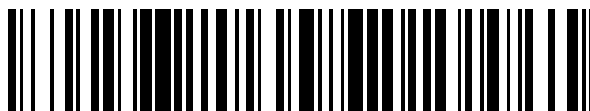


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 673 869**

51 Int. Cl.:

C07K 16/26 (2006.01)

C07K 7/18 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.03.2013 PCT/US2013/031836**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.10.2013 WO13148296**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2013 E 13715049 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.03.2018 EP 2831113**

54 Título: **Anticuerpos frente a ligandos del receptor B1 de bradiginina**

30 Prioridad:

28.03.2012 US 201261616845 P
04.02.2013 FR 1350953

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.06.2018

73 Titular/es:

SANOFI (100.0%)
54, rue La Boétie
75008 Paris, FR

72 Inventor/es:

KOMINOS, DOROTHEA;
ZHANG, JIE;
PRITSKER, ALLA;
DAVISON, MATTHEW;
BAURIN, NICOLAS;
SUBRAMANIAN, GOVINDAN;
CHEN, XIN y
LI, HAN

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 673 869 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 frente a ligandos del receptor B1 de bradicinina.

Antecedentes

5 El receptor B1 de bradicinina se ha implicado en la patogénesis de la enfermedad inflamatoria y del dolor crónico. Al modular la inflamación tisular y la fibrosis renal, el receptor B1 se ha asociado también con la patogénesis de la lesión renal aguda, así como con las enfermedades renales crónicas que son las principales causas de insuficiencia renal terminal.

10 En humanos, los principales agonistas del receptor B1 de bradicinina son las cininas. Las cininas son péptidos bioactivos producidos a partir de la escisión proteolítica de proteínas cininógenas. Los principales agonistas de cinina del receptor B1 de bradicinina son el decapeptido Calidina y el nonapéptido des-Arg₁₀-Calidina (formado por la escisión proteolítica de la arginina C-terminal de Calidina). Por lo tanto, los agentes que pueden inhibir la unión de Calidina y des-Arg₁₀-Calidina con el receptor B1 de bradicinina tienen el potencial de tratar o prevenir las patologías mediadas por el receptor B1 de bradicinina.

15 Según esto, existe en la técnica una necesidad de agentes novedosos que inhiban la unión de Calidina y des-Arg₁₀-Calidina con el receptor B1 de bradicinina para uso en el tratamiento de patologías humanas mediadas por el receptor B1 de bradicinina.

Bedi y col. (Biochimica et Biophysica Acta, volumen 842, n.º 1, 1985, páginas 90-99) divulga anticuerpos monoclonales que se unen a bradicinina.

20 Hilgenfeldt y col. (Analytical Biochemistry, vol. 228, n.º 1, 1995, páginas 35-41) describe un antisuero específico para calidina.

Carretero y col. (Biochemical Pharmacology, vol. 25, n.º 20, 1976, páginas 2265-2270) describe antisueros anti-calidina.

Geppetti y col. (Regulatory Peptides, vol 33, n.º 3, 1991, páginas 321-329) describe el efecto analgésico de calidina sobre la mucosa nasal humana.

25 Sumario

La invención se refiere a un anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a Calidina o des-Arg₁₀-Calidina pero no a Bradicinina o des-Arg₉-Bradicinina, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende:

30 i) un dominio variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la región 3 determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR3), una secuencia de aminoácidos de la región 2 determinante de la complementariedad de variable pesada (HCDR2) y una secuencia de aminoácido de la región 1 determinante de la complementariedad variable de la cadena pesada (HCDR1) seleccionada del grupo que consiste en:

a) SEQ ID NO: 7 [X₁YX₂X₃DX₄HAMX₅Y], en donde

35 X₁ es Y, F o H,

X₂ es R, D, A, V, L, I, M, F, Y o W,

X₃ es Y, F, W o H,

X₄ es D, E o Y, y

X₅ es D o E;

40 SEQ ID NO: 8 [YFX₁PX₂NGNTGYNQKFRG], en donde

X₁ es D, R, A, V, L, I, M, F, Y o W, y

X₂ es Y, D, E, N o Q; y

SEQ ID NO: 9 [GYSFTDYX₁IY], en donde X₁ es N, W o Y;

respectivamente,

45 b) SEQ ID NO: 63 [X₁EYDGX₂YX₃X₄LDX₅], en donde

X₁ es W o F,

X₂ es N o ningún aminoácido;

X₃ es Y o S,

X₄ es D o P, y

5

X₅ es F o Y;

SEQ ID NO: 64 [WX₁DPENGDX₂X₃YAPKFQG], en donde

X₁ es I, o V,

X₂ es T, o S, y

X₃ es G, o D; y

10

SEQ ID NO: 65 [GFNIKDYX₁H], en donde X₁ es L, o M;

respectivamente,

c) SEQ ID NO: 13;

SEQ ID NO: 14; y

SEQ ID NO: 15;

15

respectivamente,

d) SEQ ID NO: 32;

SEQ ID NO: 33; y

SEQ ID NO: 34;

respectivamente,

20

e) SEQ ID NO: 40;

SEQ ID NO: 41; y

SEQ ID NO: 42;

respectivamente,

f) SEQ ID NO: 47;

25

SEQ ID NO: 48;

SEQ ID NO: 49;

respectivamente,

y

g) SEQ ID NO: 55;

30

SEQ ID NO: 56;

SEQ ID NO: 57;

respectivamente; y

35

ii) un dominio variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la región 3 determinante de la complementariedad de la cadena ligera (LCDR3), una secuencia de aminoácidos de la región 2 determinante de la complementariedad de la cadena ligera (LCDR2) y una secuencia de aminoácidos de la región 1 determinante de la complementariedad de la cadena ligera (LCDR1) seleccionadas del grupo que consiste en:

h) SEQ ID NO: 10 [QQ X₁ X₂S X₃P X₄T], en donde

X₁ es Y, F o H,

ES 2 673 869 T3

X_2 es Y, F, H o W,

X_3 es Y, F, T o H, y,

X_4 es W, Y, F, H o L:

SEQ ID NO: 11 [WASTRX₁], en donde X_1 es E, D, Q o N; y

5

SEQ ID NO: 12 [KSSQSLL X_1 SSNQKN X_2 LA], en donde

X_1 es W, H, Y o F, y

X_2 es H o Y;

respectivamente,

i) SEQ ID NO: 66 [QX₁X₂X₃SX₄PX₅T], en donde

10

X_1 es Q o N,

X_2 es Y, F, D o H,

X_3 es Y, F, H o W,

X_4 es Y, F, T o H, y

X_5 es W, Y, F, H o L;

15

SEQ ID NO: 67 [X₂ASTRX₂], en donde

X_1 es W o G, y

X_2 es E, D, Q o N; y

SEQ ID NO: 68 [KSSQSLLX₁X₂SX₃QX₄NX₅LA], en donde

20

X_1 es W, H, Y o F,

X_2 es S o G,

X_3 es N o D,

X_4 es K o R,

X_5 es H o Y;

respectivamente,

25

j) SEQ ID NO: 69 [X₁QGTHFPYT], en donde X_1 es L o M;

SEQ ID NO: 36; y

SEQ ID NO: 70 [KSSQSLLYSNGX₁TYLN], en donde X_1 es K o E;

respectivamente,

k) SEQ ID NO: 16;

30

SEQ ID NO: 17; y

SEQ ID NO: 18;

respectivamente,

l) SEQ ID NO: 35;

SEQ ID NO: 36; y

35

SEQ ID NO: 37;

respectivamente,

m) SEQ ID NO: 43;

- SEQ ID NO: 17; y
SEQ ID NO: 44;
respectivamente,
n) SEQ ID NO: 50;
5 SEQ ID NO: 51; y
SEQ ID NO: 52;
respectivamente,
y
o) SEQ ID NO: 58;
10 SEQ ID NO: 59; y
SEQ ID NO: 60;
respectivamente.

En una realización de la invención, el anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1 comprende

- 15 a) un dominio variable de la cadena pesada que comprende las secuencias amínicas de las regiones HCDR3, HCDR2 y HCDR1 expuestas en las SEQ ID NO: 13, 14 y 15, respectivamente, y una o más sustituciones de aminoácidos en posiciones seleccionadas del grupo que consiste en H1, H5, H9, H11, H12, H16, H38, H40, H41, H43, H44, H66, H75, H79, H81, H82A, H83, H87 y H108, según Kabat; y
20 b) un dominio variable de la cadena ligera que comprende las secuencias amínicas de las regiones LCDR3, LCDR2 y LCDR1 expuestas en las SEQ ID NO: 16, 17 y 18, respectivamente, y una o más sustituciones de aminoácidos en posiciones seleccionadas del grupo que consiste en L5, L9, L15, L18, L19, L21, L22, L43, L63, L78, L79, L83, L85, L100 y L104, según Kabat.

En una realización de la invención, el anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1 comprende las secuencias de aminoácidos de dominio variable de la cadena pesada y cadena ligera expuestas en las SEQ ID NO: 24 y 30, respectivamente.
25

En una realización de la invención, el anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo está en una composición farmacéutica con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables.

En una realización de la invención, el anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1 comprende:

- 30 una secuencia de aminoácidos del dominio de la región variable de la cadena pesada, y una secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena ligera con al menos un 90% de identidad con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:
a) SEQ ID NO: 19 y 26, respectivamente,
b) SEQ ID NO: 20 y 27, respectivamente,
35 c) SEQ ID NO: 21 y 28, respectivamente,
d) SEQ ID NO: 22 y 28, respectivamente,
e) SEQ ID NO: 23 y 29, respectivamente,
f) SEQ ID NO: 24 y 30, respectivamente,
g) SEQ ID NO: 25 y 31, respectivamente,
40 h) SEQ ID NO: 38 y 39, respectivamente,
i) SEQ ID NO: 45 y 46, respectivamente,
j) SEQ ID NO: 53 y 54, respectivamente,

k) SEQ ID NO: 61 y 62, respectivamente.

En una realización, el anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1 comprende:

5 un dominio variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos, y una secuencia de aminoácidos de un dominio variable de la cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en:

a) SEQ ID NO: 19 y 26, respectivamente,

b) SEQ ID NO: 20 y 27, respectivamente,

c) SEQ ID NO: 21 y 28, respectivamente,

d) SEQ ID NO: 22 y 28, respectivamente,

10 e) SEQ ID NO: 23 y 29, respectivamente,

f) SEQ ID NO: 24 y 30, respectivamente,

g) SEQ ID NO: 25 y 31, respectivamente,

h) SEQ ID NO: 38 y 39, respectivamente,

i) SEQ ID NO: 45 y 46, respectivamente,

15 j) SEQ ID NO: 53 y 54, respectivamente,

k) SEQ ID NO: 61 y 62, respectivamente.

En una realización de la invención, el anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende:

20 a) un dominio variable de la cadena pesada que comprende las secuencias amino de consenso de las regiones HCDR3, HCDR2 y HCDR1 expuestas en las SEQ ID NO: 7, 8 y 9, respectivamente; y

b) un dominio variable de la cadena ligera que comprende las secuencias amino de las regiones LCDR3, LCDR2 y LCDR1 expuestas en las SEQ ID NO: 10, 11 y 12, respectivamente.

En una realización, el anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende:

25 a) un dominio variable de la cadena pesada que comprende las secuencias amino de las regiones HCDR3, HCDR2 y HCDR1 expuestas en las SEQ ID NO: 13, 14 y 15, respectivamente; y

b) un dominio variable de la cadena ligera que comprende las secuencias amino de las regiones LCDR3, LCDR2 y LCDR1 expuestas en las SEQ ID NO: 16, 17 y 18, respectivamente.

En una realización de la invención, el anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende:

30 a) un dominio variable de la cadena pesada que comprende las secuencias amino de las regiones HCDR3, HCDR2 y HCDR1 expuestas en las SEQ ID NO: 32, 33 y 34, respectivamente; y

b) un dominio variable de la cadena ligera que comprende las secuencias amino de las regiones LCDR3, LCDR2 y LCDR1 expuestas en las SEQ ID NO: 35, 36 y 37, respectivamente.

35 En una realización de la invención, el anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a Calidina o des-Arg₁₀-Calidina pero no a Bradicinina o des-Arg₉-Bradicinina de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende:

a) un dominio variable de la cadena pesada que comprende las secuencias amino de las regiones HCDR3, HCDR2 y HCDR1 expuestas en las SEQ ID NO: 40, 41 y 42, respectivamente; y

40 b) un dominio variable de la cadena ligera que comprende las secuencias amino de las regiones LCDR3, LCDR2 y LCDR1 expuestas en las SEQ ID NO: 43, 17 y 44, respectivamente.

En una realización de la invención, el anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende:

a) un dominio variable de la cadena pesada que comprende las secuencias amino de las regiones HCDR3, HCDR2 y HCDR1 expuestas en las SEQ ID NO: 47, 48 y 49, respectivamente; y

b) un dominio variable de la cadena ligera que comprende las secuencias amino de las regiones LCDR3, LCDR2 y LCDR1 expuestas en las SEQ ID NO: 50, 51 y 52, respectivamente.

En una realización de la invención, el anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende:

5 a) un dominio variable de la cadena pesada que comprende las secuencias amino de las regiones HCDR3, HCDR2 y HCDR1 expuestas en las SEQ ID NO: 55, 56 y 57, respectivamente; y

b) un dominio variable de la cadena ligera que comprende las secuencias amino de las regiones LCDR3, LCDR2 y LCDR1 expuestas en las SEQ ID NO: 58, 59 y 60, respectivamente.

10 La presente aplicación divulga además ácidos nucleicos que codifican anticuerpos anti-Calidina y des-Arg₁₀-Calidina, vectores de expresión recombinantes y células anfitrionas para producir tales anticuerpos, o fragmentos de los mismos. También se describen procedimientos para usar anticuerpos de la divulgación, o fragmentos de los mismos, para detectar Calidina y des-Arg₁₀-Calidina o para modular la actividad de Calidina y des-Arg₁₀-Calidina, *in vitro* o *in vivo*. La presente aplicación también describe procedimientos para fabricar anticuerpos que se unen específicamente a péptidos des-Arg₉-Bradicinina y des-Arg₁₀-Calidina.

15 En consecuencia, en un aspecto, la presente divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o un fragmento de unión a antígeno del mismo que:

a) se une específicamente a Calidina o des-Arg₁₀-Calidina pero no a Bradicinina o des-Arg₉-Bradicinina;

b) se une específicamente a Calidina o des-Arg₁₀-Calidina con una KD de menos de 1×10^{-10} M;

c) se une específicamente a Calidina o des-Arg₁₀-Calidina con un K_{dis} de menos de 1×10^4 s⁻¹; o

20 d) se une específicamente a Calidina o des-Arg₁₀-Calidina e inhibe la unión al receptor B1 de bradicinina.

En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une al resto N-terminal de Lisina de Calidina o des-Arg₁₀-Calidina.

En otra realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo inhibe la unión de Calidina o des-Arg₁₀-Calidina a un receptor 1 de bradicinina.

25 En otra realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une específicamente al péptido similar a Calidina de ratón (KLP).

En otra realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende un dominio variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de HCDR3 seleccionada del grupo que consiste en:

a) SEQ ID NO: 7 [X₁Y X₂ X₃D X₄HAM X₅Y], en donde

30 X₁ es Y, F o H,

X₂ es R, D, A, V, L, I, M, F, Y o W,

X₃ es Y, F, W o H,

X₄ es D, E o Y, y

X₅ es D o E;

35 b) SEQ ID NO: 63 [X₁EYDGX₂YX₃X₄LDX₅], en donde

X₁ es W o F,

X₂ es N o ningún aminoácido;

X₃ es Y o S,

X₄ es D o P, y

40 X₅ es F o Y;

c) SEQ ID NO: 13;

d) SEQ ID NO: 32;

e) SEQ ID NO: 40;

f) SEQ ID NO: 47; y

g) SEQ ID NO: 55.

En otra realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una secuencia de aminoácidos de HCDR2 seleccionada del grupo que consiste en:

5 a) SEQ ID NO: 8 [YFX₁PX₂NGNTGYNQKFRG], en donde

X₁ es D, R, A, V, L, I, M, F, Y o W, y

X₂ es Y, D, E, N o Q;

b) SEQ ID NO: 64 [WX₁DPENGDX₂X₃YAPKFQG], en donde

X₁ es I, o V,

10 X₂ es T, o S, y

X₃ es G, o D;

c) SEQ ID NO: 14

d) SEQ ID NO: 33;

e) SEQ ID NO: 41;

15 f) SEQ ID NO: 48; y

g) SEQ ID NO: 56.

En otra realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una secuencia de aminoácidos de HCDR1 seleccionada del grupo que consiste en:

a) SEQ ID NO: 9 [GYSFTDYX₁IY], en donde X₁ es N, W o Y;

20 b) SEQ ID NO: 65 [GFNIKDYX₁H], en donde X₁ es L, o M;

c) SEQ ID NO: 15;

d) SEQ ID NO: 34;

e) SEQ ID NO: 42;

f) SEQ ID NO: 49; y

25 g) SEQ ID NO: 57.

En otra realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende un dominio variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de LCDR3 seleccionada del grupo que consiste en:

a) SEQ ID NO: 10 [QQX₁X₂SX₃PX₄T], en donde

X₁ es Y, F o H,

30 X₂ es Y, F, H o W,

X₃ es Y, F, T o H, y,

X₄ es W, Y, F, H o L:

b) SEQ ID NO: 66 [QX₁X₂X₃SX₄PX₅T], en donde

X₁ es Q o N,

35 X₂ es Y, F, D o H,

X₃ es Y, F, H o W,

X₄ es Y, F, T o H, y

X₅ es W, Y, F, H o L;

- c) SEQ ID NO: 69 [X₁QGTHFPYT], en donde X₁ es L o M;
- d) SEQ ID NO: 16;
- e) SEQ ID NO: 35;
- f) SEQ ID NO: 43;
- 5 g) SEQ ID NO: 50; y
- h) SEQ ID NO: 58.

En otra realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una secuencia de aminoácidos de LCDR2 seleccionada del grupo que consiste en:

- a) SEQ ID NO: 11 [WASTRX₁], en donde X₁ es E, D, Q o N;
- 10 b) SEQ ID NO: 67 [X₂ASTRX₂], en donde
X₁ es W o G, y
X₂ es E, D, Q o N;
- c) SEQ ID NO: 17;
- d) SEQ ID NO: 36;
- 15 e) SEQ ID NO: 51; y
- f) SEQ ID NO: 59.

En otra realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una secuencia de aminoácidos de LCDR1 seleccionada del grupo que consiste en:

- a) SEQ ID NO: 12 [KSSQSLL X₁SSNQKN X₂LA], en donde
20 X₁ es W, H, Y o F, y
X₂ es H o Y;
- b) SEQ ID NO: 68 [KSSQSLLX₁X₂SX₃QX₄NX₅LA], en donde
X₁ es W, H, Y o F,
X₂ es S o G,
25 X₃ es N o D,
X₄ es K o R,
X₅ es H o Y.
- c) SEQ ID NO: 70 [KSSQSLLYSNGX₁TYLN], en donde X₁ es K o E;
- b) SEQ ID NO: 18;
- 30 c) SEQ ID NO: 37;
- d) SEQ ID NO: 44;
- e) SEQ ID NO: 52; y
- f) SEQ ID NO: 60.

35 En otra realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende un dominio variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de LCDR3 seleccionada del grupo que consiste en:

- a) SEQ ID NO: 10 [QQ X₁ X₂S X₃P X₄T], en donde
X₁ es Y, F o H,
X₂ es Y, F, H o W,

- X₃ es Y, F, T o H, y,
X₄ es W, Y, F, H o L:
- b) SEQ ID NO: 66 [QX₁X₂X₃SX₄PX₅T], en donde
X₁ es Q o N,
- 5 X₂ es Y, F, D o H,
X₃ es Y, F, H o W,
X₄ es Y, F, T o H, y
X₅ es W, Y, F, H o L;
- c) SEQ ID NO: 69 [X₁QGTHFPYT], en donde X₁ es L o M;
- 10 d) SEQ ID NO: 16;
e) SEQ ID NO: 35;
f) SEQ ID NO: 43;
g) SEQ ID NO: 50; y
h) SEQ ID NO: 58.
- 15 En otra realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una secuencia de aminoácidos de LCDR2 seleccionada del grupo que consiste en:
- a) SEQ ID NO: 11 [WASTRX₁], en donde X₁ es E, D, Q o N;
b) SEQ ID NO: 67 [X₂ASTRX₂], en donde
X₁ es W o G, y
- 20 X₂ es E, D, Q o N;
c) SEQ ID NO: 17;
d) SEQ ID NO: 36;
e) SEQ ID NO: 51; y
f) SEQ ID NO: 59.
- 25 En otra realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una secuencia de aminoácidos de LCDR1 seleccionada del grupo que consiste en:
- a) SEQ ID NO: 12 [KSSQSLL X₁SSNQKN X₂LA], en donde
X₁ es W, H, Y o F, y
X₂ es H o Y;
- 30 b) SEQ ID NO: 68 [KSSQSLLX₁X₂SX₃QX₄NX₅LA], en donde
X₁ es W, H, Y o F,
X₂ es S o G,
X₃ es N o D,
X₄ es K o R,
- 35 X₅ es H o Y.
c) SEQ ID NO: 70 [KSSQSLLYSNGX₁TYLN], en donde X₁ es K o E;
b) SEQ ID NO: 18;

- c) SEQ ID NO: 37;
- d) SEQ ID NO: 44;
- e) SEQ ID NO: 52; y
- f) SEQ ID NO: 60.

- 5 En otra realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las secuencias amino de las regiones HCDR3, HCDR2 y HCDR1 expuestas en las SEQ ID NO: 13, 14 y 15, respectivamente, y una o más sustituciones de aminoácidos en posiciones seleccionadas del grupo que consiste en H1, H5, H9, H11, H12, H16, H38, H40, H41, H43, H44, H66, H75, H79, H81, H82A, H83, H87 y H108 según Kabat.
- 10 En otra realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una región variable de la cadena ligera que comprende las secuencias amino de las regiones LCDR3, LCDR2 y LCDR1 expuestas en las SEQ ID NO: 16, 17 y 18, respectivamente, y una o más sustituciones de aminoácidos en posiciones seleccionadas del grupo que consiste en L5, L9, L15, L18, L19, L21, L22, L43, L63, L78, L79, L83, L85, L100 y L104, según Kabat.
- 15 En otra realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada con al menos un 90% de identidad con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 19, 20, 21, 22, 24, 25, 38, 45, 53 y 61.
- En otra realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una secuencia de aminoácidos de un dominio variable de la cadena ligera con al menos un 90% de identidad con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 26, 27, 28, 29, 29, 30, 31, 39, 46, 54 y 62.
- 20 En otra realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera con al menos un 90% de identidad con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 26, 27, 28, 29, 29, 30, 31, 39, 46, 54 y 62.
- En otra realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende un dominio variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO:
- 25 19, 20, 21, 22, 24, 25, 38, 45, 53 y 61.
- En otra realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una secuencia de aminoácidos de un dominio variable de la cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 26, 27, 28, 29, 29, 30, 31, 39, 46, 54 y 62.
- 30 En otra realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 26, 27, 28, 29, 29, 30, 31, 39, 46, 54, y 62.
- En otra realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y de la cadena ligera expuestas en las SEQ ID NO: 19 y 26, SEQ ID NO: 20 y 27, SEQ ID NO: 21 y 28; SEQ ID NO: 22 y 28; SEQ ID NO: 23 y 29; SEQ ID NO: 24 y 30; SEQ ID NO: 25 y 31; SEQ ID NO: 38 y 39, SEQ ID NO: 45 y 46, SEQ ID NO: 53 y 54, o SEQ ID NO: 61 y 62,
- 35 respectivamente.
- En otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a Calidina y des-Arg₁₀-Calidina, en donde el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, compete por la unión a Calidina y des-Arg₁₀-Calidina con un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y cadena ligera expuestas en las SEQ ID NO: 19 y 26, SEQ ID NO: 38 y 39, SEQ ID NO: 45 y 46, SEQ ID NO: 53 y 54, o SEQ ID NO: 61 y 62, respectivamente.
- 40 En otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que compete por la unión a Calidina o des-Arg₁₀-Calidina con el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, y no se une a Bradicinina o des-Arg₉-Bradicinina.
- En otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a un epítipo conformacional de calidina (KD) o desArg₁₀-Calidina (DAKD) que adopta una conformación de trenzado de Pro4 que comprende un giro cerrado de tipo II en Prolina 4 de KD o DAKD). En una realización, la conformación de trenzado de Pro 4 de KD o DAKD comprende además repeticiones de aminoácidos de forma sigmoidea que alinean las cadenas laterales hidrófobas de los aminoácidos en un modo de apilamiento espacial. En otra realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende que
- 45 (a) se une específicamente a Calidina o des-Arg₁₀-Calidina pero no a Bradicinina o des-Arg₉-Bradicinina; b) se une específicamente a Calidina o des-Arg₁₀-Calidina con una KD de menos de 1×10^{-10} M; c) se une específicamente a Calidina o des-Arg₁₀-Calidina con un K_{dis} de menos de 1×10^4 s⁻¹; o d) se une específicamente a Calidina o des-Arg₁₀-Calidina e inhibe la unión al receptor B1 de bradicinina.
- 50

En otro aspecto, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se conjuga con un agente de diagnóstico o terapéutico.

En otro aspecto, la divulgación proporciona ácido nucleico aislado que codifica la secuencia de aminoácidos del anticuerpo de la divulgación, o fragmento de unión a antígeno del mismo.

- 5 En otro aspecto, la divulgación proporciona un vector de expresión recombinante que comprende el ácido nucleico de la divulgación.

En otro aspecto, la divulgación proporciona una célula anfitriona que comprende el vector de expresión recombinante de la divulgación.

- 10 En otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para producir un anticuerpo que se une específicamente a Calidina y des-Arg₁₀-Calidina, que comprende cultivar la célula anfitriona de la divulgación en condiciones tales que un anticuerpo que se une específicamente a Calidina y des-Arg₁₀-Calidina es producido por la célula anfitriona.

En otro aspecto, la divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de la divulgación, o fragmento de unión a antígeno del mismo y uno o más portadores farmacéuticamente aceptables.

- 15 En otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para tratar una enfermedad o trastorno asociado a Calidina o a des-Arg₁₀-Calidina, el procedimiento que comprende administrar a un sujeto que lo necesite la composición farmacéutica de la divulgación.

En una realización, la enfermedad o trastorno es dolor crónico.

- 20 En otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para generar un anticuerpo que se une específicamente a des-Arg₉-Bradicinina y a un péptido similar a des-Arg₁₀-Calidina que comprende: inmunizar un animal con un inmunógeno que comprende un péptido, en donde el péptido consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 11, y en donde la arginina amino terminal del péptido está acoplada indirectamente a una mitad portadora a través de una mitad enlazadora, de modo que un anticuerpo que se une específicamente a des-Arg₉-Bradicinina, des-Arg₁₀-Calidina y a un péptido similar a des-Arg₁₀-Calidina es producido por el sistema inmune del animal.

- 25 En otra realización, el procedimiento comprende además aislar del animal, el anticuerpo, un aislamiento nucleico que codifica el anticuerpo, o una célula inmune que expresa el anticuerpo.

- 30 En una realización, la mitad portadora es una proteína. En otra realización, la proteína es hemocianina de lapa californiana (KLH). En otra realización, en donde la mitad enlazadora comprende [Gly-Gly-Gly]_n, en donde n es al menos 1.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 representa los resultados de los ensayos ELISA que demuestran la unión del anticuerpo EE1 a péptidos de cinina.

La Figura 2 representa los resultados de las medidas de calorimetría diferencial de barrido del anticuerpo F151.

- 35 La Figura 3 representa alineamientos de secuencias de aminoácidos de las regiones variables del anticuerpo F151 de murino y humanizado. Los restos idénticos se enumeran en el alineamiento, mientras que los restos homólogos se identifican mediante el signo "+" y los restos no homólogos se dejan en blanco.

La Figura 4 representa un mapa de densidad electrónica del sitio de unión al antígeno del complejo anticuerpo F151/Calidina.

- 40 La Figura 5 representa un mapa de densidad electrónica del sitio de unión al antígeno del complejo anticuerpo F151/des-Arg₁₀-Calidina.

La Figura 6 representa una representación de cintas y palitos de la subunidad Fv de F151 unida a calidina.

- 45 La Figura 7 representa un alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de la cadena ligera de los anticuerpos de murino anti-calidina ejemplares de la divulgación. Los restos de aminoácidos que interactúan con calidina están marcados con asteriscos.

La Figura 8 representa un alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de la cadena pesada de los anticuerpos de murino anti-calidina ejemplares de la divulgación. Los restos de aminoácidos que interactúan con la calidina están marcados con asteriscos.

- 50 La Figura 9 representa los resultados de los experimentos *in vivo* que determinan el efecto del anticuerpo EE1 sobre el dolor inflamatorio agudo inducido por formalina.

La Figura 10 representa los resultados de experimentos *in vivo* que determinan el efecto del anticuerpo EE1 sobre la hipersensibilidad mecánica inducida por CFA.

La Figura 11 representa los resultados de experimentos *in vivo* que determinan el efecto del anticuerpo EE1 sobre la hipersensibilidad térmica inducida por CFA.

- 5 La Figura 12 representa los resultados de experimentos *in vivo* que determinan el efecto del anticuerpo EE1 sobre la hipersensibilidad mecánica inducida por CCI.

La Figura 13 representa los resultados de experimentos *in vivo* que determinan el efecto del anticuerpo EE1 sobre la hipersensibilidad térmica inducida por CCI.

- 10 La Figura 14 representa mapas esquemáticos de construcciones de expresión de VL y VH para generar la variante de HC3a/LC3a de F151 humanizado con los sitios de restricción de ADN endonucleasa presentados como secuencias deducidas en negrita y subrayadas. El panel A representa la cadena ligera y el panel B representa la cadena pesada.

La Figura 15 representa un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada (A) y de la cadena ligera (B) del F151 con las secuencias de aminoácidos de línea germinal humana más cercana.

- 15 La Figura 16 representa un alineamiento de la cadena pesada (A) y de la cadena ligera (B) del F151 con un locus de la cadena pesada (1-08 y 1-18) y un locus de la cadena ligera (V IV-B3) de la subfamilia VH1. Las regiones CDR y las regiones Vernier están indicadas en negrita y las mutaciones de humanización están subrayadas.

- 20 La Figura 17 representa la estructura secundaria (A) y terciaria (B) de la conformación de la estructura principal del polipéptido de la cadena principal de calidina (KD) unida al anticuerpo F151 que comprende un giro cerrado de tipo II en Prolina 4 (C).

Descripción detallada

- 25 La presente divulgación proporciona anticuerpos que se unen específicamente a Calidina y des-Arg₁₀-Calidina e impiden la unión al receptor B1 de bradicinina. Tales anticuerpos son particularmente útiles para tratar la enfermedad o los trastornos asociados con Calidina y des-Arg₁₀-Calidina (p. ej., el dolor). La divulgación también proporciona composiciones farmacéuticas, así como ácidos nucleicos que codifican anticuerpos anti-Calidina y des-Arg₁₀-Calidina, vectores de expresión recombinantes y células anfitrionas para producir tales anticuerpos, o fragmentos de los mismos. Los procedimientos para usar anticuerpos de la divulgación para detectar Calidina y des-Arg₁₀-Calidina o para modular la actividad de Calidina y des-Arg₁₀-Calidina, ya sea *in vitro* o *in vivo*, también están abarcados por la divulgación.

30 I. Definiciones

Para que la presente divulgación se pueda entender más fácilmente, primero se definen ciertos términos.

Como se usa en el presente documento, el término "Calidina" se refiere a un péptido que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos KRPPGFSPFR (SEQ ID NO. 1).

- 35 Como se usa en el presente documento, el término "des-Arg₁₀-Calidina" se refiere a un péptido que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos KRPPGFSPF (SEQ ID NO. 2).

Como se usa en el presente documento, las expresiones "Calidina de ratón" o "péptido similar a Calidina" se refieren a un péptido que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos RRPPGFSPFR (SEQ ID NO. 3).

- 40 Como se usa en el presente documento, las expresiones "des-Arg₁₀-Calidina de ratón" o "péptido similar a la des-Arg₁₀-Calidina" se refieren a un péptido que comprende o que consiste en la secuencia de aminoácidos RRPPGFSPF (SEQ ID NO. 4).

Como se usa en el presente documento, el término "Brdicininina" se refiere a un péptido que comprende o que consiste en la secuencia de aminoácidos RPPGFSPFR (SEQ ID N.º 5).

Como se usa en el presente documento, el término "des-Arg₉-bradicininina" se refiere a un péptido que comprende o que consiste en la secuencia de aminoácidos RPPGFSPF (SEQ ID N.º 6).

- 45 Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a moléculas de inmunoglobulina que comprenden cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro, así como multímeros de las mismas (p. ej., IgM). Cada cadena pesada comprende una región variable de la cadena pesada (abreviada V_H o VH) y una región constante de la cadena pesada (C_H o CH). La región constante de la cadena pesada comprende tres dominios, C_{H1}, C_{H2} y C_{H3}. Cada cadena ligera comprende una
50 región variable de la cadena ligera (abreviado V_L) y una región constante de la cadena ligera (C_L o CL). La región constante de la cadena ligera comprende un dominio (C_{L1}). Las regiones V_H y V_L pueden subdividirse

adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones entramado (FR). Cada V_H y V_L 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.

5 Como se usa en el presente documento, la expresión "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo incluye cualquier polipéptido o glicoproteína de origen natural, obtenible enzimáticamente, sintético o de ingeniería genéticamente que se une específicamente a un antígeno para formar un complejo. Los fragmentos de unión a antígeno de un anticuerpo pueden derivarse, p. ej., de moléculas de anticuerpo completas usando cualquier técnica estándar adecuada tal como técnicas de digestión proteolítica o de ingeniería genética recombinante que implican la manipulación y expresión de ADN que codifica dominios de anticuerpo variables y opcionalmente constantes. Los ejemplos no limitantes de porciones de unión a antígeno incluyen: (i) fragmentos Fab; (ii) fragmentos $F(ab')_2$; (iii) fragmentos Fd; (iv) Fragmentos Fv; (v) moléculas Fv de cadena simple (scFv); (vi) fragmentos dAb; y (vii) unidades de reconocimiento mínimo que consisten en restos de aminoácidos que imitan la región hipervariable de un anticuerpo (p. ej., una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada). Otras moléculas de ingeniería, tales como diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y minicuerpos, también están abarcadas dentro de la expresión "fragmento de unión a antígeno".

20 Como se usa en el presente documento, el término "CDR" o la expresión "región determinante de la complementariedad" significa los sitios de combinación de antígeno no contiguos encontrados dentro de la región variable de ambos polipéptidos de la cadena pesada y ligera. Estas regiones particulares han sido descritas por Kabat y col., J. Biol. Chem. 252, 6609-6616 (1977) y Kabat y col., Sequences of protein of immunological interest, (1991), y por Chothia y col., J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987) y por MacCallum y col., J. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996) donde las definiciones incluyen superposición o subconjuntos de restos de aminoácidos cuando se comparan entre sí. Para su comparación se exponen restos de aminoácidos que abarcan las CDR como se define por cada una de las referencias citadas anteriormente. En una realización de la divulgación, el término "CDR" es una CDR tal como la define Kabat, basada en comparaciones de secuencias.

30 Como se usa en el presente documento, la expresión "restos de aminoácidos de entramado (FR)" se refiere a aquellos aminoácidos en la región de entramado de una cadena de Ig. Las expresiones "región de entramado" o "región FR" como se usan en el presente documento, incluyen los restos de aminoácidos que forman parte de la región variable, pero que no forman parte de las CDR (p. ej., usando la definición de Kabat de las CDR). Por lo tanto, un entramado de región variable tiene entre aproximadamente 100-120 aminoácidos de longitud, pero incluye solo aquellos aminoácidos fuera de las CDR.

35 Como se usa en el presente documento, la expresión "se une específicamente a" se refiere a la capacidad de un anticuerpo o de un fragmento de unión a antígeno del mismo para unirse a un antígeno con una K_d de al menos aproximadamente 1×10^{-6} M, 1×10^{-7} M, 1×10^{-8} M, 1×10^{-9} M, 1×10^{-10} M, 1×10^{-11} M, 1×10^{-12} M o más. La expresión abarca también la capacidad de un anticuerpo o de un fragmento de unión a antígeno del mismo para unirse a un antígeno con una afinidad que es al menos dos veces mayor que su afinidad por un antígeno no específico. Debe entenderse, sin embargo, que un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, es capaz de unirse específicamente a dos o más antígenos que están relacionados en secuencia (p. ej., Calidina o des-Arg₁₀-Calidina y Calidina o des-Arg₁₀-Calidina de ratón).

40 Como se usa en el presente documento, el término "antígeno" se refiere al sitio de unión o epítopo reconocido por un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo.

45 Como se usa en el presente documento, el término "vector" pretende referirse a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle circular de ADN bicatenario en el que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector vírico, en donde se pueden ligar segmentos de ADN adicionales en el genoma vírico. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula anfitriona en la que se introducen (p. ej., vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores episomales de mamíferos). Otros vectores (p. ej., vectores no episomales de mamíferos) se pueden integrar en el genoma de una célula anfitriona tras la introducción en la célula anfitriona, y de ese modo se replican junto con el genoma anfitrión. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de los genes a los que están vinculados operativamente. Dichos vectores se denominan en el presente documento "vectores de expresión recombinantes" (o simplemente, "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinante están a menudo en forma de plásmidos. Los términos "plásmido" y "vector" pueden usarse indistintamente. Sin embargo, la divulgación pretende incluir tales otras formas de vectores de expresión, tales como vectores víricos (p. ej., retrovirus defectuosos en replicación, adenovirus y virus adenoasociados), que cumplen funciones equivalentes.

60 Como se usa en el presente documento, la expresión "célula anfitriona" se refiere a una célula en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante. Debe entenderse que este término pretende referirse no solo a la célula objeto particular sino a la progenie de dicha célula. Debido a que ciertas modificaciones pueden ocurrir en generaciones sucesivas debido a mutación o influencias ambientales, tal progenie puede no ser, de hecho, idéntica a la célula parental, pero puede estar incluida todavía dentro del alcance de la expresión "célula anfitriona" como se

usa en el presente documento.

5 Como se usa en el presente documento, los términos "tratar", "que tratan" y "tratamiento" se refieren a medidas terapéuticas o preventivas descritas en el presente documento. Los procedimientos de "tratamiento" emplean administrar a un sujeto un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la presente divulgación, por ejemplo, un sujeto que tiene una enfermedad o trastorno asociado a Calidina y a des-Arg₁₀-Calidina (p. ej., una enfermedad inflamatoria) o predispuesto a tener una enfermedad o trastorno de este tipo, con el fin de prevenir, curar, retrasar, reducir la gravedad, o mejorar uno o más síntomas, de la enfermedad o trastorno o recurrencia de la enfermedad o trastorno, o para prolongar la supervivencia de un sujeto más allá de lo esperado en ausencia de dicho tratamiento.

10 Como se usa en el presente documento, la expresión "enfermedad o trastorno asociado a Calidina o des-Arg₁₀-Calidina" incluye estados de enfermedad y/o síntomas asociados con un estado de enfermedad, donde se hallan niveles o actividad alterados de Calidina o des-Arg₁₀-Calidina. Ejemplos de enfermedades o trastornos asociados con Calidina o des-Arg₁₀-Calidina incluyen, pero no se limitan a, dolor y fibrosis.

15 Como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad eficaz" se refiere a esa cantidad de un anticuerpo o de un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a Calidina o des-Arg₁₀-Calidina, que es suficiente para efectuar el tratamiento, pronóstico o diagnóstico de una enfermedad o trastorno asociado a Calidina o des-Arg₁₀-Calidina, como se describe en el presente documento, cuando se administra a un sujeto. Una cantidad terapéuticamente eficaz variará dependiendo del sujeto y del estado de la enfermedad que es tratada, del peso y de la edad del sujeto, de la gravedad del estado de la enfermedad, de la forma de administración y aspectos similares, que pueden ser fácilmente determinados por una persona con experiencia ordinaria. Las dosificaciones para la administración pueden variar desde, por ejemplo, aproximadamente 1 ng hasta aproximadamente 10.000 mg, aproximadamente 1 ug hasta aproximadamente 5.000 mg, aproximadamente 1 mg hasta aproximadamente 1.000 mg, aproximadamente 10 mg hasta aproximadamente 100 mg, de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno según la divulgación. Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Una cantidad eficaz es también aquella en la que cualquiera de los efectos tóxicos o perjudiciales (es decir, los efectos secundarios) de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo son minimizados o compensados por los efectos beneficiosos.

Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" incluye cualquier animal humano o no humano.

30 Como se usa en el presente documento, el término "epítope" se refiere a un determinante antigénico que interactúa con un sitio específico de unión a antígeno en la región variable de una molécula de anticuerpo conocida como paratopo. Un único antígeno puede tener más de un epítope. Por lo tanto, diferentes anticuerpos pueden unirse a diferentes áreas en un antígeno y pueden tener diferentes efectos biológicos. Los epítopes pueden ser conformacionales o lineales. Un epítope conformacional es producido por aminoácidos espacialmente yuxtapuestos de diferentes segmentos de la cadena polipeptídica lineal. Un epítope lineal es el producido por restos adyacentes de aminoácidos en una cadena polipeptídica.

35 Se observa aquí que, tal como se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una" y "el" incluyen la referencia en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

II. Anticuerpos anti-Calidina o des-Arg₁₀-Calidina

40 En un aspecto, la divulgación proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se unen específicamente a Calidina o des-Arg₁₀-Calidina. Ejemplos de secuencias de aminoácidos VH, VL y CDR de los anticuerpos de la divulgación se exponen en la Tabla 1.

Tabla 1. Secuencias de aminoácidos VH, VL y CDR de anticuerpos anti-Calidina o des-Arg₁₀-Calidina ejemplares.

Anticuerpo clon	Secuencia	SEQ ID NO.
HCDR3 de consenso de F151	X ₁ YX ₂ X ₃ DX ₄ HAMX ₅ Y donde: X ₁ es Y, F o H; X ₂ es R, D, A, V, L, I, M, F, Y o W; X ₃ es Y, F, W o H; X ₄ es D, E o Y; y X ₅ es D o E.	7

ES 2 673 869 T3

Anticuerpo clon	Secuencia	SEQ ID NO.
HCDR2 de consenso de F151	YFX ₁ PX ₂ NGNTGYNQKFRG donde: X ₁ es D, R, A, V, L, I, M, F, Y o W; y X ₂ es Y, D, E, N, o Q.	8
HCDR1 de consenso de F151	GYSFTDYX ₁ IY Donde X ₁ es N, W o Y.	9
LCDR3 de consenso de F151	QQX ₁ X ₂ SX ₃ PX ₄ T donde: X ₁ es Y, F o H; X ₂ es Y, F, H o W; X ₃ es Y, F, T o H; y X ₄ es W, Y, F, H o L.	10
LCDR2 de consenso de F151	WASTRX ₁ donde X ₁ es E, D, Q o N.	11
LCDR1 de consenso de F151	KSSQSLLX ₁ SSNQKNX ₂ LA donde: X ₁ es W, H, Y o F; y X ₂ es H o Y.	12
HCDR3 de F151	YYRYDDHAMDY	13
HCDR2 de F151	YFDPYNGNTGYNQKFRG	14
HCDR1 de F151	GYSFTDYNIY	15
LCDR3 de F151	QQYYSYPWT	16
LCDR2 de F151	WASTRES	17
LCDR1 de F151	KSSQSLLYSSNQKNYLA	18
VH de F151	EIQLVQSGPELVKPGTSVKVSCKASGYSFTDYNIYVVKQSHGK SLEWIGYFDPYNGNTGYNQKFRGKATLTVDKSSSTAFMHLSSL TSDDSAVYYCAHYRYDDHAMDYWGQGTSTVSS	19
HC1 humanizada de F151	EIQLVQSGPEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYNIYVVKQSPGK SLEWIGYFDPYNGNTGYNQKFRGKATLTVDKSSSTAFMHLSSL TSEDSAVYYCAHYRYDDHAMDYWGQGTSTVSS	20
HC2a humanizada de F151	QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYNIYVVKQSPGK GLEWIGYFDPYNGNTGYNQKFRGKATLTVDKSSSTAYMHLSSL TSEESAVYYCAHYRYDDHAMDYWGQGTSTVSS	21

ES 2 673 869 T3

Anticuerpo clon	Secuencia	SEQ ID NO.
HC2b humanizada de F151	QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYNI YWVKQSPGK GLEWIGYFDPYNGNTGYNEKFRGKATLTVDKSSSTAYMHLSSL TSEESAVYYCAHYRYDDHAMDYWGQGTSTVTVSS	22
HC2c humanizada de F151	QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYNI YWVKQSPGK GLEWIGYFDPYNGNTGYNQKFRGKATLTVDKSSSTAYMHLSSK TSEESAVYYCAHYRYDDHAMDYWGQGTSTVTVSS	23
HC3a humanizada de F151	QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYNI YWVRQAPGQ GLEWIGYFDPYNGNTGYNQKFRGRATLTVDKSTSTAYMELRSL RSDDTAVYYCAHYRYDDHAMDYWGQGTSTVTVSS	24
HC3b humanizada de F151	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYNI YWVRQAPGQ GLEWMGYFDPYNGNTGYNQKFRGRVTMTDTSTSTAYMELRSL RSDDTAVYYCAHYRYDDHAMDYWGQGTSTVTVSS	25
VL de F151	DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQ QRPGQSPKPLIYWASTRESGVDRFTGSGSGTDFTLTISSVKA EDLAIYYCQQYYSYPWTFGGGKLEIK	26
LC1 humanizada de F151	DIVMSQSPSSLAAASVGDVRTMSCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQ QRPGKSPKPLIYWASTRESGVDRFTGSGSGTDFTLTISSVQA EDLAIYYCQQYYSYPWTFGGGKLEIK	27
LC2a humanizada de F151	DIVMTQSPSSLASVGDVRTISCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQ QRPGKSPKPLIYWASTRESGVDRFSGSGSGTDFTLTISSVQA EDLATYYCQQYYSYPWTFGGGKLEIK	28
LC2b humanizada de F151	DIVMTQSPSSLASVGDVRTISCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQ QRPGKSPKPLIYWASTRESGVDRFSGSGSGTDFTLTISSVQA EDKATYYCQQYYSYPWTFGGGKLEIK	29
LC3a humanizada de F151	DIVMTQSPDCLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQ QRPGQPPKPLIYWASTRESGVDRFSGSGSGTDFTLTISSLQA EDVAVYYCQQYYSYPWTFGGGKLEIK	30
LC3b humanizada de F151	DIVMTQSPDCLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQ QRPGQPKLLIYWASTRESGVDRFSGSGSGTDFTLTISSLQA EDVAVYYCQQYYSYPWTFGGGKLEIK	31
HCDR3 del B21	WEYDGYDLDY	32
HCDR2 del B21	WIDPENGDTGYARKFQG	33
HCDR1 del B21	GFNIKDYLLH	34
LCDR3 del B21	LQGTHFPYT	35
LCDR2 del B21	LVSKLDS	36
LCDR1 del B21	KSSQSLLYSNGKTYLN	37
VH del B21	EVQLQQSGAELVRSASVKLSCTASGFNIKDYLLHWVKRPEQ GLEWIGWIDPENGDTGYARKFQKATMTADTSNTVYLHLSSL TSEDITAVYYFNAAWEYDGYDLDYWGQGTSTVTVSS	38
VL del B21	DVVMQTPLTILSVTIGQPASISCKSSQSLLYSNGKTYLNWLLQ RPGQSPKRLIYLVSCLDSGVDRFTGSGSGTDFTLKIIRVEAE DLGVYYCLQGTHTFPYTFGGGKLEIK	39

ES 2 673 869 T3

Anticuerpo clon	Secuencia	SEQ ID NO.
HCDR3 de C63	EDYGGDY	40
HCDR2 de C63	EIRSKSNNYATHYAESVKG	41
HCDR1 del C63	GFTFSNYWMN	42
LCDR3 del C63	QQYYSYPY	43
LCDR2 del C63	WASTRES	17
LCDR1 del C63	KSSQSLLYSSDQRNYLA	44
VH del C63	EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSVAGGFTFSHYWMNWVRQSP GLEWVAEIRSKSNNYATHYAESVKGRTISRDDSKSSVYLQMN HLRAEDTGIYYCIGEDYGGDYWGQTSVTVSS	45
VL del C63	DIVMSQSPSCLAVSVGKVTMSCKSSQSLLYSSDQRNYLAWYQ QRSGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKA EDLAVYYCQQYYSYPYTFGGGKLEIK	46
HCDR3 del I22	FEYDGNYSPLDF	47
HCDR2 del I22	WVDPENGDSYAPKFQ	48
HCDR1 del I22	GFNIKDYMH	49
LCDR3 del I22	QNDHSYPLT	50
LCDR2 del I22	GASTRES	51
LCDR1 del I22	KSSQSLLSNGNQKNYLA	52
VH del I22	EVQLQQSGAELVRSAGSVKLSCTASGFNIKDYMHVVKQRPEQ GLEWIGWVDPENGDSYAPKFQKATMTADTSNTVYLQFSSL TSEDYAVYYCHAFEYDGNYSPLDFWGQTSVTVSS	53
VL del I22	DIVMTQSPSSLSVSGEKVTMSCKSSQSLLSNGNQKNYLAWYQ QKPGQPPKLLIYGASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQA EDLAVYYCQNDHSYPLTFGAGTKLELK	54
HCDR3 del I54	FEYDGNYSPLDF	55
HCDR2 del I54	WVDPENGDSYAPKFQ	56
HCDR1 del I54	GFNIKDYMH	57
LCDR3 del I54	MQGTHFPYT	58
LCDR2 del I54	LVSKLDS	59
LCDR1 del I54	KSSQSLLYSNGETYLN	60
VH del I54	EVQLQQSGAELVRSAGSVKLSCTASGFNIKDYMHVVKQRPEQ GLEWIGWVDPENGDSYAPKFQKATMTADTSNTVYLQFSSL TSEDYAVYYCHAFEYDGNYSPLDFWGQTSVTVSS	61

ES 2 673 869 T3

Anticuerpo clon	Secuencia	SEQ ID NO.
VL del I54	DVVMITQIPLTLTSLVPIGQPASISCKSSQSLLYSNGETYLNWLLQ RPGQSPKRLIYLVS KLDSGVPDRFTGSRSGTDFTLKISRVESE DLGVYYCMQGTHTFPYTFGGGTKLEIK	62
HCDR3 de consenso de B21/I22/I54	X ₁ EYDGX ₂ YX ₃ X ₄ LDX ₅ donde: X ₁ es W o F; X ₂ es N o ningún aminoácido; X ₃ es Y o S; X ₄ es D o P; y X ₅ es F o Y.	63
HCDR2 de consenso de B21/I22/I54	WX ₁ DPENGDX ₂ X ₃ YAPKFQG donde: X ₁ es I, o V; X ₂ es T, o S; y X ₃ es G, o D.	64
HCDR1 de consenso de B21/I22/I54	GFNIKDYYX ₁ H donde X ₁ es L, o M.	65
LCDR3 de consenso de F151/C63/I22	QX ₁ X ₂ X ₃ SX ₄ PX ₅ T donde: X ₁ es Q o N; X ₂ es Y, F, D o H; X ₃ es Y, F, H o W; X ₄ es Y, F, T o H; y X ₅ es W, Y, F, H o L.	66
LCDR2 de consenso de F151/C63/I22	X ₂ ASTRX ₂ donde: X ₁ es W o G; y X ₂ es E, D, Q o N	67

ES 2 673 869 T3

Anticuerpo clon	Secuencia	SEQ ID NO.
LCDR1 de consenso de F151/C63/I22	KSSQSLX ₁ X ₂ SX ₃ QX ₄ NX ₅ LA donde: X ₁ es W, H, Y o F; X ₂ es S o G; X ₃ es N o D; X ₄ es K o R; X ₅ es H o Y.	68
LCDR3 de consenso de B21/I54	X ₁ QGTHFPYT donde: X ₁ es L o M;	69
LCDR2 de B21/I54, ambos idénticos	LVSKLDS	36
LCDR1 de consenso de B21/I54	KSSQSLLYSNGX ₁ TYLN donde: X ₁ es K o E;	70

5 En ciertas realizaciones, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende una o más secuencias de aminoácidos de las regiones CDR seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 40, 41, 42, 43, 44, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 y 70.

En otras realizaciones, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende las secuencias de aminoácidos de las regiones HCDR3, HCDR2 y HCDR1 seleccionadas del grupo que consiste en:

- a) SEQ ID NO: 7, 8 y 9;
- b) SEQ ID NO: 13, 14 y 15;
- 10 c) SEQ ID NO: 32, 33 y 34;
- d) SEQ ID NO: 40, 41 y 42;
- e) SEQ ID NO: 47, 48 y 49;
- f) SEQ ID NO: 55, 56 y 57; y
- g) SEQ ID NO: 63, 64 y 65, respectivamente.

15 En otras realizaciones, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende las secuencias de aminoácidos de las regiones LCDR3, LCDR2 y LCDR1 seleccionadas del grupo que consiste en:

- a) SEQ ID NO: 10, 11 y 12;
- b) SEQ ID NO: 16, 17 y 18;
- c) SEQ ID NO: 35, 36 y 37;
- 20 d) SEQ ID NO: 43, 17 y 44;
- e) SEQ ID NO: 50, 51 y 52;
- f) SEQ ID NO: 58, 59 y 60;

- g) SEQ ID NO: 66, 67 y 68; y
- h) SEQ ID NO: 69, 25 y 70, respectivamente.

En otras realizaciones, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende las secuencias de aminoácidos de la región HCDR3, HCDR2, HCDR1, LCDR3, LCDR2 y LCDR1 seleccionadas del grupo que consiste en:

- a) SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11 y 12;
- b) SEQ ID NO: 13, 14, 15, 16, 17 y 18;
- c) SEQ ID NO: 32, 33, 34, 35, 36 y 37;
- d) SEQ ID NO: 40, 41, 42, 43, 17 y 44;
- e) SEQ ID NO: 47, 48, 49, 50, 51 y 52; y
- f) SEQ ID NO: 55, 56, 57, 58, 59 y 60, respectivamente

En otra realización, la divulgación proporciona anticuerpos humanizados, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que comprenden una o más regiones CDR (o variantes de las mismas modificadas de forma conservadora) a partir de los anticuerpos de murino descritos en el presente documento. Se puede emplear cualquier procedimiento de humanización para generar los anticuerpos humanizados de la divulgación. Los procedimientos adecuados se describen en el presente documento y se ejemplifican específicamente en el Ejemplo 4.

En una realización particular, el anticuerpo humanizado o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende:

una región variable de la cadena pesada que comprende las secuencias amino de las regiones HCDR3, HCDR2 y HCDR1 expuestas en 13, 14 y 15, respectivamente, y una o más sustituciones de aminoácidos en posiciones seleccionadas del grupo que consiste en H1, H5, H9, H11, H12, H16, H38, H40, H41, H43, H44, H66, H75, H79, H81, H82A, H83, H87 y H108; y/o

una región variable de la cadena ligera que comprende las secuencias amino de las regiones LCDR3, LCDR2 y LCDR1 expuestas en 16, 17 y 18, respectivamente, y una o más sustituciones de aminoácidos en posiciones seleccionadas del grupo que consisten en L5, L9, L15, L18, L19, L21, L22, L43, L63, L78, L79, L83, L85, L100 y L104 (según el convenio de numeración de Kabat).

En otras realizaciones, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende las secuencias de aminoácidos de la región VH expuestas en las SEQ ID NO: 19, 20, 21, 22, 24, 25, 38, 45, 53, y/o 61.

En otras realizaciones, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende las secuencias de aminoácidos de la región VL expuestas en las SEQ ID NO: 26, 27, 28, 29, 29, 30, 31, 39, 46, 54, y/o 62.

En otras realizaciones, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL seleccionadas del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 19 y 26, SEQ ID NO: 20 y 27, SEQ ID NO: 21 y 28; SEQ ID NO: 22 y 28; SEQ ID NO: 23 y 29; SEQ ID NO: 24 y 30; SEQ ID NO: 25 y 31; SEQ ID NO: 38 y 39, SEQ ID NO: 45 y 46, SEQ ID NO: 53 y 54, o SEQ ID NO: 61 y 62, respectivamente.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende una o más secuencias de aminoácidos de la región CDR seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 40, 41, 42, 43, 44, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 55, 56, 57, 58, 59 y 60, en donde las una o más secuencias de aminoácidos de la región CDR comprenden al menos una o más sustituciones de aminoácidos conservadoras.

La presente divulgación también abarca "sustituciones conservadoras de aminoácidos" en las secuencias de aminoácidos de CDR (p. ej., las SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 40, 41, 42, 43, 44, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 55, 56, 57, 58, 59 y 60) de los anticuerpos de la divulgación, es decir, modificaciones de la secuencia de aminoácidos que no anulan la unión del anticuerpo al antígeno, p. ej., Calidina o des-Arg₁₀-Calidina. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos incluyen la sustitución de un aminoácido de una clase por un aminoácido de la misma clase, donde una clase se define por las propiedades físicoquímicas normales de la cadena lateral de aminoácidos y altas frecuencias de sustitución en proteínas homólogas de origen natural, según se determina, por ejemplo, mediante una matriz estándar de intercambio de frecuencia Dayhoff o matriz BLOSUM. Se han clasificado seis clases generales de cadenas laterales de aminoácidos e incluyen: Clase I (Cys); Clase II (Ser, Thr, Pro, Ala y Gly); Clase III (Asn, Asp, Gln y Glu); Clase IV (His, Arg y Lys); Clase V (Ile, Leu, Val y Met); y Clase VI (Phe, Tyr y Trp). Por ejemplo, la sustitución de un Asp por otro resto de clase III, como Asn, Gln o Glu, es una sustitución conservadora. De ese modo, un resto de aminoácido no esencial previsto en un anticuerpo anti-Calidina o des-Arg₁₀-Calidina se reemplaza preferiblemente con otro resto de aminoácido de la misma clase. Los procedimientos para identificar sustituciones conservadoras de aminoácidos que no eliminan la

unión al antígeno son bien conocidos en la técnica (véase, p. ej., Brummell y col., *Biochem.* 32: 1180-1187 (1993); Kobayashi y col., *Protein Eng.* 12(10): 879-884 (1999) y Burks y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 94: 412-417 (1997)).

5 En otra realización, la presente divulgación proporciona anticuerpos anti-Calidina o des-Arg₁₀-Calidina, o fragmento de unión a antígeno de los mismos, que comprenden una secuencia de aminoácidos de las regiones VH y/o VL con aproximadamente 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%, de identidad con la secuencia de aminoácidos de la región VH expuesta en las SEQ ID NO: 19, 20, 21, 22, 24, 25, 38, 45, 53 o 61, o la secuencia de aminoácidos de la región VL expuesta en las SEQ ID NO: 26, 27, 28, 29, 29, 30, 31, 39, 46, 54 o 62, respectivamente.

10 En otra realización, la presente divulgación proporciona anticuerpos anti-Calidina o des-Arg₁₀-Calidina que se unen al mismo epítipo y/o compiten de forma cruzada con un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL expuestas en las SEQ ID NO: 19 y 25, SEQ ID NO: 38 y 39, SEQ ID NO: 45 y 46, SEQ ID NO: 53 y 54, o SEQ ID NO: 61 y 62, respectivamente. Dichos anticuerpos pueden ser identificados usando ensayos de unión competitiva de rutina que incluyen, por ejemplo, ensayos de competición basados en resonancia de plasmón de superficie (SPR).

15 En ciertas realizaciones, los anticuerpos de la divulgación se unen a un epítipo conformacional de calidina (KD) o des-Arg₁₀-Calidina (DAKD) que adopta una conformación de "trenzado de Pro4". Como se representa en la Figura 17, un sello distintivo de la conformación de "trenzado de Pro 4" es un giro cerrado de tipo II en la estructura principal de polipéptidos de la cadena principal de KD o DAKD en Prolina 4. Como saben los expertos en la técnica, una conformación de giro cerrado de tipo II comprende tres restos (X₁-X₂-X₃) con el carbonilo del resto X₁ formando un enlace de hidrógeno con el N amido del resto X₃, que típicamente es una glicina (véase Richardson JS. "The anatomy and taxonomy of protein structure". *Adv Protein Chem.* 1981; 34:167-339, que se incorpora en el presente documento por referencia). Según esto, en ciertas realizaciones, se forma una conformación de giro cerrado de tipo II mediante el motivo Pro3-Pro4-Gly5 de KD o DAKD. En realizaciones más específicas, la conformación de "trenzado Pro 4" se define adicionalmente por todos o sustancialmente todos los aminoácidos restantes de KD (1-2 y 6-9) o DAKD que adoptan repeticiones de una forma sigmoidea que alinean las cadenas laterales hidrófobas en un modo de apilamiento espacial.

III. Anticuerpos anti-Calidina o des-Arg₁₀-Calidina modificados

30 En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-Calidina o des-Arg₁₀-Calidina de la divulgación pueden comprender una o más modificaciones. Se pueden preparar formas modificadas de anticuerpos anti-Calidina o des-Arg₁₀-Calidina de la divulgación usando cualquier técnica conocida en la materia.

i) Reducir la inmunogenicidad

35 En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-Calidina o des-Arg₁₀-Calidina, o fragmentos de unión a antígeno de las mismas, de la divulgación se modifican para reducir su inmunogenicidad usando técnicas reconocidas en la materia. Por ejemplo, los anticuerpos, o fragmentos de los mismos, pueden ser quimerizados, humanizados y/o desinmunizados.

40 En una realización, un anticuerpo, o fragmentos de unión a antígeno del mismo, de la divulgación puede ser quimérico. Un anticuerpo quimérico es un anticuerpo en el que diferentes porciones del anticuerpo se derivan de diferentes especies animales, tales como anticuerpos que tienen una región variable derivada de un anticuerpo monoclonal de murino y una región constante de inmunoglobulina humana. Los procedimientos para producir anticuerpos quiméricos, o fragmentos de los mismos, son conocidos en la técnica. Véase, p. ej., Morrison, *Science* 229: 1202 (1985); Oi y col., *BioTechniques* 4: 214 (1986); Gillies y col., *J. Immunol. Methods* 125: 191-202 (1989); patentes de EE.UU. n.º 5.807.715; 4.816.567; y 4.816.397, que se incorporan en el presente documento en su totalidad por referencia. Las técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos" (Morrison y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81: 851-855 (1984); Neuberger y col., *Nature* 312: 604-608 (1984); Takeda y col., *Nature* 314: 452-454 (1985)) se pueden emplear para la síntesis de dichas moléculas. Por ejemplo, una secuencia genética que codifica una especificidad de unión de una molécula de anticuerpo anti-Calidina o des-Arg₁₀-Calidina de ratón puede fusionarse junto con una secuencia de una molécula de anticuerpo humano de actividad biológica apropiada. Como se usa en el presente documento, un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes porciones se derivan de diferentes especies animales, tales como las que tienen una región variable derivada de un anticuerpo monoclonal de murino y una región constante de inmunoglobulina humana, p. ej., anticuerpos humanizados.

50 En otra realización, un anticuerpo de la divulgación, o fragmento de unión a antígeno del mismo está humanizado. Los anticuerpos humanizados tienen una especificidad de unión que comprende una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de un anticuerpo no humano y regiones de entramado de una molécula de anticuerpo humano. A menudo, los restos del entramado en las regiones de entramado humanas se sustituirán con el resto correspondiente del anticuerpo donante de la CDR para alterar, preferiblemente mejorar, la unión al antígeno. Estas sustituciones del entramado se identifican por procedimientos bien conocidos en la técnica, p. ej., mediante modelización de las interacciones de los restos de CDR y de entramado para identificar los restos de

entramado importantes para la unión de antígeno y comparación de la secuencia para identificar restos de entramado inusuales en posiciones particulares (Véanse, p. ej., Queen y col., patente de EE.UU. n.º 5.585.089; Riechmann y col., *Nature* 332: 323 (1988), que se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad). Los anticuerpos se pueden humanizar usando diversas técnicas conocidas en la materia que incluye, por ejemplo, el injerto de CDR (EP 239.400; publicación PCT WO 91/09967; la patente de EE.UU. n.º 5.225.539; 5.530.101; y 5.585.089), recubrimiento o rejuvenecimiento (EP 592.106; EP 519.596; Padlan, *Molecular Immunology* 28 (4/5): 489-498 (1991); Studnicka y col., *Protein Engineering* 7(6): 805-814 (1994); Roguska y col., *PNAS* 91: 969-973 (1994)), y barajado de cadenas (patente de EE.UU. n.º 5.565.332).

En una realización particular, se emplea un procedimiento de humanización que se basa en el impacto de la flexibilidad molecular del anticuerpo durante y en el reconocimiento inmunitario (véase el documento WO2009/032661, que se incorpora en el presente documento en su totalidad por referencia). La flexibilidad de la proteína está relacionada con el movimiento molecular de la molécula de proteína. La flexibilidad de la proteína es la capacidad de una proteína completa, una parte de una proteína o un único resto de aminoácido para adoptar un conjunto de conformaciones que difieren significativamente entre sí. La información sobre la flexibilidad de la proteína se puede obtener realizando experimentos de cristalografía de rayos X de las proteínas (véase, por ejemplo, Kundu y col., 2002, *Biophys J* 83: 723-732), experimentos de resonancia magnética nuclear (véase, por ejemplo, Freedberg y col., *J Am Chem Soc* 1998, 120(31): 7916-7923) o ejecutando simulaciones de dinámica molecular (MD). Una simulación de MD de una proteína se realiza en un ordenador y permite determinar el movimiento de todos los átomos de la proteína a lo largo de un período de tiempo mediante el cálculo de las interacciones físicas de los átomos entre sí. El resultado de una simulación de MD es la trayectoria de la proteína estudiada durante el período de tiempo de la simulación. La trayectoria es un conjunto de conformaciones de las proteínas, también llamadas instantáneas, que se muestrean periódicamente durante el período de simulación, p. ej., cada 1 picosegundo (ps). Analizando el conjunto de instantáneas se puede cuantificar la flexibilidad de los restos de aminoácidos de la proteína. Por ello, un resto flexible es el que adopta un conjunto de conformaciones diferentes en el contexto del polipéptido dentro del cual reside dicho resto. Los procedimientos de MD son conocidos en la técnica, véase, p. ej., Brooks y col. "Proteins: A Theoretical Perspective of Dynamics, Structure and Thermodynamics" (Wiley, Nueva York, 1988). Varios softwares permiten simulaciones de MD, como Amber (véase Case y col. (2005) *J Comp Chem* 26: 1668-1688), Charmm (véase Brooks y col. (1983) *J Comp Chem* 4: 187-217; y MacKerell y col. (1998) en "The Encyclopedia of Computational Chemistry" vol. 1: 271-177, Schleyer y col., editores Chichester: John Wiley & Sons) o Impact (véase Rizzo y col., *J Am Chem Soc*; 2000; 122(51): 12898-12900).

La mayoría de los complejos proteicos comparten una superficie enterrada relativamente amplia y plana y se ha demostrado que la flexibilidad de los socios de unión proporciona el origen de su plasticidad, lo que les permite adaptarse conformacionalmente entre sí (*Structure* (2000) 8, R137-R142). Como tal, se ha demostrado que los ejemplos de "ajuste inducido" desempeñan un papel dominante en las interfaces proteína-proteína. Además, hay un conjunto de datos en constante aumento que muestra que las proteínas se unen de hecho a ligandos de diversas formas, tamaños y composiciones (*Protein Science* (2002) 11:184-187) y que la diversidad conformacional parece ser un componente esencial de la capacidad de reconocer diferentes socios (*Science* (2003) 299, 1362-1367). Los restos flexibles están implicados en la unión de los socios proteína-proteína (*Structure* (2006) 14, 683-693).

Los restos flexibles pueden adoptar una variedad de conformaciones que proporcionan un conjunto de áreas de interacción que es probable que sean reconocidas por las células B de memoria y desencadenar una respuesta inmunogénica. Por ello, un anticuerpo se puede humanizar modificando varios restos del entramado de manera que el conjunto de las conformaciones y de las áreas de reconocimiento visualizadas por el anticuerpo modificado se asemejen lo más posible a las adoptadas por un anticuerpo humano. Esto se puede lograr modificando un número limitado de restos: (1) construyendo un modelo de homología del mAb progenitor y ejecutando una simulación de MD; (2) analizando los restos flexibles e identificando los restos más flexibles de una molécula de anticuerpo no humano, así como identificando restos o motivos que probablemente sean una fuente de heterogeneidad o de reacción de degradación; (3) identificando un anticuerpo humano que muestra el conjunto más similar de áreas de reconocimiento como anticuerpo progenitor; (4) determinando los restos flexibles a mutar, los restos o motivos que sean probablemente una fuente de heterogeneidad y degradación también son mutados; y (5) verificando la presencia de epítopes de células T o células B conocidos. Los restos flexibles se pueden encontrar usando un cálculo de MD tal como se describe en el presente documento utilizando un modelo de disolvente implícito, que tiene en cuenta la interacción del disolvente agua con los átomos de proteína durante el período de tiempo de la simulación.

Una vez que se ha identificado el conjunto de restos flexibles dentro de las cadenas ligera y pesada variables, se identifican un conjunto de entramados de región variable de las cadenas pesada y ligera humanas que se asemejan mucho a las del anticuerpo de interés. Eso se puede hacer, por ejemplo, utilizando una búsqueda BLAST en el conjunto de restos flexibles contra una base de datos de secuencia de línea germinal humana del anticuerpo. También se puede hacer comparando la dinámica del mAb progenitor con la dinámica de una biblioteca de estructuras canónicas de línea germinal. Los restos de CDR y los restos vecinos se excluyen de la búsqueda para asegurar que se preserve la alta afinidad por el antígeno. Los restos flexibles se sustituyen después.

Cuando varios restos humanos ácidos muestran homologías similares, la selección también está dirigida por la naturaleza de los restos que es probable que afecten al comportamiento de la solución del anticuerpo humanizado.

- Por ejemplo, los restos polares serán preferidos en bucles flexibles expuestos antes que los restos hidrófobos. Los restos que son una fuente potencial de inestabilidad y heterogeneidad también se mutan incluso si se encuentran en los CDR. Esto incluirá metioninas expuestas ya que la formación de sulfóxido puede resultar de radicales oxigenados, escisión proteolítica de enlaces lábiles ácidos como los del dipéptido Asp-Pro (Drug Dev Res (2004) 61:137-154), sitios de desamidación encontrados con un resto de asparagina expuesto seguido de un pequeño aminoácido, como Gly, Ser, Ala, His, Asn o Cys (J Chromatog (2006) 837: 35-43) y sitios de N-glucosilación, como el sitio Asn-X-Ser/Thr. Típicamente, las metioninas expuestas serán sustituidas por un Leu, las asparaginas expuestas serán sustituidas por una glutamina o por un aspartato, o se cambiará el resto subsiguiente. Para el sitio de glucosilación (Asn-X-Ser/Thr), se cambiarán el Asn o el resto Ser/Thr.
- 5 La secuencia de anticuerpo compuesto resultante se verifica por la presencia de epítopes conocidos de células B o células T lineales. Se realiza una búsqueda, por ejemplo, con la Base de Datos de Epítopes Inmunológicos (IEDB) disponible para el público (PLos Biol (2005) 3(3)e91). Si se encuentra un epítope conocido dentro de la secuencia compuesta, otro conjunto de secuencias humanas se recupera y se sustituye. De ese modo, a diferencia del procedimiento de rejuvenecimiento de la patente de EE.UU. n.º 5.639.641, las respuestas inmunogénicas mediadas tanto por células B como mediadas por células T se abordan mediante el procedimiento. El procedimiento también evita el problema de la pérdida de actividad que a veces se observa con el injerto de CDR (patente de EE.UU. n.º 5.530.101). Además, los problemas de estabilidad y solubilidad se consideran también en el proceso de ingeniería y selección, dando como resultado un anticuerpo que es optimizado para una baja inmunogenicidad, una alta afinidad antigénica y propiedades biofísicas mejoradas.
- 10 En algunas realizaciones, la desinmunización puede usarse para disminuir la inmunogenicidad del anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo. Como se usa en el presente documento, el término "desinmunización" incluye la alteración de un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, para modificar epítopes de células T (véanse, p. ej., WO9852976A1 y WO0034317A2). Por ejemplo, se pueden analizar las secuencias VH y VL del anticuerpo de partida y se puede generar un "mapa" de epítopes de células T humanas de cada región V mostrando la ubicación de epítopes en relación con las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) y otros restos clave dentro la secuencia. Los epítopes de célula T individuales del mapa de epítopes de células T se analizan para identificar sustituciones alternativas de aminoácidos con un riesgo bajo de alterar la actividad del anticuerpo final. Se diseñan una gama de secuencias VH y VL alternativas que comprenden combinaciones de sustituciones de aminoácidos y estas secuencias se incorporan posteriormente en un intervalo de anticuerpos específicos de Calidina o des-Arg₁₀-Calidina, o fragmentos de los mismos, para uso en los procedimientos de diagnóstico y tratamiento descritos en el presente documento, que luego se prueban para la función. Típicamente, se generan y prueban entre 12 y 24 anticuerpos variantes. Los genes completos de la cadena pesada y ligera que comprenden regiones V modificadas y C humanas se clonan a continuación en vectores de expresión y los plásmidos posteriores se introducen en líneas celulares para la producción de anticuerpo completo. Luego se comparan los anticuerpos en ensayos bioquímicos y biológicos apropiados, y se identifica la variante óptima.
- 15
20
25
30
35

ii) Funciones efectoras y modificaciones Fc

- Los anticuerpos anti-Calidina o des-Arg₁₀-Calidina de la divulgación pueden comprender una región constante de anticuerpo (p. ej., una región constante de IgG, p. ej., una región constante de IgG humana, p. ej., una región constante de IgG1 o IgG4 humanas) que media una o más funciones efectoras. Por ejemplo, la unión del componente C1 de complemento a una región constante del anticuerpo puede activar el sistema del complemento. La activación del complemento es importante en la opsonización y lisis de los patógenos de las células. La activación del complemento también estimula la respuesta inflamatoria y también puede estar involucrada en la hipersensibilidad autoinmunitaria. Además, los anticuerpos se unen a receptores en diversas células a través de la región Fc, con un sitio de unión al receptor Fc en la región Fc del anticuerpo que se une a un receptor Fc (FcR) en una célula. Hay varios receptores Fc que son específicos para diferentes clases de anticuerpos, incluidos IgG (receptores gamma), IgE (receptores épsilon), IgA (receptores alfa) e IgM (receptores mu). La unión del anticuerpo a los receptores Fc en las superficies de las células desencadena una serie de respuestas biológicas importantes y diversas que incluyen la absorción y destrucción de partículas recubiertas de anticuerpos, supresión de complejos inmunitarios, la lisis de células diana recubiertas de anticuerpos por linfocitos citolíticos (denominada citotoxicidad mediada por células dependientes del anticuerpo, o ADCC), liberación de mediadores inflamatorios, transferencia placentaria y control de la producción de inmunoglobulinas. En realizaciones preferidas, los anticuerpos de la divulgación, o fragmentos de los mismos, se unen a un receptor Fc-gamma. En realizaciones alternativas, los anticuerpos anti-Calidina o des-Arg₁₀-Calidina de la divulgación pueden comprender una región constante que está desprovista de una o más funciones efectoras (p. ej., actividad ADCC) y/o es incapaz de unirse al receptor Fc.
- 40
45
50
55
60
- Ciertas realizaciones de la divulgación incluyen anticuerpos anti-Calidina o des-Arg₁₀-Calidina en los que al menos un aminoácido en uno o más de los dominios de la región constante se ha eliminado o, de otro modo, alterado para proporcionar características bioquímicas deseadas tales como funciones efectoras reducidas o mejoradas, la capacidad para dimerizar de forma no covalente, mejoró la capacidad para localizar en el sitio de un tumor, redujo la semivida del suero o aumentó la semivida del suero cuando se comparó con un anticuerpo completo, no alterado, de aproximadamente la misma inmunogenicidad. Por ejemplo, ciertos anticuerpos, o fragmentos de los mismos, para uso en los procedimientos de diagnóstico y tratamiento descritos en el presente documento son anticuerpos eliminados del dominio que comprenden una cadena polipeptídica similar a una cadena pesada de inmunoglobulina,

pero que carecen al menos de una porción de uno o más dominios de la cadena pesada. Por ejemplo, en ciertos anticuerpos, se eliminará un dominio completo de la región constante del anticuerpo modificado, por ejemplo, se borrará todo o parte del dominio CH2.

5 En otras determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-Calidina o des-Arg₁₀-Calidina comprenden regiones constantes derivadas de diferentes isotipos de anticuerpos (p. ej., regiones constantes de dos o más de una IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humanas). En otras realizaciones, los anticuerpos anti-Calidina o des-Arg₁₀-Calidina comprenden una bisagra quimérica (es decir, una bisagra que comprende porciones de bisagra derivadas de dominios bisagra de diferentes isotipos de anticuerpos, p. ej., un dominio bisagra superior de una molécula de IgG4 y un dominio bisagra medio de IgG1). En una realización, los anticuerpos anti-Calidina o des-Arg₁₀-Calidina comprenden una región Fc o
10 una porción de la misma de una molécula de IgG4 humana y una mutación Ser228Pro (numeración de UE) en la región bisagra central de la molécula.

En ciertos anticuerpos anti-Calidina o des-Arg₁₀-Calidina, la porción Fc puede ser mutada para aumentar o disminuir la función efectora usando técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, la supresión o inactivación (a través de mutaciones puntuales u otros medios) de un dominio de región constante puede reducir la unión del receptor Fc del anticuerpo modificado circulante, aumentando por ello la localización del tumor. En otros casos, puede ser que las modificaciones de la región constante consistentes con la presente divulgación moderen la unión del complemento y así reduzcan la semivida del suero y la asociación no específica de una citotoxina conjugada. Aún otras modificaciones de la región constante se pueden usar para modificar enlaces disulfuro o restos de oligosacáridos que permiten una localización potenciada debido a una mayor especificidad o flexibilidad del antígeno. El perfil fisiológico resultante, la biodisponibilidad y otros efectos bioquímicos de las modificaciones, tales como la localización del tumor, la biodistribución y la semivida del suero, pueden medirse y cuantificarse fácilmente usando técnicas inmunológicas bien conocidas sin una excesiva experimentación.

En ciertas realizaciones, un dominio Fc empleado en un anticuerpo de la divulgación es una variante Fc. Como se usa en el presente documento, el término "variante Fc" se refiere a un dominio Fc que tiene al menos una sustitución de aminoácido en relación con el dominio Fc de tipo salvaje del que se deriva dicho dominio Fc. Por ejemplo, en donde el dominio Fc se deriva de un anticuerpo IgG1 humano, la variante Fc de dicho dominio Fc de IgG1 humana comprende al menos una sustitución de aminoácido en relación con dicho dominio Fc.

Las sustituciones de aminoácido de una variante Fc se puede localizar en cualquier posición (es decir, cualquier posición de aminoácido de la convención de la UE) dentro del dominio Fc. En una realización, la variante Fc comprende una sustitución en una posición de aminoácido situada en un dominio bisagra o porción del mismo. En otra realización, la variante Fc comprende una sustitución en una posición de aminoácido situada en un dominio CH2 o porción del mismo. En otra realización, la variante Fc comprende una sustitución en una posición de aminoácido situada en un dominio CH3 o porción del mismo. En otra realización, la variante Fc comprende una sustitución en una posición de aminoácido situada en un dominio CH4 o porción del mismo.

35 Los anticuerpos de la divulgación pueden emplear cualquier variante Fc reconocida en la técnica que se sabe que imparte una mejora (p. ej., reducción o potenciación) en la función efectora y/o unión a FcR. Dichas variantes Fc pueden incluir, por ejemplo, una cualquiera de las sustituciones de aminoácidos divulgadas en las publicaciones PCT internacionales WO88/07089A1, WO96/14339A1, WO98/05787A1, WO98/23289A1, WO99/51642A1, WO99/58572A1, WO00/09560A2, WO00/32767A1, WO00/42072A2, WO02/44215A2, WO02/060919A2,
40 WO03/074569A2, WO04/016750A2, WO04/029207A2, WO04/035752A2, WO04/063351A2, WO04/074455A2, WO04/099249A2, WO05/040217A2, WO05/070963A1, WO05/077981A2, WO05/092925A2, WO05/123780A2, WO06/019447A1, WO06/047350A2, y WO06/085967A2 o en las patentes de EE.UU. n.º 5.648.260; 5.739.277; 5.834.250; 5.869.046; 6.096.871; 6.121.022; 6.194.551; 6.242.195; 6.277.375; 6.528.624; 6.538.124; 6.737.056; 6.821.505; 6.998.253; y 7.083.784, cada una de los cuales se incorpora en el presente documento por referencia. En una realización ejemplar, un anticuerpo de la divulgación puede comprender una variante Fc que comprende una sustitución de aminoácido en la posición 268 de la UE (p. ej., H268D o H268E). En otra realización ejemplar, un anticuerpo de la divulgación puede comprender una sustitución de aminoácido en la posición 239 de la UE (p. ej., S239D o S239E) y/o en la posición 332 de la UE (p. ej., I332D o I332Q).

En ciertas realizaciones, un anticuerpo de la divulgación puede comprender una variante Fc que comprende una sustitución de aminoácido que altera las funciones efectoras del anticuerpo independientes del antígeno, en particular la semivida circulante del anticuerpo. Tales anticuerpos muestran una unión aumentada o disminuida para FcRn cuando se comparan con anticuerpos que carecen de estas sustituciones, por lo tanto, tienen una semivida en suero aumentada o disminuida, respectivamente. Se anticipa que las variantes Fc con afinidad mejorada por FcRn tienen semividas en suero más largas, y tales moléculas tienen aplicaciones útiles en procedimientos de tratamiento de mamíferos donde se desea una semivida larga del anticuerpo administrado, p. ej., para tratar una enfermedad o trastorno crónico. Por el contrario, se espera que las variantes Fc con afinidad de unión a FcRn disminuida tengan semividas más cortas, y tales moléculas también son útiles, por ejemplo, para la administración a un mamífero donde un tiempo de circulación acortado puede ser ventajoso, p. ej., para imágenes de diagnóstico *in vivo* o en situaciones en las que el anticuerpo de partida tiene efectos secundarios tóxicos cuando está presente en la circulación durante períodos prolongados. Las variantes Fc con afinidad de unión a FcRn disminuida tienen también menos probabilidades de atravesar la placenta y, por ello, también son útiles en el tratamiento de enfermedades o

trastornos en mujeres embarazadas. Además, otras aplicaciones en las que puede desearse una afinidad de unión a FcRn reducida incluyen aquellas aplicaciones en las que se desea la localización del cerebro, riñón y/o hígado. En una realización ejemplar, los anticuerpos alterados de la divulgación muestran un transporte reducido a través del epitelio de los glomérulos renales desde la vasculatura. En otra realización, los anticuerpos alterados de la divulgación muestran un transporte reducido a través de la barrera hematoencefálica (BBB) desde el cerebro hacia el espacio vascular. En una realización, un anticuerpo con unión a FcRn alterada comprende un dominio Fc que tiene una o más sustituciones de aminoácidos dentro del "bucle de unión a FcRn" de un dominio Fc. El bucle de unión a FcRn está comprendido de los restos 280-299 de aminoácidos (según la numeración de la UE). Ejemplos de sustituciones de aminoácidos que alteraron la actividad de unión de FcRn se describen en la Publicación PCT Internacional N.º WO05/047327 que se incorpora en el presente documento por referencia. En ciertas realizaciones ejemplares, los anticuerpos de la divulgación, o fragmentos de los mismos, comprenden un dominio Fc que tiene una o más de las siguientes sustituciones: V284E, H285E, N286D, K290E y S304D (numeración de la UE).

En otras realizaciones, los anticuerpos, para uso en los procedimientos de diagnóstico y tratamiento descritos en el presente documento tienen una región constante, p. ej., una región constante de la cadena pesada de IgG1 o IgG4, que es alterada para reducir o eliminar la glucosilación. Por ejemplo, un anticuerpo de la divulgación puede comprender también una variante Fc que comprende una sustitución de aminoácido que altera la glucosilación del anticuerpo. Por ejemplo, dicha variante Fc puede tener glucosilación reducida (p. ej., glucosilación ligada a N o a O). En realizaciones ejemplares, la variante Fc comprende glucosilación reducida del glicano ligado a N normalmente encontrado en la posición 297 de aminoácido (numeración de la UE). En otra realización, el anticuerpo tiene una sustitución de aminoácido cerca o dentro de un motivo de glucosilación, por ejemplo, un motivo de glucosilación ligado a N que contiene las secuencias NXT o NXS de aminoácidos. En una realización particular, el anticuerpo comprende una variante Fc con una sustitución del aminoácido en la posición 228 o 299 del aminoácido (numeración de la UE). En realizaciones más particulares, el anticuerpo comprende una región constante de IgG1 o IgG4 que comprende una mutación S228P y una T299A (numeración de la UE).

Las sustituciones ejemplares de aminoácidos que confieren glucosilación reducida o alterada se describen en la publicación PCT Internacional N.º WO05/018572, que se incorpora en el presente documento por referencia. En realizaciones preferidas, los anticuerpos de la divulgación, o fragmentos de los mismos, se modifican para eliminar la glucosilación. Tales anticuerpos, o fragmentos de los mismos, se pueden denominar anticuerpos "agly", o fragmentos de los mismos, (p. ej., anticuerpos "agly"). Aunque no está limitado por la teoría, se cree que los anticuerpos "agly", o fragmentos de los mismos, pueden tener un perfil mejorado de seguridad y estabilidad *in vivo*. Ejemplos de anticuerpos agly, o fragmentos de los mismos, comprenden una región Fc aglucosilada de un anticuerpo IgG4 que está desprovista de función efectora de Fc, eliminando de ese modo el potencial de toxicidad mediada por Fc a los órganos vitales normales que expresan Calidina o des-Arg₁₀-Calidina. En aún otras realizaciones, los anticuerpos de la divulgación, o fragmentos de los mismos, comprenden un glicano alterado. Por ejemplo, el anticuerpo puede tener un número reducido de restos de fucosa en un N-glicano en Asn297 de la región Fc, es decir, está afucosilado. En otra realización, el anticuerpo puede tener un número alterado de restos de ácido siálico en el N-glicano en Asn297 de la región Fc.

iii) Unión covalente

Los anticuerpos anti-Calidina o des-Arg₁₀-Calidina de la divulgación se pueden modificar, p. ej., mediante la unión covalente de una molécula al anticuerpo de manera que la unión covalente no evite que el anticuerpo se una específicamente a su epítipo cognado. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los anticuerpos de la divulgación, o fragmentos de los mismos, pueden modificarse mediante glucosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, procedimientos indirectos mediante grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica, unión a un ligando celular u otra proteína, etc. Cualquiera de las numerosas modificaciones químicas se puede llevar a cabo mediante técnicas conocidas, que incluyen, pero no se limitan a escisión química específica, acetilación, formilación, etc. Además, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

Los anticuerpos de la divulgación, o fragmentos de los mismos, pueden fusionarse adicionalmente de forma recombinante a un polipéptido heterólogo en el N- o C-terminal o conjugarse químicamente (incluyendo conjugaciones covalentes y no covalentes) a polipéptidos u otras composiciones. Por ejemplo, los anticuerpos anti-Calidina o des-Arg₁₀-Calidina se pueden fusionar o conjugar de forma recombinante con moléculas útiles como marcadores en ensayos de detección y moléculas efectoras tales como polipéptidos, fármacos, radionucleidos o toxinas heterólogas. Véanse, p. ej., las publicaciones PCT WO 92/08495; WO 91/14438; WO 89/12624; patente de EE.UU. n.º 5.314.995; y EP 396.387.

Los anticuerpos anti-Calidina o des-Arg₁₀-Calidina se pueden fusionar con polipéptidos heterólogos para aumentar la semivida *in vivo* o para uso en inmunoensayos utilizando procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una realización, el PEG puede conjugarse con los anticuerpos anti-Calidina o des-Arg₁₀-Calidina de la divulgación para aumentar su semivida *in vivo*. Leong, S. R., y col., Cytokine 16: 106 (2001); Adv. in Drug Deliv. Rev. 54: 531 (2002); o Weir y col., Biochem. Soc. Transactions 30: 512 (2002).

Además, los anticuerpos anti-Calidina o des-Arg₁₀-Calidina de la divulgación se pueden fusionar con secuencias marcadoras, tales como un péptido para facilitar su purificación o detección. En realizaciones preferidas, la

secuencia de aminoácidos marcadores es un péptido de hexahistidina, tal como la etiqueta proporcionada en un vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, Calif., 91311), entre otros, muchos de los cuales están disponibles comercialmente. Como se describe en Gentz y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 86: 821-824 (1989), por ejemplo, la hexahistidina proporciona una purificación conveniente de la proteína de fusión. Otras etiquetas de péptidos útiles para la purificación incluyen, pero no se limitan a, la etiqueta "HA", que corresponde a un epítipo derivado de la proteína hemaglutinina de la gripe (Wilson y col., Cell 37: 767 (1984)) y la etiqueta de "bandera".

Los anticuerpos anti-Calidina o des-Arg₁₀-Calidina de la divulgación se pueden usar en forma no conjugada o se pueden conjugar con al menos una de una variedad de moléculas, p. ej., para mejorar las propiedades terapéuticas de la molécula, para facilitar la detección de la diana, o para imágenes o terapia del paciente. Los anticuerpos anti-Calidina o des-Arg₁₀-Calidina de la divulgación pueden ser marcados o conjugados antes o después de la purificación, cuando se realiza la purificación. En particular, los anticuerpos anti-Calidina o des-Arg₁₀-Calidina de la divulgación se pueden conjugar con agentes terapéuticos, profármacos, péptidos, proteínas, enzimas, virus, lípidos, modificadores de la respuesta biológica, agentes farmacéuticos o PEG.

La presente divulgación abarca además anticuerpos anti-Calidina o des-Arg₁₀-Calidina de la divulgación conjugados con un agente de diagnóstico o terapéutico. Los anticuerpos anti-Calidina o des-Arg₁₀-Calidina se pueden usar de forma diagnóstica para, por ejemplo, controlar el desarrollo o progresión de un trastorno de células inmunitarias (p. ej., CLL) como parte de un procedimiento de prueba clínica para, p. ej., determinar la eficacia de un régimen de tratamiento y/o de prevención determinados. La detección se puede facilitar por acoplamiento de los anticuerpos anti-Calidina o des-Arg₁₀-Calidina a una sustancia detectable. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, materiales radiactivos, metales que emiten positrones usando diversas tomografías de emisión de positrones e iones de metales paramagnéticos no radiactivos. Véase, por ejemplo, la patente de los EE.UU. n.º 4.741.900 para iones metálicos que pueden conjugarse con anticuerpos para su uso como diagnóstico según la presente divulgación. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa; ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, fluorescein-diclorotriazinilamina, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina y aequorina; y ejemplos de material radiactivo adecuado incluyen ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹¹¹In o ⁹⁹Tc.

Los anticuerpos anti-Calidina o des-Arg₁₀-Calidina para uso en los procedimientos de diagnóstico y tratamiento divulgados en el presente documento pueden conjugarse con citotoxinas (tales como radioisótopos, fármacos citotóxicos o toxinas), agentes terapéuticos, agentes citostáticos, toxinas biológicas, profármacos, péptidos, proteínas, enzimas, virus, lípidos, modificadores de la respuesta biológica, agentes farmacéuticos, ligandos inmunológicamente activos (p. ej., linfocinas u otros anticuerpos en los que la molécula resultante se une tanto a la célula neoplásica como a una célula efectora como una célula T) o PEG.

En otra realización, un anticuerpo anti-Calidina o des-Arg₁₀-Calidina para uso en los procedimientos de diagnóstico y tratamiento divulgados en el presente documento puede conjugarse con una molécula que disminuye el crecimiento de células tumorales. En otras realizaciones, las composiciones divulgadas pueden comprender anticuerpos, o fragmentos de los mismos, acoplados a fármacos o profármacos. Todavía otras realizaciones de la presente divulgación comprenden el uso de anticuerpos, o fragmentos de los mismos, conjugados con biotoxinas específicas o sus fragmentos citotóxicos tales como ricina, gelonina, exotoxina de Pseudomonas o toxina de la difteria. La selección de qué anticuerpo conjugado o no conjugado usar dependerá del tipo y estadio del cáncer, del uso de tratamiento complementario (p. ej., quimioterapia o radiación externa) y el estado del paciente. Se comprenderá que un experto en la técnica podría hacer fácilmente tal selección a la vista de las enseñanzas del presente documento.

Se comprenderá que, en estudios previos, los anticuerpos antitumorales marcados con isótopos se han usado con éxito para destruir células tumorales en modelos animales, y en algunos casos en humanos. Radioisótopos ejemplares incluyen: ⁹⁰Y, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹²³I, ¹¹¹In, ¹⁰⁵Rh, ¹⁵³Sm, ⁶⁷Cu, ⁶⁷Ga, ¹⁶⁶Ho, ¹⁷⁷Lu, ¹⁸⁶Re y ¹⁸⁸Re. Los radionucleidos actúan produciendo radiación ionizante que provoca múltiples roturas de cadena en el ADN nuclear, lo que lleva a la muerte celular. Los isótopos utilizados para producir conjugados terapéuticos producen típicamente partículas alfa o beta de alta energía que tienen una longitud de trayecto corta. Dichos radionucleidos destruyen las células con las que se encuentran muy próximos, por ejemplo, las células neoplásicas con las que se ha unido o en las que ha entrado el conjugado. Tienen poco o ningún efecto sobre las células no localizadas. Los radionucleidos son esencialmente no inmunogénicos.

IV. Expresión de anticuerpos anti-Calidina o des-Arg₁₀-Calidina, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos

Después de la manipulación del material genético aislado para proporcionar anticuerpos anti-Calidina o des-Arg₁₀-Calidina de la divulgación como se expuso anteriormente, los genes se insertan típicamente en un vector de expresión para introducción en células anfitrionas que se pueden usar para producir la cantidad deseada de los anticuerpos reivindicados, o fragmentos de los mismos.

El término "vector" o la expresión "vector de expresión" se usa en el presente documento para los fines de la

memoria descriptiva y las reivindicaciones, para referirse a vectores usados de acuerdo con la presente divulgación como un vehículo para introducir y expresar un gen deseado en una célula. Como saben los expertos en la técnica, tales vectores se pueden seleccionar fácilmente del grupo que consiste en plásmidos, fagos, virus y retrovirus. En general, los vectores compatibles con la presente divulgación comprenderán un marcador de selección, sitios de restricción apropiados para facilitar la clonación del gen deseado y la capacidad de entrar y/o replicarse en células eucariotas o procariontas.

Se pueden emplear numerosos sistemas de vectores de expresión para los fines de esta divulgación. Por ejemplo, una clase de vector utiliza elementos de ADN que se derivan de virus animales tales como virus del papiloma bovino, virus del polioma, adenovirus, virus de la viruela vacuna, baculovirus, retrovirus (RSV, MMTV o MOMLV) o virus SV40. Otros implican el uso de sistemas policistrónicos con sitios de unión a ribosomas internos. Además, las células que han integrado el ADN en sus cromosomas se pueden seleccionar introduciendo uno o más marcadores que permitan la selección de células anfitrionas transfectadas. El marcador puede contemplar la prototrofia a un anfitrión auxótrofo, resistencia a biocidas (p. ej., antibióticos) o resistencia a metales pesados tales como cobre. El gen marcador seleccionable se puede unir directamente a las secuencias de ADN que van a ser expresadas, o introducidas en la misma célula mediante cotransformación. También se pueden necesitar elementos adicionales para la síntesis óptima de ARNm. Estos elementos pueden incluir secuencias de señales, señales de empalme, así como promotores transcripcionales, potenciadores y señales de terminación. En realizaciones particularmente preferidas, los genes de la región variable clonada se insertan en un vector de expresión junto con los genes (preferiblemente humanos) de la región constante de la cadena pesada y ligera sintéticos como se discutió anteriormente.

En otras realizaciones preferidas, los anticuerpos anti-Calidina o des-Arg₁₀-Calidina, o fragmentos de los mismos, de la divulgación, se pueden expresar usando construcciones policistrónicas. En tales sistemas de expresión, pueden producirse múltiples productos génicos de interés, tales como cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos, a partir de una única construcción policistrónica. Estos sistemas usan ventajosamente un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) para proporcionar niveles relativamente altos de polipéptidos de la divulgación en células anfitrionas eucariotas. Las secuencias de IRES compatibles se describen en la patente de EE.UU. n.º 6.193.980, que se incorpora en el presente documento por referencia. Los expertos en la materia comprenderán que tales sistemas de expresión se pueden usar para producir de forma eficaz la gama completa de polipéptidos divulgados en la presente solicitud.

Más generalmente, una vez que se ha preparado un vector o secuencia de ADN que codifica un anticuerpo, o un fragmento del mismo, el vector de expresión se puede introducir en una célula anfitriona apropiada. Es decir, las células anfitrionas pueden transformarse. La introducción del plásmido en la célula anfitriona se puede llevar a cabo mediante diversas técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica. Estas incluyen, pero no se limitan a, transfección (que incluye electroforesis y electroporación), fusión de protoplastos, precipitación con fosfato de calcio, fusión celular con ADN con envoltura, microinyección e infección con virus intactos. Véase, Ridgway, A. A. G. "Mammalian Expression Vectors" Capítulo 24.2, pág. 470-472 Vectors, Rodriguez y Denhardt, Eds. (Butterworths, Boston, Mass. 1988). Lo más preferiblemente, la introducción del plásmido en el anfitrión es por electroporación. Las células transformadas se cultivan en condiciones apropiadas para la producción de cadenas ligeras y cadenas pesadas, y se ensayan para la síntesis de proteínas de la cadena pesada y/o ligera. Las técnicas de ensayo ejemplares incluyen un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA) o un análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), inmunohistoquímica y similares.

Como se usa en el presente documento, el término "transformación" se usará en un sentido amplio para referirse a la introducción de ADN en una célula anfitriona receptora que cambia el genotipo y, en consecuencia, da como resultado un cambio en la célula receptora.

En la misma línea, "células anfitrionas" se refiere a células que se han transformado con vectores construidos usando técnicas de ADN recombinante y que codifican al menos un gen heterólogo. En las descripciones de procesos para el aislamiento de polipéptidos a partir de anfitriones recombinantes, el término "célula" y la expresión "cultivo celular" se usan indistintamente para indicar la fuente de anticuerpo a menos que se especifique claramente lo contrario. En otras palabras, la recuperación del polipéptido a partir de las "células" puede significar tanto a partir de células enteras centrifugadas, como a partir del cultivo celular que contiene tanto el medio como las células suspendidas.

En una realización, la línea celular anfitriona utilizada para la expresión del anticuerpo es de origen mamífero; los expertos en la técnica pueden determinar líneas celulares anfitrionas particulares que son las más adecuadas para que el producto génico deseado se exprese en ellas. Ejemplos de líneas celulares anfitrionas incluyen, pero no se limitan a, DG44 y DUXB11 (líneas de Ovario de Hámster Chino, deficiente en DHFR), HELA (carcinoma cervical humano), CV1 (línea de riñón de mono), COS (un derivado de CV1 con antígeno T de SV40), R1610 (fibroblasto de hámster chino), BALBC/3T3 (fibroblasto de ratón), HAK (línea de riñón de hámster), SP2/O (mieloma de ratón), BFA-1c1BPT (células endoteliales bovinas), RAJI (linfocito humano) y 293 (riñón humano). En una realización, la línea celular contempla una glucosilación alterada, p. ej., afucosilación, del anticuerpo expresado a partir de la misma (p. ej., líneas celulares PER.C6.RTM (Crucell) o de CHO con FUT8 suprimido (Potelligent.RTM. Cells) (Biowa, Princeton, NJ)). En una realización se pueden usar células NS0. Se prefieren particularmente las células de CHO.

Las líneas celulares anfitrionas están típicamente disponibles a partir de los servicios comerciales, la American Tissue Culture Collection o a partir de la documentación publicada.

La producción *in vitro* permite la ampliación para dar grandes cantidades de los polipéptidos deseados. Las técnicas para el cultivo de células de mamífero en condiciones de cultivo de tejidos son conocidas en la técnica e incluyen un cultivo en suspensión homogéneo, p. ej., en un reactor de levantamiento por aire o en un reactor de agitación continua, o cultivo celular inmovilizado o atrapado, p. ej., en fibras huecas, microcápsulas, en microperlas de agarosa o cartuchos cerámicos. Si es necesario y/o si se desea, las soluciones de polipéptidos pueden purificarse mediante los procedimientos de cromatografía habituales, por ejemplo, filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía sobre celulosa DEAE y/o cromatografía de (inmuno)-afinidad.

Los genes que codifican los anticuerpos anti-Calidina o des-Arg₁₀-Calidina, o fragmentos de los mismos, de la divulgación, también se pueden expresar células no de mamífero tales como bacterias o levaduras o células vegetales. A este respecto, se comprenderá que también pueden transformarse diversos microorganismos unicelulares no mamíferos, tales como bacterias; es decir, aquellos capaces de crecer en cultivos o fermentación. Las bacterias, que son susceptibles de transformación, incluyen miembros de Enterobacteriaceae, tales como cepas de *Escherichia coli* o *Salmonella*; Bacillaceae, tal como *Bacillus subtilis*; *Pneumococcus*; *Streptococcus* y *Haemophilus influenzae*. Se comprenderá además que, cuando se expresan en bacterias, los polipéptidos pueden formar parte de los cuerpos de inclusión. Los polipéptidos se deben aislar, purificar y después ensamblar en moléculas funcionales.

Además de procariontes, también se pueden usar microbios eucariotas. *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura de panadería común, es el más comúnmente utilizado entre los microorganismos eucariotas, aunque otras diversas cepas están comúnmente disponibles. Para la expresión en *Saccharomyces*, se usa normalmente el plásmido YRp7, por ejemplo, (Stinchcomb y col., *Nature*, 282:39 (1979); Kingsman y col., *Gene*, 7: 141 (1979); Tschemper y col., *Gene*, 10:157 (1980)). Este plásmido ya contiene el gen TRP1 que proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC n.º 44076 o PEP4-1 (Jones, *Genetics*, 85:12 (1977)). La presencia de la lesión *trp1* como una característica del genoma de la célula anfitriona de levadura proporciona entonces un entorno eficaz para detectar la transformación por crecimiento en ausencia de triptófano.

V. Formulaciones farmacéuticas y procedimientos de administración de anticuerpos anti-Calidina o des-Arg₁₀-Calidina.

En otro aspecto, la divulgación proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo anti-Calidina o des-Arg₁₀-Calidina, o fragmento del mismo.

Los procedimientos para preparar y administrar a un sujeto anticuerpos de la divulgación, o fragmentos de los mismos, son bien conocidos o están fácilmente determinados por los expertos en la técnica. La ruta de administración de los anticuerpos de la divulgación, o fragmentos de los mismos, puede ser oral, parenteral, por inhalación o tópica. El término parenteral como se usa en el presente documento incluye administración intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, rectal o vaginal. En general, se prefieren las formas intravenosa, intraarterial, subcutánea e intramuscular de administración parenteral. Si bien todas estas formas de administración se contemplan claramente dentro del alcance de la divulgación, una forma de administración sería una solución para inyección, en particular para inyección o goteo intravenoso o intraarterial. Habitualmente, una composición farmacéutica adecuada para inyección puede comprender un tampón (p. ej., tampón de acetato, fosfato o citrato), un tensioactivo (p. ej., polisorbato), opcionalmente un agente estabilizador (p. ej., albúmina humana), etc. Sin embargo, en otros procedimientos compatibles con las enseñanzas en el presente documento, los polipéptidos se pueden suministrar directamente en el sitio de la población celular adversa, aumentando de ese modo la exposición del tejido enfermo al agente terapéutico.

Las preparaciones para administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas estériles. Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, soluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, que incluyen solución salina y medios tamponados. En la divulgación del tema, los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, tampón fosfato 0,01-0,1 M y preferiblemente 0,05 M o solución salina al 0,8%. Otros vehículos parenterales frecuentes incluyen soluciones de fosfato sódico, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico, lactato de Ringer o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen reabastecedores de fluidos y nutrientes, reabastecedores de electrolitos, tales como los basados en dextrosa de Ringer y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, agentes antimicrobianos, antioxidantes, quelantes y gases inertes y similares. Más particularmente, las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (cuando son solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En tales casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista facilidad de inyección. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento, y preferiblemente se conservará frente a la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua,

etanol, poliol (p. ej., glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos se puede lograr mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol o cloruro sódico en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede realizarse incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

En cualquier caso, las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando un compuesto activo (p. ej., un anticuerpo solo o en combinación con otros agentes activos) en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados en el presente documento, según sea necesario, seguido de esterilización por filtrado. En general, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril, que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos preferidos de preparación son secados en vacío y liofilización, que produce un polvo de un ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una solución previamente filtrada estéril del mismo. Las preparaciones para inyecciones se procesan, se introducen en recipientes tales como ampollas, bolsas, frascos, jeringas o viales, y se sellan en condiciones asépticas según procedimientos conocidos en la técnica. Además, las preparaciones pueden envasarse y venderse en forma de un kit tal como los descritos en la publicación de EE.UU. n.º 2002/0102208 que se incorpora en el presente documento por referencia. Dichos artículos de fabricación tendrán preferiblemente etiquetas o prospectos que indiquen que las composiciones asociadas son útiles para tratar a un sujeto que padece o está predispuesto a trastornos autoinmunes o neoplásicos.

Las dosis eficaces de los anticuerpos estabilizados, o fragmentos de los mismos, de la presente divulgación, para el tratamiento de las afecciones descritas anteriormente varían dependiendo de muchos factores diferentes, incluidos los medios de administración, el sitio diana, el estado fisiológico del paciente, si el paciente es humano o un animal, otros medicamentos administrados y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Habitualmente, el paciente es un ser humano, pero también pueden ser tratados mamíferos no humanos que incluyen mamíferos transgénicos. Las dosis de tratamiento se pueden titular usando procedimientos de rutina conocidos por los expertos en la técnica para optimizar la seguridad y la eficacia.

Para inmunización pasiva con un anticuerpo de la divulgación, la dosificación puede variar, p. ej., de aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg, y más habitualmente de 0,01 a 5 mg/kg (p. ej., 0,02 mg/kg, 0,25 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,75 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, etc.) del peso corporal del anfitrión. Por ejemplo, las dosificaciones pueden ser 1 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal o dentro del intervalo de 1-10 mg/kg, preferiblemente al menos 1 mg/kg. También se pretende que las dosis intermedias en los intervalos anteriores estén dentro del alcance de la divulgación.

Los sujetos pueden ser administrados con tales dosis diariamente, en días alternos, semanalmente o según cualquier otro calendario determinado por análisis empírico. Un tratamiento ejemplar implica la administración en múltiples dosis durante un período prolongado, por ejemplo, de al menos seis meses. Los regímenes de tratamiento ejemplares adicionales implican la administración una vez cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada 3 a 6 meses. Los calendarios de dosificación ilustrativos incluyen 1-10 mg/kg o 15 mg/kg en días consecutivos, 30 mg/kg en días alternos o 60 mg/kg semanalmente. En algunos procedimientos, dos o más anticuerpos monoclonales con diferentes especificidades de unión se administran simultáneamente, en cuyo caso la dosificación de cada anticuerpo administrado puede caer dentro de los intervalos indicados.

Los anticuerpos de la divulgación, o fragmentos de los mismos, se pueden administrar en múltiples ocasiones. Los intervalos entre dosis únicas pueden ser, p. ej., diarios, semanales, mensuales o anuales. Los intervalos también pueden ser irregulares, como se indica midiendo los niveles sanguíneos de polipéptido o molécula diana en el paciente. En algunos procedimientos, la dosificación se ajusta para alcanzar una determinada concentración de anticuerpo o toxina en plasma, p. ej., 1-1.000 ug/ml o 25-300 ug/ml. Alternativamente, los anticuerpos, o fragmentos de los mismos, se pueden administrar como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. La dosis y la frecuencia varían dependiendo de la semivida del anticuerpo en el paciente. En general, los anticuerpos humanizados muestran la semivida más larga, seguida de anticuerpos quiméricos y anticuerpos no humanos. En una realización, los anticuerpos de la divulgación, o fragmentos de los mismos, se pueden administrar en forma no conjugada. En otra realización, los anticuerpos de la divulgación se pueden administrar múltiples veces en forma conjugada. En otra realización más, los anticuerpos de la divulgación, o fragmentos de los mismos, se pueden administrar en forma no conjugada, luego en forma conjugada, o viceversa.

La dosificación y la frecuencia de administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, las composiciones que contienen los presentes anticuerpos o un cóctel de los mismos se administran a un paciente que aún no se encuentra en el estado de enfermedad para potenciar la resistencia del paciente. Dicha cantidad se define como una "dosis eficaz profiláctica". En este uso, las cantidades precisas dependen nuevamente del estado de salud y la inmunidad general del paciente, pero generalmente varían

de 0,1 a 25 mg por dosis, especialmente de 0,5 a 2,5 mg por dosis. Se administra una dosificación relativamente baja a intervalos relativamente poco frecuentes durante un largo período de tiempo. Algunos pacientes continúan recibiendo tratamiento por el resto de sus vidas.

5 En aplicaciones terapéuticas, a veces se requiere una dosificación relativamente alta (p. ej., de aproximadamente 1 a 400 mg/kg de anticuerpo por dosis, con dosis de 5 a 25 mg se usan más frecuentemente para radioinmunoconjugados y dosis más altas para moléculas conjugadas citotoxina-fármaco) a intervalos relativamente cortos hasta que la progresión de la enfermedad se reduce o termina, y preferiblemente hasta que el paciente muestra una mejoría parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. A partir de entonces, la patente puede ser administrada en régimen profiláctico.

10 En una realización, un sujeto puede ser tratado con una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de la divulgación (p. ej., en un vector). Las dosis para ácidos nucleicos que codifican polipéptidos varían de aproximadamente 10 ng a 1 g, 100 ng a 100 mg, 1 ug a 10 mg o 30-300 ug de ADN por paciente. Las dosis para vectores víricos infecciosos varían de 10-100, o más, viriones por dosis.

15 Los agentes terapéuticos se pueden administrar por medios parenterales, tópicos, intravenosos, orales, subcutáneos, intraarteriales, intracraneales, intraperitoneales, intranasales o intramusculares para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico. La inyección intramuscular o infusión intravenosa se prefieren para la administración de un anticuerpo de la divulgación. En algunos procedimientos, los anticuerpos terapéuticos, o fragmentos de los mismos, se inyectan directamente en el cráneo. En algunos procedimientos, los anticuerpos, o fragmentos de los mismos, se administran como una composición o dispositivo de liberación sostenida, tal como un dispositivo Medipad®.

20 Los agentes de la divulgación pueden ser administrados opcionalmente en combinación con otros agentes que son eficaces en el tratamiento del trastorno o afección que necesitan tratamiento (p. ej., profiláctico o terapéutico). Los agentes adicionales preferidos son aquellos que se reconocen en la técnica y se administran de manera estándar para un trastorno particular.

25 Las dosificaciones eficaces de tratamiento único (es decir, cantidades terapéuticamente eficaces) de anticuerpos de la divulgación marcados con ⁹⁰Y varían de aproximadamente 5 a aproximadamente 75 mCi, más preferiblemente entre aproximadamente 10 y aproximadamente 40 mCi. Las dosificaciones ablativas no medulares de un solo tratamiento eficaces de anticuerpos marcados con ¹³¹I varían de aproximadamente 5 a aproximadamente 70 mCi, más preferiblemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 40 mCi. Las dosificaciones ablativas de un solo tratamiento eficaces (es decir, pueden requerir trasplante de médula ósea autóloga) de anticuerpos marcados con ¹³¹I varían entre aproximadamente 30 y aproximadamente 600 mCi, más preferiblemente entre aproximadamente 50 y menos de aproximadamente 500 mCi. En combinación con un anticuerpo modificado químicamente, debido a la semivida circulante más larga frente a anticuerpos de murino, dosificaciones ablativas no medulares de un solo tratamiento eficaces de anticuerpos quiméricos marcados con yodo-¹³¹ varían entre aproximadamente 5 y 30 mCi, más preferiblemente menos de aproximadamente 30 mCi. Los criterios de imagenología para, p. ej., la marca ¹¹¹In, son típicamente menores que aproximadamente 5 mCi.

35 Aunque se ha adquirido una gran experiencia clínica con ¹³¹I y ⁹⁰Y, en la técnica se conocen otras radiomarcas y se han usado para fines similares. Todavía otros radioisótopos se usan para imagenología. Por ejemplo, los radioisótopos adicionales que son compatibles con el alcance de la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a, ¹²³I, ¹²⁵I, ³²P, ⁵⁷Co, ⁶⁴Cu, ⁶⁷Cu, ⁷⁷Br, ⁸¹Rb, ⁸¹Kr, ⁸⁷Sr, ¹¹³In, ¹²⁷Cs, ¹²⁹Cs, ¹³²I, ¹⁹⁷Hg, ²⁰³Pb, ²⁰⁶Bi, ¹⁷⁷Lu, ¹⁸⁶Re, ²¹²Pb, ²¹²Bi, ⁴⁷Sc, ¹⁰⁵Rh, ¹⁰⁹Pd, ¹⁵³Sm, ¹⁸⁸Re, ¹⁹⁹Au, ²²⁵Ac, ²¹¹A ²¹³Bi. A este respecto, los emisores alfa, gamma y beta son compatibles dentro de la presente divulgación. Además, a la vista de la presente divulgación, se presenta que un experto en la técnica podría determinar fácilmente qué radionucleidos son compatibles con un curso de tratamiento seleccionado sin excesiva experimentación. Con este fin, los radionucleidos adicionales que ya se han utilizado en el diagnóstico clínico incluyen ¹²⁵I, ¹²³I, ⁹⁹Tc, ⁴³K, ⁵²Fe, ⁶⁷Ga, ⁶⁸Ga, así como ¹¹¹In. Los anticuerpos también se han marcado con diversos radionucleidos para su posible uso en inmunoterapia dirigida (Peirersz y col., Immunol. Cell Biol. 65: 111-125 (1987)). Estos radionucleidos incluyen ¹⁸⁸Re y ¹⁸⁶Re, así como ¹⁹⁹Au y ⁶⁷Cu en menor medida. La patente de EE.UU. n.º 5.460.785 proporciona datos adicionales con respecto a tales radioisótopos y se incorpora en el presente documento por referencia.

40 Como se comentó previamente, los anticuerpos de la divulgación, o fragmentos de los mismos, se pueden administrar en una cantidad farmacéuticamente eficaz para el tratamiento *in vivo* de trastornos de mamíferos. A este respecto, se comprenderá que los anticuerpos descritos, o fragmentos de los mismos, se formularán para facilitar la administración y fomentar la estabilidad del agente activo. Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente divulgación comprenden un vehículo estéril, no tóxico y farmacéuticamente aceptable tal como solución salina fisiológica, tampones no tóxicos, conservantes y similares. Para los fines de la presente aplicación, una cantidad farmacéuticamente eficaz de un anticuerpo de la divulgación, conjugado o no conjugado con un agente terapéutico, se considerará una cantidad suficiente para lograr la unión eficaz a una diana y obtener un beneficio, p. ej., mejorar los síntomas de una enfermedad o trastorno o detectar una sustancia o una célula. En el caso de células tumorales, el polipéptido será preferiblemente capaz de interactuar con antígenos inmunorreactivos seleccionados sobre células neoplásicas o inmunorreactivas y contemplar un aumento en la muerte de esas células.

Por supuesto, las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación se pueden administrar en dosis únicas o múltiples para contemplar una cantidad farmacéuticamente eficaz del polipéptido.

Según el alcance de la presente divulgación, los anticuerpos de la divulgación pueden administrarse a un ser humano u otro animal según los procedimientos de tratamiento mencionados anteriormente en una cantidad suficiente para producir un efecto terapéutico o profiláctico. Los polipéptidos de la divulgación se pueden administrar a dicho ser humano u otro animal en una forma de dosificación convencional preparada combinando el anticuerpo de la divulgación con un vehículo o diluyente convencional farmacéuticamente aceptable según técnicas conocidas. Un experto en la técnica comprenderá que la forma y el carácter del vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable viene dictado por la cantidad de ingrediente activo con el que se va a combinar, la vía de administración y otras variables bien conocidas. Los expertos en la técnica comprenderán además que un cóctel que comprenda una o más especies de polipéptidos según la presente divulgación puede demostrar ser particularmente eficaz.

VI. Procedimientos para tratar la enfermedad o trastornos asociados a Calidina o des-Arg₁₀-Calidina

Los anticuerpos anti-Calidina o des-Arg₁₀-Calidina, o fragmentos de los mismos, de la divulgación son útiles como antagonistas de la actividad de Calidina o des-Arg₁₀-Calidina. Según esto, en otro aspecto, la divulgación proporciona procedimientos para tratar enfermedades o trastornos asociados con Calidina o des-Arg₁₀-Calidina administrando a un sujeto que lo necesite una composición farmacéutica que comprende uno o más anticuerpos anti-Calidina o des-Arg₁₀-Calidina de la divulgación, o fragmento de unión a antígeno de los mismos.

Las enfermedades o trastornos asociados con Calidina o des-Arg₁₀-Calidina susceptibles de tratamiento incluyen, sin limitación, afecciones fisiopatológicas tales como inflamación, trauma, quemaduras, conmoción, alergia, dolor agudo o crónico, y fibrosis, p. ej., fibrosis renal. En ciertas realizaciones ejemplares, los anticuerpos de la divulgación se pueden generar para tratar la fibrosis renal y la lesión renal aguda asociada, así como las enfermedades renales crónicas que son las principales causas de insuficiencia renal terminal.

Un experto en la técnica podría, mediante experimentación rutinaria, determinar qué cantidad eficaz de anticuerpo no tóxico (o agente terapéutico adicional) tendría el objeto de tratar una enfermedad o trastorno asociado a Calidina o des-Arg₁₀-Calidina. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente activa de un polipéptido puede variar según factores tales como la fase de la enfermedad (p. ej., fase I frente a fase IV), edad, sexo, complicaciones médicas (p. ej., afecciones o enfermedades inmunosupresoras) y peso del sujeto, y la capacidad del anticuerpo para provocar una respuesta deseada en el sujeto. El régimen de dosificación puede ajustarse para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, diariamente pueden administrarse varias dosis divididas, o la dosis puede reducirse proporcionalmente según lo indicado por las exigencias de la situación terapéutica. En general, sin embargo, se espera que una dosificación eficaz esté en el intervalo de aproximadamente 0,05 a 100 miligramos por kilogramo de peso corporal y día y más preferiblemente desde aproximadamente 0,5 a 10 miligramos por kilogramo de peso corporal y día.

VII. Ejemplificación

La divulgación proporciona adicionalmente los siguientes ejemplos que no deben interpretarse como una limitación adicional.

Además, según la presente divulgación, se pueden emplear biología molecular convencional, microbiología y técnicas de ADN recombinante dentro de la experiencia de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase, p. ej., Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edición (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (en el presente documento "Sambrook y col., 1989"); *DNA Cloning: A Practical Approach*, Volúmenes I y II (D.N. Glover ed., 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait ed. 1984); *Nucleic Acid Hybridization* [B.D. Hames y S.J. Higgins eds. (1985)]; *Transcription And Translation* [B.D. Hames y S.J. Higgins, eds. (1984)]; *Animal Cell Culture* [R.I. Freshney, ed. (1986)]; *Immobilized Cells And Enzymes* [IRL Press, (1986)]; B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); F.M. Ausubel y col. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (1994).

Ejemplo 1: producción de hibridoma: Inmunización de ratones con péptido de Calidina conjugado con KLH y generación de anticuerpos contra ligandos BKR1 humanos

El objetivo fue desarrollar anticuerpos de reacción cruzada contra Calidina (KD, SEQ ID NO: 1) y des-arg-Calidina (DAKD; SEQ ID NO: 2) que inhibirían estos ligandos que se unen al BKR1 humano. En general, la inmunización de ratones con KD conjugado con KLH a través de cisteínas adicionales en el C- o N-terminal del péptido se usó para obtener esplenocitos de ratón para la fusión con líneas celulares de mieloma de ratón como socio de fusión para producir los hibridomas.

En resumen, el protocolo de inmunización fue el siguiente: Ratones BALB/c (hembras sin tratamiento de 8-20 semanas de vida) se inmunizaron intraperitonealmente con una mezcla de cantidades uniformes de KLH-KD y KD-KLH en solución salina tamponada con fosfato (PBS) como un antígeno total de 100 ug por ratón mezclado en proporción de 1:1 de Sigma Adjuvant System (Sigma cat. #6322) en un volumen total de 200 µl por ratón (día 0). El día 21, los ratones se reforzaron con una mezcla de cantidades uniformes de KLH-KD y KD-KLH en PBS como un

antígeno total de 50 ug por ratón mezclado en proporción de 1:1 de Sigma Adjuvant System (Sigma cat. n.º 6322) en un volumen total de 200 µl por ratón. El día 30, se recogieron muestras de sangre para la evaluación del título de anticuerpo específico de KD. El día 51, los ratones se reforzaron para fusión con una mezcla de cantidades uniformes de KLH-KD y KD-KLH en PBS como un antígeno total de 50 ug por ratón mezclado en proporción de 1:1 de Sigma Adjuvant System (Sigma cat. #6322) en un volumen total de 200 µl por ratón. En el día 55, los ratones fueron sacrificados mediante cámara de CO₂, se recogió sangre a través de punción cardíaca y se recogió el bazo para la producción de hibridoma.

Se hicieron hibridomas fusionando células de mieloma de ratón que son deficientes en adenosina fosforribosiltransferasa (APRT) con células del bazo de ratones inmunizados con antígenos específicos. Un sistema de selección que utiliza medio HAT (hipoxantina, azaserina y timidina) elimina todas las células de fusión excepto las que son APRT+. Los hibridomas satisfactorios deben retener también la cadena pesada de inmunoglobulina (Igh), uno de los loci de la cadena ligera de inmunoglobulina y secretar un anticuerpo funcional.

El medio de producción de hibridoma (IMDM) se preparó combinando lo siguiente: 500 ml de medio de Dulbecco de Iscove Modificado (HyClone SH30259.01), 50 ml de suero fetal bovino (HyClone SH30070.03), 5 ml de L-glutamina (Gibco Invitrogen cat. #25030), 5 ml de aminoácidos no esenciales (Gibco Invitrogen cat. #11140050), 5 ml de piruvato sódico (Gibco Invitrogen cat. #11360070), 5 ml de penicilina-estreptomicina al 0,1% (Gibco Invitrogen cat. #15140148). El medio fue filtrado antes de su uso. El medio de expansión se preparó combinando lo siguiente: 1.000 ml de medio exento de suero (Gibco Hybridoma SFM # 12045), 100 ml de HyClone SuperLow IgG al 10 % definido FBS # SH30898.03 y 10 ml de penicilina/estreptomicina. El medio de congelación fue 45 ml de FBS desactivado por calor (HyClone SH30070.03) y 5 ml de DMSO, esterilizado en filtro. Otros materiales incluyeron lo siguiente: HAT (50x) se obtuvo de Sigma-Aldrich (# HO262); Suplemento de fusión y clonación de hibridoma (50x) (Roche Diagnostics 11 363 735 001); Mancha con azul tripán al 0,4% (Invitrogen cat. # 15250-061 o T10282); PEG 1500 en Hepes 75 mM al 50 % peso/vol. (Roche cat. # 783641 (10783641001)). Todos los reactivos excepto HAT y el suplemento de fusión de hibridoma y de clonación se usaron a 37 °C.

Tabla 2. Reactivos peptídicos utilizados en inmunización y cribado

Péptido N.º.	SEQ ID NO.	Secuencia de péptidos	Nombre del péptido	Nombre Alternativo
1	5	RPPGFSPFR	bradicinina	BK
2	70	biotina-RPPGFSPFR		b-BK
3	71	RPPGFSPFR-biotina		BK-b
4	72	KLH-RPPGFSPFR		KLH-BK
5	73	RPPGFSPFR-KLH		BK-KLH
6	1	KRPPGFSPFR	calidina	KD
7	74	biotina-KRPPGFSPFR		b-KD
8	75	KRPPGFSPFR-biotina		KD-b
9	76	KLH-KRPPGFSPFR		KLH-KD
10	77	KRPPGFSPFR-KLH		KD-KLH
11	6	RPPGFSPF	Des-Arg ⁹ -bradicinina	DABK
12	78	biotina-RPPGFSPF		b-DABK
13	79	RPPGFSPF-biotina		DABK-b
14	80	KLH-RPPGFSPF		KLHDABK
15	81	RPPGFSPF-KLH		DABK-KLH

Péptido N.º.	SEQ ID NO.	Secuencia de péptidos	Nombre del péptido	Nombre Alternativo
16	2	KRPPGFSPF	Des-Arg ₁₀ -calidina	DAKD
17	82	biotina-KRPPGFSPF		b-DAKD
18	83	KRPPGFSPF-biotina		DAKD-b
19	84	KLH-KRPPGFSPF		KLH-DAKD
20	85	KRPPGFSPF-KLH		DAKD-KLH
21	3	RRPPGFSPFR	Péptido similar a la Calidina	KLP
22	86	biotina-RRPPGFSPFR		b-KLP
23	87	RRPPGFSPFR-biotina		KLP-b
24	88	KLH-RRPPGFSPFR		KLH-KLP
25	89	RRPPGFSPFR-KLH		KLP-KLH
26	90	RRPPGFSPF	Péptido similar a des-Arg ₁₀ -calidina	DAKLP
27	91	biotina-RRPPGFSPF		b-DAKLP
28	92	RRPPGFSPF-biotina		DAKLP-b
29	93	KLH-RRPPGFSPF		KLH-DAKLP
30	94	RRPPGFSPF-KLH		DAKLP-b
31	95	RPPGF	bradicinina 1-5	BK15
32	96	biotina-RPPGF		b-BK15

5 En resumen, tres o cuatro días antes de la fusión, el ratón se reforzó con un antígeno de interés de forma intraperitoneal o intravenosa. El día de la fusión, el ratón fue sacrificado en la cámara de CO₂, se recogió sangre mediante punción cardíaca y se extrajo el bazo y se colocó en 10 ml de IMDM exento de suero en una placa de Petri. El mieloma de células socios de fusión: FO (ATCC ref. CRL-1646)/X63 Ag8.653 (ATCC ref. CRL1580) se cultivaron en una fase logarítmica, luego se dividieron un día antes de la fusión (1:2 y 1:5), y se recogieron en tubos de centrífuga de 20 ml, se centrifugaron y el sedimento se resuspendió en 10 ml de IMDM. El sedimento se lavó dos veces con medio IMDM exento de suero. Todas las centrifugaciones se realizan a 1.570 rpm durante 5 min. La resuspensión final fue en 10 ml de IMDM exento de suero. El tejido conectivo se diseccionó fuera del bazo. El bazo se inyectó con 1 ml de IMDM exento de suero precalentado a 37 °C mediante una jeringa de 1 ml y una aguja de calibre 25. Los esplenocitos se extraen del recubrimiento fibroelástico mediante fórceps y se lavan dos veces en 10 ml de IMDM exento de suero (incluido el centrifugado inicial) y se resuspendieron en 10 ml de IMDM exento de suero. Las células se contaron en un Contador de Células Automático Countess.

15 Se combinaron células socios de fusión y esplenocitos en un tubo de 50 ml en una relación de 1:2 a 1:10 (por número de células) y se centrifugaron a 970 rpm durante 10 minutos (centrifugado lento) para formar un sedimento suelto. Después del centrifugado "lento", se extrajo el sobrenadante con la precaución de no alterar el sedimento, pero se minimizó la cantidad de líquido sobre las células para no diluir el PEG 1500. El último medio restante se reservó y se volvió a agregar después de que el PEG se agregó (más adelante). Se añadió PEG 1500 precalentado (37 °C, un total de 1 ml) gota a gota al sedimento celular durante un período de tiempo de 1 minuto y las células se mezclaron después de que se añadiera cada gota de PEG. El sedimento se incubó con PEG durante 1 minuto más, seguido de la adición de 10 ml de medio IMDM exento de suero durante 1 minuto, de modo que el primer 1 ml de cada 10 se añadió durante 30 segundos. Las células se sometieron a centrifugación lenta a 970 rpm durante 10

minutos y el sobrenadante se decantó. En cubetas (2) de 100 ml, se añadió lo siguiente: 70 ml de IMDM con 10 % de FBS, 2 ml de HAT y 2 ml de hibridoma y Suplemento de Clonación con Fusión. Las células se resuspendieron en 10 ml de IMDM con 10 % de SFB y se dividieron en tubos (2) de 50 ml (5 ml de células/tubo) y se añadieron 25 ml de IMDM con 10 % de FBS. Los 30 ml resultantes se transfirieron a las cubetas que contenían 70 ml de HBSS/HAT/suplemento de clonación y 200 µl de células/pocillo se pipetearon en placas (10) de 96 pocillos. La fusión estaba lista para el cribado mediante ELISA (50 µl) aproximadamente de 10 a 14 días después, o cuando el medio en los pocillos se vuelve amarillo. Después del cribado primario, los clones positivos se seleccionan, se numeran y se trasladan a una placa de 24 pocillos en 500 µl por pocillo de IMDM con 10% de FBSH. Los sobrenadantes de hibridoma se cribaron mediante ELISA sobre placas de estreptavidina recubiertas con péptidos biotinilados N- y C-terminales (véase a continuación).

Ejemplo 2: Caracterización y selección de hibridomas que expresan anticuerpos contra ligandos BKR1 humanos

Los sobrenadantes de hibridoma se cribaron mediante ELISA sobre estreptavidina recubierta en placas con péptidos biotinilados N- y C-terminales (véanse, p. ej., los expuestos en la Tabla 2) y luego se determinaron las cinéticas de unión de anticuerpos para clones de hibridoma positivos confirmados.

La capacidad de los anticuerpos en sobrenadantes de hibridoma para unirse al péptido ligando de BKR1 se evaluó con un ensayo ELISA. Se recubrieron péptidos DAKD-biotina o KD-biotina en una placa SA de 96 pocillos en tampón de solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante una hora a temperatura ambiente a 5 µg/ml, y se bloquearon los sitios de unión no específicos con seroalbúmina bovina al 1% (BSA) en tampón PBS. Esta placa se usó para realizar el cribado primario y secundario de los sobrenadantes de hibridoma en crudo. Se añadieron sobrenadantes de hibridoma a las placas para unirse a los péptidos KD o DAKD recubiertos. Después de 1 hora de incubación, la placa se lavó y los anticuerpos unidos se detectaron usando anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (HRP-IgG (H+L) anti-ratón de cabra: Jackson ImmunoResearch Labs # 115-035-166) y se desarrolló usando sustrato de 2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS) (Roche Diagnostics #11 204 521 001). Los datos se analizaron usando Excel. Los anticuerpos que muestran señales positivas (2 veces más alta que la señal de ELISA de dilución de suero 1:10.000) se seleccionaron y se volvieron a cribar por duplicado para confirmación. Los clones de hibridoma positivos confirmados se seleccionaron y se sometieron a la calificación de la velocidad de disociación de la unión por Biacore.

Para la cinética de unión a anticuerpo, los instrumentos utilizados fueron BIACORE 2000 o BIACORE 3000 (GE Healthcare), diseñados para análisis de interacción biomolecular (BIA) en tiempo real. El chip sensor utilizado fue un chip SA (GE Healthcare) con estreptavidina inmovilizada de forma covalente en una matriz de dextrano carboximetilada. Cada chip sensor tiene cuatro celdas de flujo (Fc) paralelo. Todos los péptidos ligandos biotinilados BKR1 o BKR2 se inmovilizaron en una de las celdas de flujo 2 a 4 (Fc2 a Fc4) en el chip SA para el cribado de la velocidad de disociación de la unión y el cribado de selectividad. La celda de flujo 1 (Fc1) se reservó e inmovilizó con un péptido aleatorio (biotinilado en un extremo) con una longitud de péptido igual o casi igual en comparación con los péptidos de ligando de prueba como control negativo. En los ensayos de cribado, los sobrenadantes de los cultivos celulares de los clones de hibridoma seleccionados mediante cribado primario de variantes humanizadas expresadas transitoriamente se inyectaron sobre péptidos inmovilizados. También se inyectó medio de cultivo celular de hibridoma sobre la superficie del chip como blanco para establecer una línea referencia. Después de restar las señales de Fc1 y las pasadas del tampón en blanco, la velocidad de disociación de los anticuerpos de los sobrenadantes para cada péptido se analizó y se calificó usando el software BIAevaluation. Solamente los clones de anticuerpo que mostraron una velocidad de disociación de unión superior ($kd < 10^{-4}$ 1/s) se seleccionaron para subclonación y caracterización adicional. En el análisis cinético, los correspondientes biotina-péptidos identificados en el cribado del anticuerpo de ensayo se inmovilizaron en Fc2 a Fc4 mientras Fc1 con un péptido aleatorio usado como celda de referencia. Cada anticuerpo purificado seleccionado de los cribados se hicieron en una serie diluyendo dos veces en tampón de migración (1 x tampón HBS-EP, GE Healthcare) entre 0,1 y 10 nM. La velocidad de asociación de unión, la velocidad de disociación y la afinidad global se calcularon en BIAevaluation. La cinética de unión a anticuerpo para cada anticuerpo se confirmó siempre en ensayos por triplicado usando Biacore.

Un total de 8 ratones se inmunizaron con KLH-KD/KD-KLH y KLH-DAKD/DAKD-KLH mezclados y los bazos se fusionaron usando los protocolos anteriores. Después del cribado primario de aproximadamente 7.680 clones de hibridoma en ELISA con DAKD-biotina y KD-biotina, solo se confirmaron 76 clones positivos y se seleccionaron para la calificación de la velocidad de disociación de la unión en Biacore 3000/2000 sobre la DAKD-biotina y KD-biotina inmovilizadas en chips de Streptavidina (SA). Entre ellos, 8 clones de hibridoma con velocidad de disociación de unión \leq de 10^{-4} se subclonaron, secuenciaron, purificaron y caracterizaron adicionalmente (véase la Tabla 3).

Tabla 3: Resultados de inmunización con KLH-KD/KD-KLH y KLH-DAKD/DAKD-KLH

Ligando	Péptido usado en el ensayo	Ensayo	ID del clon							
			B21	C63	F151	F306	I2	I8	I22**	I54**
DAKD	b-DAKD	ELISA	+	+	-	-	+	+	+	+
		Biacore (KD,M)	-	-	-	-	-	-	NS	NS
	DAKD-b	ELISA	+	+	+	+	+	+	+	+
		Biacore (KD,M)	4,15 E-11	1,42 E-10	1,60 E-10	1,60 E-10	1,10 E-10	6,25 E-10	NTD	NTD
	DAKD (50 nM)	FLIPR (nM)	22-25,9	-	6,9	6,9			9,4	8,1
	DABK	b-DABK	ELISA	+/-	+/-	-	-	+	+	+
Biacore (KD,M)			-	-	-	-	-	-	NS	NS
DABK-b		ELISA	+	+/-	-	-	+	+	+	+
		Biacore (KD,M)	-.*	-	-	-	-	-	NS	NS
DABK		FLIPR (nM)								

ES 2 673 869 T3

Ligando	Péptido usado en el ensayo	Ensayo	ID del clon							
			B21	C63	F151	F306	I2	I8	I22**	I54**
BK	b-BK	ELISA	-	-	-	-	-	-	-	-
		Biacore (KD,M)	-	-	-	-	-	-	NS	NS
	BK-b	ELISA	+	-	-	-	+	+	+	+
		Biacore (KD,M)	8,57 E-09	-	-	-	-	-	NS	NS
	BK	FLIPR (nM)	-	-	-	-				
	KD	b-KD	ELISA	+	-	-	-	-	-	-
Biacore (KD,M)			-	-	-	-	-	-	NS	NS
KD-b		ELISA	+	+	+	+	+	+	+	+
		Biacore (KD,M)	8,4 E-11	2,21 E-10	2,9 E-11	2,9 E-11	7,8 E-11	7,53 E-10	NTD	NTD
KD (15nM)M)		FLIPR (nM)	12	-	3,0	3,0	7,3	8,3	25	30
NA = no aplicable, negativo en ELISA NS = unión no específica NTD = no se determinó -* = unión residual (baja RU en Biacore)										

Basado en los resultados observados en la Tabla 3, se seleccionaron cinco clones con secuencias únicas para estudios cinéticos. Estos anticuerpos eran muy selectivos para las uniones DAKD-biotina, KD-biotina, DAKLP-biotina y KLP-biotina (véase la Tabla 4). No se unen a otros péptidos de cinina ni a péptidos biotinilados en el N-terminal.

Tabla 4. Resumen de la cinética de los candidatos de anticuerpos anti-DAKD/KD seleccionados

Anticuerpo	DAKD-b		KD-b	
	K_{dis}	KD	K_{dis}	KD
C63	9,36E-05	1,42E-10	1,00E-04	2,21E-10
B21	9,89E-05	4,15E-11	2,04E-04	8,40E-11
F151	1,36E-04	1,62E-10	2,00E-05	2,88E-11
I22	3,19E-04	2,17E-10	2,10E-05	4,40E-12
I54	3,06E-05	9,53E-12	3,88E-05	1,12E-11
Anticuerpo	DAKLP-b		KLP-b	
	K_{dis}	KD	K_{dis}	KD
C63	n/b	n/b	n/b	n/b
B21	2,30E-04	1,34E-10	1,12E-04	1,92E-10
F151	6,58E-05	2,12E-10	$\leq 1,0E-06$	$\approx 1,66E-11$
I22	$\leq 1,0E-06$	$\approx 1,83E-12$	1,03E-05	1,82E-12
I54	5,66E-05	1,17E-11	6,04E-05	9,56E-12
n/b = no hay unión				

Se realizó una inmunización adicional con una matriz de inmunógenos (véase la lista de péptidos, Tabla 2) para generar anticuerpos que bloquean los ligandos BKR1 de roedor, DABK y DAKD así como los anticuerpos con otras especificidades de unión contra diferentes miembros de la familia cinina de péptidos. La Tabla 5 enumera las secuencias pesada y ligera de los anticuerpos generados.

5

Tabla 5: Secuencias de las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos

Anticuerpo	Isotipo	SEQ ID NO.	Secuencia de la cadena pesada
B21	IgG1/k	97	<u>LPEFQVKLEESGAE</u> LVRS <u>GASVKLSCTASGF</u> NIKDY <u>YLHWVKQRPEQGLEWIGWIDPEN</u> GD <u>GYARKFQGKATMTAD</u> TSSNTVYL <u>LHLS</u> S <u>LTSE</u> D <u>TAVY</u> <u>YFN</u> AW <u>EYDGY</u> <u>YDLDYWGQGT</u> SVTVSS AKTTPPSVYGSS
C63		98	<u>LPEFQVQLEESGGGLVQ</u> PGGSMKLS <u>CVASGFT</u> FSNYWMN <u>WVRQ</u> SPEK <u>GLEWVAEIR</u> SKSN <u>NYATHYAESVKGRFTI</u> SRDDSKSSVYL <u>QMN</u> N <u>LRAED</u> TGIY <u>YCI</u> G <u>EDYGGDYWGQGT</u> SVTV SSAKTTPPSVYGSS
F151		99	<u>LPEFEVQLEESGPELVK</u> PGT <u>SVKVSCKASGYSFT</u> DYNI <u>YVVKQSHGKSLEWIGYFDPYNGNT</u> <u>GYNQKFRGKATLTVDK</u> SSSTAF <u>MHLS</u> S <u>LTSD</u> DS <u>AVYYC</u> AN <u>YYRYDDHAMDYWGQGT</u> SVTVSS AKTTPPSVYGSS
I22		100	<u>LPEFEVKLQESGAE</u> LVRS <u>GASVKLSCTASGF</u> NIKDY <u>YMHWVKQRPEQGLEWIGWVDPEN</u> GD <u>DYAPKFQGKATMTAD</u> TSSNTVYL <u>LQFS</u> S <u>LTSE</u> D <u>TAVY</u> <u>YCN</u> AF <u>EYDGNYS</u> PL <u>DFWGQGT</u> SVTVS SAKTTPPSVYGSS
154		101	<u>LPEFEVKLQESGAE</u> LVRS <u>GASVKLSCTASGF</u> NIKDY <u>YMHWVKQRPEQGLEWIGWVDPEN</u> GD <u>DYAPKFQGKATMTAD</u> TSSNTVYL <u>LQFS</u> S <u>LTSE</u> D <u>TAVY</u> <u>YCN</u> AF <u>EYDGNYS</u> PL <u>DFWGQGT</u> SVTVS SAKTTPPSVYGSS
B21	mIgG1/K	38	<u>EVQLQQSGAE</u> LVRS <u>GASVKLSCTASGF</u> NIKDY <u>YLHWVKQRPEQGLEWIGWIDPEN</u> GD <u>TIGYAR</u> <u>KFQGKATMTAD</u> TSSNTVYL <u>LHLS</u> S <u>LTSE</u> D <u>TAVY</u> <u>YFN</u> AW <u>EYDGY</u> <u>YDLDYWGQGT</u> SVTVSSAKTT PPS
C63		45	<u>EVKLEESGGGLVQ</u> PGGSMKLS <u>CVASGFT</u> FSNYWMN <u>WVRQ</u> SPEK <u>GLEWVAEIR</u> SKSN <u>NYATHY</u> <u>AESVKGRFTI</u> SRDDSKSSVYL <u>QMN</u> N <u>LRAED</u> TGIY <u>YCI</u> G <u>EDYGGDYWGQGT</u> SVTVSSAKTTP S
F151		19	<u>EIQQLQQSGPELVK</u> PGT <u>SVKVSCKASGYSFT</u> DYNI <u>YVVKQSHGKSLEWIGYFDPYNGNTGYNQ</u> <u>KFRGKATLTVDK</u> SSSTAF <u>MHLS</u> S <u>LTSD</u> DS <u>AVYYC</u> AN <u>YYRYDDHAMDYWGQGT</u> SVTVSSAKTT PPS
I22		53	<u>EVQLQQSGAE</u> LVRS <u>GASVKLSCTASGF</u> NIKDY <u>YMHWVKQRPEQGLEWIGWVDPEN</u> GD <u>SDYAP</u> <u>KFQGKATMTAD</u> TSSNTVYL <u>LQFS</u> S <u>LTSE</u> D <u>TAVY</u> <u>YCN</u> AF <u>EYDGNYS</u> PL <u>DFWGQGT</u> SVTVSSAKT TPPS
154		61	<u>EVQLQQSGAE</u> LVRS <u>GASVKLSCTASGF</u> NIKDY <u>YMHWVKQRPEQGLEWIGWVDPEN</u> GD <u>SDYAP</u> <u>KFQGKATMTAD</u> TSSNTVYL <u>LQFS</u> S <u>LTSE</u> D <u>TAVY</u> <u>YCN</u> AF <u>EYDGNYS</u> PL <u>DFWGQGT</u> SVTVSSAKT TPPS

Anticuerpo	Isotipo	SEQ ID NO.	Secuencia de la cadena ligera
B21	IgG1/k	102	ELDIVMTQTTLTSLVTVIGQPASIS <u>CKSSQS</u> LLYSNGKTYLN <u>WLLQ</u> RPQGQSPKRLIYLVSKLD SGVPDRFTGSGSGTDFTLKIIRVEAEDLGVYY <u>CLQ</u> GTHFPYTFGGGTKLEIKRADAAPT VSI FPPSKLELY
C63		103	ELDIVLTQSPSSLAVSVGEKVTMS <u>CKSSQS</u> LLYSSDQARNYLAWYQQRSGQSPKLLIYWASTR ESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLAVYY <u>CQQ</u> YSSYPYTFGGGTKLEIKRADAAPT VSI IFPPSKLELY
F151		104	ELDIVMTQTPSSLAVSVGEKVTMS <u>CKSSQS</u> LLYTSNQKNYLAWYQQKPGQSPKPLIYWASTR ESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLAIY <u>CQQ</u> YSSYPWTFGGGTKLEIKRADAAPT VSI IFPPSKLELY
I22		105	ELDIVITQTTLSLSPVIGQPASIS <u>CKSRQS</u> LLYSNGETYLN <u>WLLQ</u> RPQGQSPKRLIYLVSKLD SGVPDRFTGSRSGTDFTLKIIRVESEDLGVYY <u>CMQ</u> GTHFPYTFGGGTKLEIKRADAAPT VSI FPPSKLELY
154		106	ELDIVITQSTTLTSLSPVIGQPASIS <u>CKSSQS</u> LLYSNGETYLN <u>WLLQ</u> RPQGQSPKRLIYLVSKLD SGVPDRFTGSRSGTDFTLKIIRVESEDLGVYY <u>CMQ</u> GTHFPYTFGGGTKLEIKRADAAPT VSI FPPSKLELY
B21	mIgG1/K	39	DVVMQTPTLTLTSLVTVIGQPASIS <u>CKSSQS</u> LLYSNGKTYLN <u>WLLQ</u> RPQGQSPKRLIYLVSKLD SGVPDRFTGSGSGTDFTLKIIRVEAEDLGVYY <u>CLQ</u> GTHFPYTFGGGTKLEIKRADAAPT
C63		46	DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMS <u>CKSSQS</u> LLYSSDQARNYLAWYQQRSGQSPKLLIYWASTRES GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLAVYY <u>CQQ</u> YSSYPYTFGGGTKLEIKRADAAPT
F151		26	DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMS <u>CKSSQS</u> LLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKPLIYWASTRES GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLAIY <u>CQQ</u> YSSYPWTFGGGTKLEIKRADAAPT
I22		54	DIVMTQSPSSLVSVAGEKVTMS <u>CKSSQS</u> LLNSGNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYGASTRES GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYY <u>CQND</u> HSYPLTFGAGTKLELKRADAAPT
154		62	DVVMQTPTLTLTSLVTVIGQPASIS <u>CKSSQS</u> LLYSNGETYLN <u>WLLQ</u> RPQGQSPKRLIYLVSKLD SGVPDRFTGSRSGTDFTLKIIRVESEDLGVYY <u>CMQ</u> GTHFPYTFGGGTKLEIKRADAAPT
Subrayado sencillo = región CDR; doble subrayado = aminoácidos característicos para identificar las CDR			

Ejemplo 3: Generación de anticuerpos sustitutos para estudios en animales murinos

5 Un anticuerpo sustituto para ser utilizado en estudios de animales murinos necesitaba poder unirse y neutralizar ligandos de BKR1 de roedores, DABK y DAKLP (equivalente de ratón de DAKD). Con el fin de generar el anticuerpo sustituto requerido, los ratones primero se inmunizaron con DABK y/o DAKD con KLH directamente conjugado con los N-terminales de los péptidos. Los clones de hibridoma positivo de biotina-DABK/biotina-DAKD (biotinilación directamente en el N-terminal del péptido) mediante cribado ELISA se seleccionaron para el aumento proporcional y la purificación. Los anticuerpos enumerados en la Familia 7 (véase la Tabla 12) que demostraron altas afinidades de unión a biotina-DABK, biotina-DAKLP y biotina-DAKD se seleccionaron basados en el ensayo de unión directa Biacore (Tabla 10). Sin embargo, estos anticuerpos de la Familia 7 no mostraron unión a los péptidos DABK y DAKD nativos no modificados en ELISA competitivo, y carecían de funcionalidad neutralizante en un ensayo de afluencia de calcio con el Sistema Funcional de Cribado de Fármacos (Functional Drug Screening System (FDSS), en inglés)

10

(Hamamatsu Photonics K.K., Japón). Además, la biotina-DABK y la biotina-DAKD perdieron completamente la bioactividad en el ensayo FDSS en comparación con los péptidos DABK y DAKD nativos no modificados (datos no mostrados).

5 Se formuló la hipótesis de que la conjugación directa N-terminal de KLH y biotina impedía la confirmación nativa de que se formaran DABK y DAKD. Con el objetivo de restaurar la conformación nativa en péptidos conjugados con KLH y biotina, se diseñaron y se agregaron enlazadores al N-terminal de DABK y/o DAKD con la intención de "amortiguar" los efectos de la conjugación de KLH/biotina en la conformación del péptido. En primer lugar, se intentaron y probaron los enlazadores de poliglicina debido a sus propiedades simples, no polares y neutrales basadas en resultados de modelización. Los resultados del ensayo FDSS indicaron que el enlazador gly-gly-gly (3G) era el mejor según su capacidad para restaurar las bioactividades de los péptidos DABK y DAKD conjugados con KLH y biotina (datos no mostrados). Por lo tanto, se eligió KLH-3G-DABK para inmunizar ratones. Y se usaron biotina-3G-DABK y biotina-3G-KD en ensayos de cribado basados en unión (ELISA y Biacore). Varios anticuerpos específicos DABK/DAKD (Familia 3, véase la Tabla 13) se identificaron en esta nueva ronda de selección de hibridoma de anticuerpos sustitutos. El EE1 se seleccionó como el principal anticuerpo sustituto basado en sus superiores afinidad de unión y actividad de neutralización frente a DABK/DAKD nativo y la falta de reactividad cruzada con otros péptidos (véanse las Tablas 6-12).

10 Se generaron anticuerpos con diferentes especificidades cuando se usaban los diferentes inmunógenos enumerados en la Tabla 13. Los anticuerpos de la Familia 4 eran específicos para los ligandos del receptor BKR2, para BK y para KD. Los anticuerpos de la familia 5 se unen específicamente al C-terminal de BK y DABK. Los anticuerpos de familia 6 se unen a BK, DABK y DAKD pero no se unen a KD.

15 Se evaluaron enlazadores adicionales para la unión al anticuerpo EE1 sustituto por su capacidad para ajustarse en la bolsa de unión DABK/DAKD en EE1, que incluyen enlazadores de poli-glicina más largos, enlazadores de poli-alanina y enlazadores preexistentes tales como enlazador de polietilenglicol (PEG2) y enlazador de ácido aminohexanoico (Ahx) (un enlazador inerte de 6 carbonos). Todos los péptidos enlazadores se sintetizaron a medida por Abgent (San Diego, CA). Todos los péptidos biotinilados ensayados con enlazadores (biotina-enlazador-DABK/DAKD) se unieron bien a EE1, lo que indica que cualquiera de los enlazadores N-terminal inertes ayudaba a los péptidos DABK y DAKD a retener su conformación bioactiva nativa cuando se conjugaba con biotina y otras moléculas. Por el contrario, no se observó ninguna unión o una deficiente unión con EE1 con biotina-DABK y biotina-DAKD, péptidos que tienen conjugación directa de biotina N-terminal (véase la Figura 1).

20 La cinética de unión de los anticuerpos generados se resume en las Tablas 5-11. Después, todos los anticuerpos generados se clasificaron en familias y sus especificidades de unión se resumen a continuación en la Tabla 12. La Tabla 13 proporciona secuencias de cadena pesada y ligera de anticuerpos que se colocaron en la familia 1 y en la familia 2 en función de su especificidad de unión (véase la Tabla 12).

Tabla 6. Resumen de cinética de anticuerpos para péptidos b-3G-DABK y b-3G-DAKD

Clon	b-3G-DABK			b-3G-DAKD		
	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)
DD20	1,5E+06	2,3E-04	1,6E-10	4,7E+05	4,0E-04	8,8E-10
UR11	2,0E+05	3,0E-04	1,5E-09	3,0E+05	1,6E-03	5,2E-09
DD7	2,3E+05	6,0E-04	2,7E-09	2,1E+05	1,4E-03	6,6E-09
EE1	4,4E+05	1,2E-04	2,8E-10	4,4E+05	2,0E-04	4,5E-10
EE36	4,3E+03	5,3E-04	1,2E-07	n/b	n/b	n/b
UR29	n/b*	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
JK3	3,44E+05	3,91E-05	1,14E-10	3,18E+05	5,07E-05	1,60E-10
LR4	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
LR16	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b

Clon	b-3G-DABK			b-3G-DAKD		
	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)
LR6	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
LR12	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
NR1	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
NR15	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
n/b* = no hay unión específica, n/b = no hay unión						

Tabla 7. Resumen de cinética de anticuerpos para péptidos b-3G-DAKLP y b-3G-BK

Clon	b-3G-DAKLP			b-3G-BK		
	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)
DD20	3,1E+05	6,1E-04	2,0E-09	3,0E+05	7,1E-04	2,3E-09
UR11	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
DD7	1,7E+05	2,1E-03	1,2E-08	1,3E+05	8,8E-04	6,8E-09
EE1	4,2E+05	2,9E-04	6,8E-10	2,5E+05	2,6E-03	1,1E-08
EE36	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
UR29	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
JK3	ND	ND	ND	n/b	n/b	n/b
LR4	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
LR16	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
LR6	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
LR12	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
NR1	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
NR15	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
n/b = no hay unión; ND = no se determinó						

Tabla 8. Resumen de cinética de anticuerpos para péptidos b-3G-KLP y b-3G-KD

Clon	b-3G-KLP			b-3G-KD		
	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)
DD20	3,8E+05	5,7E-04	1,5E-09	n/b	n/b	n/b
UR11	n/b	n/b	n/b	1,2E+05	1,3E-03	1,1E-08
DD7	1,5E+05	2,1E-03	1,5E-08	2,2E+05	1,8E-03	8,4E-09
EE1	4,0E+05	2,1E-03	5,3E-09	n/b	n/b	n/b
EE36	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
UR29	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
JK3	ND	ND	ND	n/b	n/b	n/b
LR4	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
LR16	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
LR6	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
LR12	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
NR1	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
NR15	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b

n/b = no hay unión; ND = no se determinó

Tabla 9. Resumen de cinética de anticuerpos para péptidos DABK-b y DAKLP-b

Clon	DABK-b			DAKLP-b		
	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)
DD20	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
UR11	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
DD7	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
EE1	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
EE36	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
UR29	1,5E+06	5,8E-05	3,9E-11	3,0E+06	2,1E-03	6,8E-10
JK3	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b

Clon	DABK-b			DAKLP-b		
	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)
LR4	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
LR16	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
LR6	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
LR12	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
NR1	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
NR15	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
n/b = no hay unión; ND = no se determinó						

Tabla 10. Resumen de cinética de anticuerpos para péptidos BK-b y b-BK

Clon	BK-b			b-BK		
	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)
DD20	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
UR11	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
DD7	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
EE1	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
EE36	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
UR29	1,5E+06	1,0E-04	7,2E-11	n/b	n/b	n/b
JK3	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
LR4	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
LR16	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
LR6	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
LR12	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
NR1	n/b	n/b	n/b	8,69E+04	8,77E-04	1,01E-08
NR15	n/b	n/b	n/b	2,95E+05	1,09E-03	3,68E-09
n/b = no hay unión; ND = no se determinó						

Tabla 11. Resumen de cinética de anticuerpos para péptidos b-DABK y b-DAKD

Clon	b-DABK			b-DAKD		
	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)
DD20	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
UR11	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
DD7	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
EE1	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
EE36	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
UR29	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
JK3	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
LR4	1,48E+05	1,04E-03	7,15E-09	3,27E+05	7,63E-04	2,36E-09
LR16	4,34E+05	4,38E-05	1,01E-10	2,07E+05	3,39E-03	1,65E-08
LR6	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
LR12	2,91E+05	5,40E-04	3,63E-09	n/b	n/b	n/b
NR1	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
NR15	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
n/b = no hay unión; ND = no se determinó						

Tabla 12. Resumen de cinética de anticuerpos para péptidos b-DAKLP y b-KD

Clon	b-DAKLP			b-KD		
	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)
DD20	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
UR11	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
DD7	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
EE1	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
EE36	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
UR29	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
JK3	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b

Clon	b-DAKLP			b-KD		
	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)
LR4	1,84E+05	2,58E-04	1,40E-09	n/b	n/b	n/b
LR16	2,34E+05	1,11E-04	4,74E-10	n/b	n/b	n/b
LR6	6,80E+05	4,01E-04	7,45E-10	n/b	n/b	n/b
LR12	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b	n/b
NR1	n/b	n/b	n/b	1,66E+05	5,81E-03	3,56E-08
NR15	n/b	n/b	n/b	7,66E+05	5,66E-03	7,41E-09

n/b = no hay unión; ND = no se determinó

Tabla 13. Resumen de la generación de anticuerpos péptido anti-cinina

Familias de Anticuerpos	Immunógenos	Anticuerpos representativos	Especificidad de la unión
Familia 1	KD-KLH + KLH-KD o DAKD-KLH + KLH-DAKD	F151, B21, I22, I54	N-terminal de DAKD (DAKLP) y KD (KLP)
Familia 2	KD-KLH + KLH-KD o DAKD-KLH + KLH-DAKD	C63	N-terminal de DAKD y KD
Familia 3	KLH-3G-DABK	EE1, DD20, JK3	C-terminal de DABK y DAKD (DAKLP)
Familia 4	KLH-BK y BSA-BK	NR15, NR1	C-terminal de BK y KD
Familia 5	KLH-BK	UR29	N-terminal de BK y DABK
Familia 6	KLH-BK	UR11	BK, DABK y DAKD
Familia 7	KLH-DABK o KLH-DAKD	LR4, LR6, LR12 y LR16	no hay unión con péptidos nativos

Ejemplo 4: Caracterización del agotamiento del ligando des-arg-cinina usando movilización de calcio

- 5 Se usó un ensayo funcional para caracterizar adicionalmente las siete familias de anticuerpos generados. La señalización del receptor B1 de bradicinina es Gq acoplada, por lo tanto, la activación del receptor puede controlarse usando la activación Gq de IP3 y aguas abajo la movilización de calcio. Para medir la movilización del calcio se usaron células HEK mBKR1 (receptor B1 recombinante de bradicinina de ratón) o MRC5 (expresión endógena de receptores B2 de bradicinina; (ATCC CCL-171)).
- 10 En resumen, el gen Bdkrb1 de ratón (secuencia proporcionada a continuación) se amplificó a partir de ADNc de pulmón de ratón (Biochain, Cat. # C1334152) usando cebadores de PCR 804_cGWY_F:
- 5'-AAAAGCAGGCTTAGGAGCGGCCGCCATGGCGTCCCAGGCCTCGCTG-3' (SEQ ID NO: 107) y 804_cGWY_R: 5'-CAAGAAAGCTGGGTCCGATCCTTATAAAGTTCCAGAACCCCTGGTC-3' (SEQ ID NO: 108) y Pfu polimerasa (Agilent Technologies, Cat. # 600264) y se clonó en pDONR201 usando mezcla de enzima PB clonasa (Invitrogen, cat. #11789-020). En paralelo, el vector de expresión pEAK8 (EDGE Biosystems) se modificó insertando una etiqueta HA N-terminal (GCATACCCATACGACGTCCCAGACTACGCT, GenBank SEQ ID NO: 109 CY100443) en
- 15

pEAK8 linealizado con EcoRI y HindIII (vector pEAK8-nHA) y posterior inserción de la casete B de pasarela (Invitrogen, Cat. #11828-029) en pEAK8_nHA digerido con EcoRI y NotI y extremos romos con polimerasa Klenow (NEB, cat. #M0210S) dando como resultado el vector pEAK8_nHA_DEST. Después, se subclonó Bdkrb1 de ratón en pEAK8_nHA_DEST usando LR clonasa (Invitrogen, cat. #11791-100). Las células 293-PSC se transfectaron luego con el plásmido pEAK8-Bdkrb1 usando reactivo de transfección Fugene 6. Las células se sometieron a selección con antibióticos (puromicina) 24 horas después de la transfección, y la selección se mantuvo para generar una línea celular estable. La presencia del gen Bdkrb1 en las líneas celulares estables resultantes se confirmó mediante RT-PCR en tiempo real y mediante electroforesis en gel de agarosa. La expresión de la superficie celular del receptor B1 de bradicinina se realizó usando un anticuerpo contra la etiqueta HA N-terminal (Covance, cat. #MMS-101P) en el B1R de Bradicinina en un instrumento FACS. La actividad funcional del receptor B1 de bradicinina se demostró en el ensayo de movilización de calcio con agonistas selectivos.

Gen Bdkrb1 subclonado en células:

```
ATGGCGTCCCAGGCCTCGCTGAAGCTACAGCCTTCTAACC AAAGCCAGCAGGCCCTCCCAACATCACCTC
CTGCGAGGGCGCCCCGGAAGCCTGGGATCTGCTGTGTGCGGGTGCTGCCAGGGTTTGTTCATCACTGTCTGTGTT
TCTTTGGCCTCCTGGGGAACCTTTTAGTCTCTGTCCTTCTTCCCTTTTGCCCTTGGCGACGATGGTGGCAGCAG
CGGCGGCAGCGCCTAACCATAGCAGAAATCTACCTGGCTAACTTGGCAGCTTCTGATCTGGTGTGTTGTGCT
GGGCCTGCCCTTCTGGGCAGAGAACGTTGGGAACCGTTTCAACTGGCCCTTTGGAAGTACCTCTGCCCGGG
TGCTCAGCGGGGTATCAAGGCCAACCTGTTTCATCAGCATCTTCCCTGGTGGTGGCCATCAGTCAGGACCCG
TACAGGTTTGCTGGTATACCCCAIGACCAGCTGGGGGAACCGGCGGACGGCAAGCCCAAGTGACCTGCCT
GCTCATCTGGGTAGCTGGGGCCCTCTTGAGCACCCCCACGTTCCCTTCTGCGTTCGGTCAAAGTCGTCCCTG
ATCTGAACATCTCTGCCTGCATCCTGCTTTTCCCCCACGAAGCTTGGCACCTTGTAAGGATGGTGGAGTTG
AACGTTTTGGGTTTCCCTCCTCCATTGGCTGCCATCCTCTACTTCAACTTTTACATCCTGGCCTCCCTGAG
AGGACAGAAGGAGGCCAGCAGAACCCGGTGTGGGGGACCCAAGGACAGCAAGACAATGGGGCTGATCCTCA
CACTGGTAGCCTCCTTCCCTGGTCTGCTGGGCCCTTACCCTTCTTTGCCTTCCCTGGATTTCCCTGGTCCAG
GTGAGAGTGATCCAGGACTGCTTCTGGAAGGAGCTCACAGACCTGGGCCTGCAGCTGGCCAACCTTCTTTGC
TTTTGTCAACAGCTGCCTGAACCCACTGATTTATGTCTTTGCAGGCCGGCTCTTTAAGACCAGGGTTCTGG
GAACCTTATAA (GenBank NM_007539; SEQ ID NO:110)
```

Células HEK mBKR1 o MRC5 se sembraron en placas de fondo transparente de 384 pocillos en medio de cultivo, y se dejaron fijar durante la noche. Luego se eliminó el medio de cultivo, las células se lavaron en tampón de ensayo (HBSS, HEPES 20 mM, probenecida 2,5 mM), luego se cargaron de colorante con Fluo-4AM 0,5 uM, un colorante sensible al calcio permeable a las células, con ácido plurónico al 0,04% durante 1 hora a 37C. El éster de AM se escinde y el colorante del calcio se retiene en el citoplasma. Después de 1 hora, las células se lavaron para eliminar el exceso de colorante, y en las células quedaron 20 ul de tampón residual. Los tratamientos se agregaron como soluciones 2x en el sistema funcional de cribado de fármacos de Hamamatsu (FDSS), y la movilización de calcio se controló cinéticamente durante al menos 4 minutos. La activación del receptor B1R o B2R da como resultado la activación mediada por Galfa q de la fosfolipasa C y la movilización de calcio mediada por IP3. El colorante Fluo-4 experimenta quelación del calcio liberado y se observa un fuerte cambio en la fluorescencia. Los resultados se exportaron como unidades de fluorescencia relativa máxima-mínima para normalizar las diferencias entre la densidad celular o la carga de colorante a través de la placa.

Cada día se determinó la potencia de ligando ejecutando las curvas de respuesta a la concentración del ligando, y se seleccionó una concentración de EC70-80 aproximada de ligando para la incubación con anticuerpos. Se seleccionó una concentración de EC80 porque está en el intervalo lineal de la curva de detección y había un amplio margen para ver una disminución con antagonistas o anticuerpos que agotan el ligando. La curva dosis respuesta de los anticuerpos se dejaron unir a un ligando de concentración EC80, y el grado de agotamiento del ligando se controló usando un cambio en la fluorescencia. Los resultados se normalizaron para tampón y respuesta del ligando EC80, y se calculó una EC50 para el agotamiento del ligando. Los resultados se informaron luego como la relación molar que corresponde a la concentración de Anticuerpo que reduce agotamientos del 50% de la respuesta del ligando (es decir, EC50 de Ab) dividido entre la concentración de ligando utilizada. El máximo teórico debería ser 0,5 porque una unidad de anticuerpo debería poder agotar 2 unidades de ligando pero, en la práctica, se han visto valores más bajos, aunque eso puede ser un reflejo de la insensibilidad del procedimiento de detección para bajas concentraciones de ligando, en lugar de una restricción estequiométrica para el anticuerpo. Los resultados de estos experimentos se exponen en las Tablas 14-16.

Todos los anticuerpos de la familia 1 y de la familia 2 (véase la Tabla 13) demostraron una superior cinética de unión mediante Biacore (Tabla 3) y actividad de neutralización medida mediante movilización de calcio frente a péptidos DAKD y KD (Tablas 14 y 15). Los anticuerpos se analizaron adicionalmente para determinar su estabilidad térmica y la idoneidad de la secuencia para la humanización. El F151 se anticipó para la humanización porque era térmicamente estable, no había restos problemáticos en las regiones CDR y reaccionaba de forma cruzada con el ligando KLP y DAKLP de ratón.

45

Tabla 14: Caracterización del agotamiento del ligando des-arg-cinina usando la movilización de calcio en células mBKR1 de HEK

		Agotamiento de DABK			Agotamiento de DAKD			Agotamiento de DAKLP		
Familia	Anticuerpo	DABK (Relación Molar Media)	SD de la Relación Molar	n	DAKD (Relación Molar Media)	SD de la Relación Molar	n	DAKLP (Relación Molar Media)	SD de la Relación Molar	n
1	F151	IA100		5	0,08	0,04	7	0,15	0,04	4
1	B21	IA100		1	0,15	0,04	3	0,67		1
1	122	IA100		1	0,07	0,02	3	0,21		1
1	154	IA100		1	0,15	0,05	3	0,35		1
2	C63	IA100		1	0,08	0,02	3	5,85		1
3	EE1	1,03	0,52	5	0,86	0,52	3	0,57	0,36	4
3	DD20	3,45	1,34	3	1,82	0,76	3	1,31	0,86	3
	DD7	2,18	0,45	3	4,22	0,95	3	5,34	1,22	2
3	JK3	1,86	0,03	2	ND			1,44	0,03	2
4	MBK3	ND			ND			ND		
4	NR15	ND			ND			ND		
4	NR1	ND			ND			ND		
5	UR29	0,60	0,12	5	IA200		3	IA300		4
6	UR11	6,99	1,61	3	19,65	14,95	3	11,09	3,13	2
7	LR4	IA100		1	IA400		1	IA400		1
7	LR6	IA100		1	IA100		1	ND		
7	LR12	IA100		1	IA100		1	ND		
7	LR16	IA100		1	IA100		1	ND		

Los anticuerpos se preincubaron con una concentración establecida de ligando, generalmente un EC70-80 para activar la movilización de calcio en el receptor B1 de Bradicinina. La mezcla anticuerpo-ligando se añadió a células mBKR1 de HEK cargadas previamente con un colorante sensible al calcio (Fluo-4AM o Fluo-8AM) en el instrumento FDSS6000 de Hamamatsu, y se controló la movilización de calcio. Los datos se exportaron como una fluorescencia relativa máximo-mínimo de la respuesta biológica, y se calculó la IC50 para el agotamiento del ligando usando ajuste de curva sigmoïdal en un Graph Pad Prism V4.03. Los datos se informaron como la relación molar para el agotamiento del ligando mediante el anticuerpo para estandarizar las diferentes concentraciones de ligando que se usaron en los diversos experimentos.

Relación Molar para el agotamiento de ligando = $[IC_{50} \text{ de Anticuerpo}] / [\text{Ligando}]$

SD = desviación estándar; ND = no determinado; IA100 = Inactivo a 100 nM; IA200 = inactivo a 200 nM;

		Agotamiento de DABK			Agotamiento de DAKD			Agotamiento de DAKLP		
Familia	Anticuerpo	DABK (Relación Molar Media)	SD de la Relación Molar	n	DAKD (Relación Molar Media)	SD de la Relación Molar	n	DAKLP (Relación Molar Media)	SD de la Relación Molar	n
IA300 = Inactivo a 300nM; IA400 = Inactivo a 400nM										

Tabla 15: Caracterización del agotamiento del ligando de cinina usando la movilización de calcio en células de fibroblastos de pulmón fetal MRC5

		Agotamiento de BK			Agotamiento de KD			Agotamiento de KLP		
Familia	Anticuerpo	BK (Relación Molar Media)	SD de la Relación Molar	n	KD (Relación Molar Media)	SD de la Relación Molar	n	KLP (Relación Molar Media)	SD de la Relación Molar	n
1	F151	IA100		5	0,14	0,05	5	0,15	0,02	3
1	B21	IA100		1	0,33		1	ND		
1	I22	IA100		1	0,22		1	ND		
1	I54	IA100		1	0,30		1	ND		
2	C63	IA100		1	0,23		1	ND		
3	EE1	IA300		4	IA300		4	IA150		1
3	DD20	IA600		4	IA600		5	IA150		1
	DD7	7,11	3,62	3	17,37	12,11	3	4,27		1
3	JK3	IA300		2	IA300		2	ND		
4	MBK3	22,11	14,10	9	3,46	2,64	6	9,45		1
4	NR15	15,26	11,51	5	4,34	2,55	5	11,18		1
4	NR1	39,31		1	42,15		1	32,58		1
5	UR29	1,15	0,86	5	0,30	0,08	2	0,41		1
6	UR11	5,41	0,80	2	25,21	4,54	2	1,53		1
7	LR4	IA100		1	IA100		1	ND		
7	LR6	IA100		1	IA100		1	ND		
7	LR12	IA100		1	IA100		1	ND		
7	LR16	IA100		1	IA100		1	ND		

Los anticuerpos se preincubaron con una concentración establecida de ligando, generalmente un EC70-80 para activar la movilización de calcio en el receptor B2 de Bradicinina. La mezcla anticuerpo-ligando se añadió a fibroblastos de pulmón fetal MRC5 (ATCC CCL-171) cargados previamente con un colorante sensible a calcio (Fluo-4AM o Fluo-8AM) en el instrumento FDSS6000 de Hamamatsu, y se controló la movilización de calcio. Los datos se exportaron como una fluorescencia relativa máximo-mínimo de la respuesta biológica, y se calculó la IC50 para el agotamiento del ligando usando ajuste de curva sigmoidal en Graph Pad Prism V4.03. Los datos se informaron como la relación molar para el agotamiento del ligando por el anticuerpo para estandarizar la diferente concentración de ligando que se usó en los diversos experimentos.

Relación Molar para el agotamiento de ligando = $[IC_{50} \text{ de Anticuerpo}]/[\text{Ligando}]$

SD = desviación estándar; ND = no se determinó; IA100 = Inactivo a 100 nM; IA150 = Inactivo a 150 nM; IA300 = Inactivo a 300nM; IA400 = Inactivo a 400 nM; IA600 = Inactivo a 600nM

Ejemplo 5: Ingeniería de F151: Humanización, estabilización y mutación de motivos de secuencia no deseados

1. HUMANIZACIÓN

El protocolo de humanización utilizado se ha descrito en PCT/US08/74381 (US20110027266), incorporado en el presente documento en su totalidad por referencia. Las secuencias de variable ligera (VL) y variable pesada (VH) de F151 de murino se usaron para construir un modelo de homología de LC y HC anti-DAKD/KD de F151 en Molecular Operating Environment (MOE; v. 2009.10; Chemical Computing Group). Se utilizaron los siguientes moldes: entramado de la cadena ligera-1SBS (93% de identidad en las regiones del entramado), entramado de la cadena pesada-2VXT (84% de identidad en las regiones del entramado), L1-1LVE (93% de identidad), L2-1EEU (100% de identidad), L3-2R56 (93% de identidad), H1-1NJ9 (95% de identidad), H2-2VXU (76% de identidad) y H3-1HIL (49% de identidad). Los moldes estaban disponibles de RCSB Protein Data Bank que se encuentra en la red mundial en rcsb.org, un sitio web administrado por Rutgers y la Universidad de California San Diego (Berman, H.M.; Westbrook J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T.N.; Weissig, H.; Shindyalov, I.N.; Bourne, P.E., The Protein Data Bank, Nucleic Acids Research, 2000, 28, 235-242). El modelo de homología fue posteriormente minimizado de energía utilizando los procedimientos estándares implementados en el MOE. Posteriormente se realizó una simulación de dinámica molecular (MD) del modelo de homología 3D minimizado del F151 de murino, con restricciones en la estructura principal de la proteína a temperatura de 500 K durante 1,1 nanosegundos (ns) en el disolvente implícito generalizado de Born. Diez conformaciones diversas se extrajeron de esta primera ejecución de MD cada 100 picosegundos (ps) durante el último 1 ns. Estas diversas conformaciones se sometieron luego cada una a una simulación de MD, sin restricciones en la estructura principal de la proteína y a 300 K de temperatura, durante 2,3 ns. Para cada una de las 10 ejecuciones de MD, las últimas 2.000 instantáneas, una cada ps, de la trayectoria de MD se usaron luego para calcular, para cada aminoácido de F151 de murino, sus desviaciones del valor cuadrático medio (rmsd) en comparación con una posición mediodia de referencia. Al comparar el rmsd promedio en las 10 ejecuciones de MD separadas de un aminoácido dado con el rmsd promedio general de todos los aminoácidos del F151 de murino, se decide si el aminoácido es lo suficientemente flexible, como se observó durante la MD para considerarse que es probable que interactúe con los receptores de células T y sea responsable de la activación de la respuesta inmune. Se identificaron 62 aminoácidos como flexibles en el anticuerpo F151 de murino, excluyendo la CDR y su inmediata vecindad de 5 Å.

El movimiento de los 28 aminoácidos de F151 de murino más flexibles, durante las 20 ns (10 x 2 ns), se comparó entonces con el movimiento de los aminoácidos flexibles correspondientes de 49 modelos de homología de la línea germinal humana, para cada uno de los cuales se ejecutaron las simulaciones de MD de 10 x 2 ns. Los 49 modelos de línea germinal humana se construyeron combinando sistemáticamente las 7 cadenas ligeras de línea germinal humana más comunes (vk1, vk2, vk3, vk4, vlambd1, vlambd2, vlambd3) y las 7 cadenas pesadas de líneas germinales humanas más comunes (vh1a, vh1b, vh2, vh3, vh4, vh5, vh6). El anticuerpo de la línea germinal humana vk1-vh1b mostró una similitud de 0,80 4D de sus aminoácidos flexibles en comparación con los aminoácidos flexibles del anticuerpo F151 de murino; el anticuerpo de la línea germinal vk1-vh1b se usó, por lo tanto, para humanizar el anticuerpo F151 centrándose en los aminoácidos flexibles. Para la asociación de aminoácidos por pares adecuados entre los aminoácidos vk1-vh1b de F151 de murino, las 2 secuencias se alinearon basándose en la superposición 3D óptima de los carbonos alfa de los 2 modelos de homología correspondientes (véase la Figura 15 para un alineamiento de la LC de F151 y de la HC de F151 con vk1 y vh1b, respectivamente).

2. ESTABILIZACIÓN

Se usaron dos enfoques para mejorar la estabilidad del anticuerpo.

a) Enfoque basado en el conocimiento

Se propuso que los aminoácidos de las cadenas ligeras y pesadas con baja frecuencia de aparición frente a sus secuencias canónicas respectivas, excluyendo las CDR, fueran mutados en los aminoácidos encontrados más frecuentemente ($\Delta\Delta G_{th} > 0,5$ kcal/mol; E. Monsellier, H. Bedouelle, J. Mol. Biol. 362, 2006, páginas 580-593). Esta primera lista de mutaciones de consenso para la cadena ligera (LC) y para la cadena pesada (HC) se limitó a los aminoácidos encontrados en la línea germinal humana más cercana (vk1-vh1b). Los cambios sugeridos en la inmediata vecindad de las CDRs (zona "Vernier" de 5 Angstroms, J. Mol. Biol. 224, 1992, páginas 487-499) se eliminaron de la consideración. Esto dio como resultado 5 mutaciones de estabilización en la LC (véase la Tabla 19) y 4 mutaciones de estabilización en la HC (véase la Tabla 20). Se tuvieron en cuenta otros criterios para considerar estas mutaciones para estabilizar potencialmente el anticuerpo F151 anti-DAKD/KD. Estos criterios fueron un cambio favorable de hidropatía en la superficie o unos mecanismos moleculares basados en la estabilización prevista del mutante. Además, se consideraron (véanse las Tablas 16-22) mutaciones de estabilización adicionales informadas como satisfactorias en la bibliografía (E. Monsellier y H. Bedouelle, J. Mol. Biol., 362, 2006, páginas 580-593; B.J. Steipe y col., J. Mol. Biol., 1994, 240, 188-192). Uno de estos cambios se incorporó como una mutación de estabilización (D89E) en las secuencias HC2a, HC2b y HC2c de más adelante. Otro cambio sugerido (Q62E) se incorporó en la variante HC2b.

b) Enfoques basados en 3D y MD

Los enfoques basados en 3D y MD se han informado previamente (Seco J, Luque FJ, Barril X., J Med Chem. 23 de abril de 2009; 52(8): 2363-71; Malin Jonsson y col., J. Phys. Chem. B 2003, 107, 5511-5518). Las regiones hidrófobas del anticuerpo se identificaron explícitamente mediante el análisis de la simulación de la dinámica molecular del Fab en un disolvente binario (20% de isopropanol en agua, 20 ns de simulación de producción). Las mutaciones de lisina se introdujeron después en la vecindad de estas regiones como un intento de evitar la agregación. Se completó el análisis adicional utilizando un mapa de superficie hidrófoba dentro del software maestro de Schrodinger (v. 8.5.207). Usando una combinación de estas dos técnicas, se sugieren 2 mutaciones Lys, 1 en la cadena pesada y 1 en la cadena ligera.

3. HUMANIZACIÓN POR INJERTO

La humanización usando técnicas de injerto se ha informado previamente (Peter T. Jones, Paul H. Dear, Jefferson Foote, Michael S. Neuberger y Greg Winter Nature, 1986, 321, 522-525). El proceso de humanización que se usó comenzó identificando las líneas germinales humanas más cercanas a cadenas ligeras y pesadas anti-DAKD/KD. Esto se hace realizando una búsqueda BLAST frente a todas las líneas germinales humanas que se enumeraron sistemáticamente (todas las combinaciones posibles de los dominios V y J para las cadenas kappa y lambda, los dominios V, D y J para las cadenas pesadas).

Se identificaron las siguientes líneas germinales humanas más cercanas con 83% y 62% de identidad de secuencia con cadenas ligeras (LC) y cadenas pesadas (HC), respectivamente, de F151 anti-DAKD/KD (véase la Figura 16). Usando la línea germinal VBASE interna, la cadena ligera se encuentra cerca del locus V IV-B3 (~83% de identidad) y la cadena pesada cerca del locus 1-08 y 1-18 (~62% de identidad) de la subfamilia VH1. Las regiones CDR (como se define por MOE) y las regiones Vernier (como se define en Foote y Winter, J. Mol. Biol., 1992, 224, 487-499) se indican en negrita. Las mutaciones de humanización en subrayado se obtuvieron realizando una comparación por pares adecuados de las 2 secuencias alineadas, excluyendo los restos de las zonas CDR y Vernier definidas anteriormente. En otra variante de la humanización, solo las CDRs se excluyeron en la comparación.

4. MUTACIÓN DE MOTIVOS DE SECUENCIA NO DESEADOS

Se consideraron los siguientes motivos de secuencias: Asp-Pro (enlace lábil de ácido), Asn-X-Ser/Thr (glucosilación, X = cualquier aminoácido excepto Pro), Asp-Gly/Ser/Thr (formación de succinimida/iso-asp en regiones flexibles), Asn-Gly/H is/Ser/Ala/Cys (sitios de desamidación expuestos) y Met (oxidación en áreas expuestas). Entre otros criterios, los dominios VL y VH de F151 murino se seleccionaron de otros anticuerpos de murino porque F151 de murino no tenía motivos de secuencia no deseados expuestos, pero se introdujeron en algunas variantes humanizadas.

LC3a, LC3b, HC3a y HC3b tienen cada uno sitios de succinimida potencialmente problemáticos que se identificaron. Estos sitios no se modificaron en las secuencias propuestas ya que los restos involucrados están potencialmente implicados en la red de enlaces H (inspección visual del modelo de homología). Estas posiciones se encuentran también en otras diversas estructuras de anticuerpos. Además, tanto en HC3a como en HC3b, una humanización estricta mediante injerto incluiría una sustitución de Ser115 por Met. Esta Metionina está expuesta. Se sugiere una sustitución de Leucina en esta posición como una mutación de humanización ya que es un resto común entre muchas secuencias cercanas de la línea germinal humana.

Las secuencias humanizadas resultantes se sometieron a BLAST por la similitud de secuencia frente a la base de datos de International Epitope Database (IEDB) (que se encuentra en la red mundial en immuneepitope.com; versión de junio de 2009; Vita R, Zarebski L, Greenbaum JA, Emami H, Hoof I, Salimi N, Damle R, Sette A, Peters B. The immune epitope database 2.0. Nucleic Acids Res. Enero de 2010; 38 (publicación de la base de datos): D854-62. Epub 11 de noviembre de 2009) para asegurar que ninguna de las secuencias contenga ningún epítipo conocido de

células B o T humanas (identidad de secuencia del 70% utilizada como punto de corte para los resultados obtenidos a través de la búsqueda BLAST y considerando únicamente los resultados de especies humanas).

5. SECUENCIAS ORIGINALES DE LOS DOMINIOS VARIABLES DE F151 DE MURINO

5 Las CDRs se resaltan en negrita y las regiones de Vernier (como se define en Foote y Winter, J. Mol. Biol., 1992, 224, 487-499) están subrayadas.

Cadena ligera (SEQ ID NO: 26)

DIVMSQSPSS LAVSVGEKVTMSCKSSQSLLYSSNQKNYLA
 WYQQKPGQSP KPLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGIDFTLT
 ISSVKAEDLA IYYCQQYYSPWTFGGGTKLEIK

Índice de germinalidad = 83% con Z46615_1_V_X67858_1_J [V IV-B3]

Cadena Pesada (SEQ ID NO:19) :

10 EIQLQQSGPELVKPGTSSVKVSCKASGYSFTDYNIVWVKQS
 HGKSLIEWIGY FDPYNGNTGYNQKFRGKATLTVDKSSSTAF
 MHLSSLTSDDSAVYYCANYYRYDDHAMDYWGQGTSTVTVSS

Índice de germinalidad = 62% con Z12316_1_VX97051_4_D_X97051_5_J [VH1 1-18]

6. SECUENCIAS DE INGENIERÍA

a) Antecedentes

15 Se propusieron 5 versiones de la cadena ligera (LC1, LC2a, LC2b, LC3a y LC3b) y 5 versiones de la cadena pesada (HC1, HC2a, HC2b, HC3a y HC3b).

20 LC1 contiene 5 mutaciones de humanización identificadas usando el protocolo de humanización 4D. LC2a introdujo 5 mutaciones de estabilización adicionales. LC2b agregó 1 mutación de Lisina para ayudar a prevenir la agregación. LC3a contiene 15 mutaciones derivadas de injertar en la secuencia de la línea germinal humana más cercana y retener los restos de la zona CDR y Vernier de murino. LC3b contenía 16 mutaciones derivadas de injerto de CDR con una mutación de humanización adicional.

25 HC1 tiene 6 mutaciones de humanización identificadas por el protocolo interno. HC2a introdujo 5 mutaciones de estabilización adicionales mientras que HC2b contiene 6 mutaciones de estabilización adicionales en comparación con HC1. HC2c contiene 1 mutación Lys, además de las mutaciones de estabilización de HC2a, para ayudar a prevenir la agregación. HC3a contiene 19 mutaciones derivadas de injertar en la secuencia de la línea germinal humana más cercana y retener los restos de la zona CDR y Vernier. HC3b contiene 25 mutaciones derivadas de injertar de CDR.

Se propusieron 6 combinaciones en total (resumidas en la Tabla 16):

- LC1 x HC1 (mutaciones que abordan la humanización solamente)
- LC2a x HC2a (mutaciones que abordan la humanización y la estabilización)
- 30 • LC2a x HC2b (mutaciones que abordan la humanización y la estabilización)
- LC2b x HC2c (mutaciones que abordan la humanización, la estabilización y la "anti-agregación")
- LC3a x HC3a (mutaciones que abordan principalmente la humanización por injerto + Vernier)
- LC3b x HC3b (mutaciones que abordan la humanización por injerto)

Tabla 16: Resumen de las 6 combinaciones LCxHC propuestas

	Humanización (LC1)	Humanización + estabilización (LC2a)	Humanización + estabilización + anti-agregación" (LC2b)	Injerto con regiones Vernier (LC3a)	Injerto (LC3b)
Humanización (HC1)	x				
Humanización+estabilización (HC2a)		x			
Humanización+estabilización (HC2b)		x			
Humanización+estabilización+"anti- agregación" (HC2c)			x		
Injerto (HC3a)				X	
Injerto (HC3b)					x

Tabla 17: Mutaciones de las 5 variantes de LC del anticuerpo F151 anti-DAKD/KD

Cadena Ligera Numeración secuencial	Cadena Ligera Numeración Kabat	Mutaciones de humanización (LC1)	Mutaciones de humanización + estabilización (LC2a)	Mutaciones de humanización + estabilización + mutaciones de anti- agregación (LC2b)	Injerto de CDRs + restos Vernier (LC3a)	Injerto de solo CDRs (LC3b)
Ser5	Ser5		Thr	Thr	Thr	Thr
Ser9	Ser9				Asp	Asp
Ala12	Ala12		Ser	Ser		
Val13	Val13	Ala	Ala	Ala		
Val15	Val15				Leu	Leu
Glu17	Glu17	Asp	Asp	Asp		
Lys18	Lys18	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg
Val19	Val19				Ala	Ala
Met21	Met21		Ile	Ile	Ile	Ile
Ser22	Ser22				Asn	Asn
Gln48	Gln42	Lys	Lys	Lys		
Ser49	Ser43				Pro	Pro
Pro52	Pro46					Leu

ES 2 673 869 T3

Cadena Ligera Numeración secuencial	Cadena Ligera Numeración Kabat	Mutaciones de humanización (LC1)	Mutaciones de humanización + estabilización (LC2a)	Mutaciones de humanización + estabilización + mutaciones de anti- agregación (LC2b)	Injerto de CDRs + restos Vernier (LC3a)	Injerto de solo CDRs (LC3b)
Thr69	Thr63		Ser	Ser	Ser	Ser
Val84	Val78				Leu	Leu
Lys85	Lys79	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln
Leu89	Leu83			Lys	Val	Val
Ile91	Ile85		Thr	Thr	Val	Val
Gly106	Gly100				Gln	Gln
Leu110	Leu104				Val	Val
Mutaciones:		5	10	11	15	16

Tabla 18: Mutaciones de las 6 variantes de la HC del anticuerpo F151 anti-DAKD/KD

Cadena Pesada Numeración secuencial	Cadena Pesada Numeración Kabat	Mutaciones de humanización (HC1)	Mutaciones de humanización + estabilización (HC2a)	Mutaciones estabilizantes de la humanización (HC2b)	Mutaciones de humanización + estabilización + mutaciones de antiagregación (HC2c)	Injerto de CDRs + resto Vernier (HC3a)	Injerto de solo CDRs (HC3b)
Glu1	Glu1		Gln	Gln	Gln	Gln	Gln
Ile2	Ile2						Val
Gln5	Gln5	Val	Val	Val	Val	Val	Val
Pro9	Pro9		Ala	Ala	Ala	Ala	Ala
Leu11	Leu11	Val	Val	Val	Val	Val	Val
Val12	Val12	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys
Thr16	Thr16	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala
Lys38	Lys38					Arg	Arg
Ser40	Ser40					Ala	Ala
His41	His41	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro
Lys43	Lys43					Gln	Gln
Ser44	Ser44		Gly	Gly	Gly	Gly	Gly
Ile48	Ile48						Met
Gln62	Gln61			Glu			
Lys67	Lys66					Arg	Arg
Ala68	Ala67						Val
Leu70	Leu69						Met
Val72	Val71						Thr
Lys74	Lys73						Thr
Ser76	Ser75					Thr	Thr

Cadena Pesada Numeración secuencial	Cadena Pesada Numeración Kabat	Mutaciones de humanización (HC1)	Mutaciones de humanización + estabilización (HC2a)	Mutaciones estabilizantes de la humanización (HC2b)	Mutaciones de humanización + estabilización + mutaciones de antiagregación (HC2c)	Injerto de CDR + resto Vernier (HC3a)	Injerto de solo CDR s (HC3b)
--	-----------------------------------	-------------------------------------	--	---	--	--	---------------------------------

Phe80	Phe79		Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr
His82	His81					Glu	Glu
Ser84	Ser82A					Arg	Arg
Leu 86	Leu82C				Lys		
Thr87	Thr83					Arg	Arg
Asp89	Asp85	Glu	Glu	Glu	Glu		
Asp90	Asp86		Glu	Glu	Glu		
Ser91	Ser87					Thr	Thr
Ser115	Ser108					Leu	Leu
Mutaciones:		6	11	12	12	19	25

5 a) Secuencias de ingeniería de la cadena ligera:

No se encontraron epítopes conocidos de células T o células B potencialmente problemáticos en ninguna de las variantes propuestas.

LC1 (SEQ ID NO: 27), las mutaciones de humanización están subrayadas, las CDRs y las zonas Vernier están en negrita:

DIVMSQSPSSLAASSVGDRVTMSCKSSQSLLYSSN**QKNYLA**
WYQQKPGKSP KPLIYWASTRESGVPDRF**TSGSGTDF**TLT
 10 ISSVQAEDLAIYYC**QQYYSYPWTF**GGG**TKLEIK**

LC2a (SEQ ID NO: 28), las mutaciones de humanización están subrayadas, las CDRs y las zonas Vernier están en negrita, las mutaciones de estabilización están en cursiva (T en la posición 5, S en la posición 12, I en la posición 21, S en la posición 69, T en la posición 91 mostradas a continuación):

DIVMTQSPSSLSASVGDRVTISCKSSQSLLYSSN**QKNYLA**
WYQQKPGKSPKPLIYWASTRESGVPDRF**S**SGSG**TDF**TLT
 15 ISSVQAEDLA TYYC**QQYYSYPWTF**GGG**TKLEIK**

15 LC2b (SEQ ID NO: 29) las mutaciones de humanización están subrayadas, las CDRs y las zonas Vernier están en negrita, las mutaciones de estabilización están en cursiva (T en la posición 5, S en la posición 12, I en la posición 21,

S en la posición 69, T en la posición 91 mostradas a continuación) y una mutación anti-agregación es K en la posición 89:

DIVMTQSPSSLSASVGRVTISCKSSQSLLYSSNQNLYLA
 WYQQKPKGKSPKPLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLT
 ISSVQAEDKA TYYCQQYYSPWTFGGGKLEIK

5 LC3a (SEQ ID NO: 30), las mutaciones injertadas se muestran subrayadas y las CDRs y las zonas Vernier se muestran en negrita:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQNLYLA
 WYQQKPGQPPKPLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLT
 ISSLQAEDVAVYYCQQYYSPWTFGQGTKVEIK

LC3b (SEQ ID NO: 31), las mutaciones injertadas se muestran subrayadas y las CDRs y zonas Vernier se muestran en negrita:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQNLYLA
 WYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLT
 ISSLQAEDVAVYYCQQYYSPWTFGQGTKVEIK

10 Obsérvese que L en la posición 52 es un resto vernier que está mutado a humano.

c) Secuencias de la cadena pesada de ingeniería

HC1 (SEQ ID NO: 20), las mutaciones de humanización están subrayadas, las CDRs y las zonas vernier están en negrita:

EIQLVQSGPEVKKPGASVKVSCASGYSFTDYNIYWVKQS
 PGKSLEWIGYFDPYNGNTGYNQKFRGKATLTVDKSSSTAF
 MHLSSLTSEDSAVYYCANYYRYDDHAMDYWGQGTSTVTVSS

15 HC2a (SEQ ID NO: 21), las mutaciones de humanización están subrayadas, las CDRs y las zonas vernier están en negrita, las mutaciones de estabilización están en cursiva (Q en la posición 1, A en la posición 9, G en la posición 44, Y en la posición 80 y E en posición 90 mostradas a continuación):

QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYSFTDYNIYWVKQS
 PGKGLEWIGYFDPYNGNTGYNQKFRGKATLTVDKSSSTAY
 MHLSSLTSEESAVYYCANYYRYDDHAMDYWGQGTSTVTVSS

20 HC2b (SEQ ID NO: 22), las mutaciones de humanización están subrayadas, las CDRs y las zonas vernier están en negrita, las mutaciones de estabilización están en cursiva (Q en la posición 1, A en la posición 9, G en la posición 44, E en la posición 62, Y en posición 80 y E en la posición 90 mostradas a continuación):

QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYSFTDYNIYWVKQS
 PGKGLEWIGYFDPYNGNTGYNQKFRGKATLTVDKSSSTAY
 MHLSSLTSEESAVYYCANYYRYDDHAMDYWGQGTSTVTVSS

No se identificaron epítopes humanos para la secuencia HC2b en la base de datos IEDB.

25 HC2c (SEQ ID NO: 23), las mutaciones de humanización están subrayadas, CDRs y las zonas vernier están en negrita, las mutaciones de estabilización están en cursiva (Q en la posición 1, A en la posición 9, G en la posición 44, Y en la posición 80 y E en la posición 90 mostradas a continuación) y una mutación antiagregación en K en la posición 86:

QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYSFTDYNIYWVKQS
 PGKGLEWIGYFDPYNGNTGYNQKFRGKATLTVDKSSSTAY
 MHLSSKTSEESAVYYCANYYRYDDHAMDYWGQGTSTVTVSS

30 HC3a (SEQ ID NO: 24), las mutaciones injertadas se muestran subrayadas y las CDRs y zonas Vernier se muestran en negrita:

QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYSFTDYNIYWVQRQA
 PGQGLEWIGYFDPYNGNTGYNQKFRGRATLTVDKSTSTAY
 MELRSLRSDDTAVYYCANYYRYDDHAMDYWGQGTSLTVTVSS

LC3b (SEQ ID NO: 25), las mutaciones injertadas se muestran subrayadas y las CDRs y zonas Vernier se muestran en negrita:

ES 2 673 869 T3

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKAS**GYSFTDYN**IYWVRQA
PGQGLEWM**GYFDPYNGNTGYNQKFRGRVTMTTDTSTSTAY** MELRSLRSDDTAVYYC**ANYRYDDHAMDYW**
GQGITLVTVSS

Obsérvese que el siguiente resto Vernier está mutado a humano: V en la posición 2, M en la posición 48, V en la posición 68, M en la posición 70 y T en la posición 74.

No se identificaron epítopes humanos para la secuencia HC3b en la base de datos IEDB.

5 Índice de germinalidad de HC3b = 83 % con **Z12316_1_V_J00235_1_D_U42590_1_J** [1-18/DP-14].

Tabla 19: Cambios de estabilización propuestos en la cadena ligera

Resto	Cambio propuesto	Gth calculado	Aceptar el cambio
Ser-5	Thr	2,32286	Sí
Ala-12	Ser	0,75228	Sí
Met-21	Ile	0,768959	Sí
Pro-52	Leu	1,70059	No-región Vernier
Thr-69	Ser	1,10843	Sí
Lys-86	Glu	2,00115	No - cambió a Gln durante la humanización
Ile-91	Thr	1,27255	Sí

Tabla 20: Cambios de estabilización propuestos en cadena pesada

Resto	Cambio propuesto	Gth calculado	Aceptar el cambio
Glu-1	Gln	0,562423	Sí
Ile-2	Val	2,15882	No - región Vernier
Pro-9	Ala	0,505324	Sí
Thr-16	Ala	1,50552	Ya cambió a Ala en la humanización
Val-20	Leu	2,21586	No - no en la secuencia de la línea germinal
Ser-40	Arg	1,03643	No - no en la secuencia de la línea germinal
His-41	Pro	1,67738	Ya cambió a Pro en la humanización
Ser-44	Gly	1,5068	Sí
Gln-62	Glu	0,74934	No - no en la secuencia de la línea germinal
Arg-65	Lys	2,32314	No - no en la secuencia de la línea germinal
Phe-80	Tyr	1,30935	Sí
His-82	Gln	2,24674	No - no en la secuencia de la línea germinal

ES 2 673 869 T3

Resto	Cambio propuesto	Gth calculado	Aceptar el cambio
Asp-89	Glu	1,65409	Ya cambió a Glu en la humanización
Asn-98	Arg	3,65643	No – región Vernier

Tabla 21: Combinaciones de mutaciones de estabilización evaluadas

Combinación*	Cambios adicionales sugeridos	Aceptar el cambio
L1 (46→P y 48→Q)	K48→Q	No – mutación de humanización K48
L2 (51→K)	Ninguno – ya el K51	Ninguno
L3 (80→T)	Ninguno – ya el T80	Ninguno
L4 (82→S)	Ninguno – ya el S82	Ninguno
L5 (90→A, 91→T)	Ninguno – ya el A90, T91 anteriormente sugerido (Tabla 1)	Ninguno
H1 (15→G)	Ninguno – ya G15	Ninguno
H2 (62→E, 63→K, 64→F)	Q62→E, ya K63 y F64	Sí -considerado en HC2b
H3 (87→T, 88→S, 89→D)	D89→E, ya T87 y S88	Sí – posibles puentes salinos con K63 y K43
S1 (L1 y L5)	K48→Q	No – mutación de humanización K48
S2 (H1 y H3)	D89→E	No (véase H3)

*Nota: Numeración secuencial utilizada para referirse a restos

Tabla 22: Posibles mutaciones de estabilización

Resto* de cadena ligera	Cambios adicionales sugeridos	Aceptar el cambio
15→L	V15→L	No – V15 en la línea germinal Vk1
96→Q	Ninguno – ya el Q96	Ninguno
38→Y	Ninguno – ya el Y38	Ninguno
112→I	Ninguno – ya el I112	Ninguno
69→S	G69→S	No – G69 está en la región Vernier
21→I	M21→I	Ya cambió (véase la Tabla 19)

*Nota: Numeración secuencial usada para referirse a restos

Ejemplo 6: Caracterización de variantes de humanización

5 Según el modelo *in silico* presentado en la Tabla 16, la región variable del ADN de la cadena ligera (VL) y de la cadena pesada (VH) del F151 humanizado se hizo uso de la optimización de codón para la expresión HEK293 y el gen se sintetizó por GeneArt (filial de Life Technologies). Los fragmentos de ADN sintetizados se clonaron en la región constante de los vectores que codifican la cadena ligera (CL), pFF0362 (A. Vector LC Kappa humano) en los sitios ApaLI/BsiWI y las regiones constantes de los vectores que codifican la cadena pesada (CH1, CH2 y CH3), pFF0363 (B. Vector HC de IgG1 humana) en sitios ApaLI/ApaI respectivamente. Los plásmidos pFF0460 resultantes que contienen la secuencia completa de LC y los pFF0466 que contienen la longitud completa de HC de las variantes humanizadas de F151 se cotransfectaron y se expresaron transitoriamente en el sistema de expresión FreeStyle® 293 (Invitrogen/Life Technologies, catálogo n.º K9000-01).

10 Las seis variantes humanizadas mostradas en la Tabla 16 se caracterizaron por diversos parámetros tales como cinética de unión (discutida anteriormente) así como propiedades químicas y físicas tales como la termoestabilidad que se usan en la técnica de forma rutinaria.

15 La caracterización se realizó en dos niveles. El Nivel I incluía la calorimetría de barrido diferencial (DSC) mostrada en la Tabla 24 y en la Figura 2. En resumen, para los experimentos de DCS, los anticuerpos se dializaron frente a la solución salina tamponada con fosfato. Las concentraciones de anticuerpos se midieron por absorbancia UV. Los anticuerpos se diluyeron a 1 mg/ml usando PBS. Los barridos se realizaron usando un instrumento N-DSC II de Calorimetry Sciences Corporation usando una celda capilar de 0,3268 ml con PBS en la celda de referencia. La velocidad de barrido fue de 2 °C/min y las muestras se sometieron a un barrido desde 20 °C hasta 100 °C.

20 Todas las variantes, a excepción de HC3b/LC3b, mostraron afinidades de unión comparables al anticuerpo parental. La variante HC3a/LC3a se seleccionó antes que las otras variantes en función de otras propiedades fisicoquímicas tales como datos SEC, estabilidad y falta de agregación (véanse las Tablas 23-25).

Tabla 23. Comparación de la cinética de las variantes humanizadas del F151

	HC1/LC1			HC2a/LC2a		
	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)
DAKD-b	4,16E+05	6,00E-06	1,45E-11	6,66E+05	1,22E-05	1,83E-11
KD-b	4,24E+05	1,74E-07	3,94E-13	7,03E+05	6,12E-06	8,71E-12
DAKLP-b	5,00E+05	7,96E-06	1,60E-11	4,10E+05	5,67E-06	1,38E-11
KLP-b	4,81E+05	2,67E-06	5,54E-12	6,15E+05	2,68E-05	4,34E-11
	HC2b/LC2a			HC2c/LC2b		
	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)
DAKD-b	4,17E+05	1,05E-05	2,57E-11	4,81E+05	4,34E-05	9,01E-11
KD-b	3,75E+05	1,66E-06	4,72E-12	5,64E+05	9,08E-06	1,74E-11
DAKLP-b	4,46E+05	1,30E-05	2,97E-11	9,03E+05	1,10E-05	1,21E-11
KLP-b	4,01E+05	2,20E-06	5,76E-12	5,16E+05	1,02E-05	1,98E-11
	HC3a/LC3a			HC3b/LC3b		
	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)

ES 2 673 869 T3

DAKD-b	5,06E+05	1,28E-05	2,53E-11	3,85E+05	5,15E-05	1,35E-10
KD-b	4,27E+05	2,95E-06	6,78E-12	2,51E+05	3,02E-06	1,44E-11
DAKLP-b	4,65E+05	1,42E-05	3,05E-11	7,04E+04	2,76E-03	4,05E-08
KLP-b	5,02E+05	5,43E-07	1,06E-12	5,39E+05	2,72E-04	5,26E-10

Para comparación: Ka(1/Ms) de mF151 era 7,84E+05 para DAKD-b, 8,30E+05 para KD-b, 1,81E+06 para DAKLP-b, y 1,12E+06 para KLP-b

Tabla 24. Comparación de Nivel 1 de variantes de humanización

Variante	Ensayo	Conc. de proteínas (mg/ml)	Pureza		Estabilidad	Ensayo de la potencia funcional		Afinidad del ligando
	Procedimiento	Espectroscopia de UV (A280)	Gel-1D (reductor y no reductor)	SEC	DSC (Tf °C) (Tf del F151 parental = 73 °C)	Ensayo FDSS	Ensayo FDSS sin preincubación	Unión Biacore
HC1/LC1		1,69	No Ag/Deg	≈ 5 % Ag	81,6 (M) 70,0 (m)	Potencia nM en DAKD, potencia sub nM en KD, comparable entre 5 variantes	Activo en DAKD y KD comparable entre 5 variantes	K _{as} 10E5, K _{dis} menor que o igual a 10E-6 comparable entre 5 variantes
HC2a/LC2a		2,01	No Ag/Deg	No Ag	75,0 (M) 82,5 (m)			
HC2b/LC2a		1,83	No Ag/Deg	No Ag	74,6 (M) 83,0 (m)			
HC2c/LC2b		0,68	No Ag/Deg	No Ag	71,0 (M) 64,0 (m) 82,5 (m) Inestable			
HC3a/LC3a		1,71	No Ag/Deg	No Ag	82,3 (M) 71,8 (m) Lo más inestable			

HC3b/LC3b		1,47	No Ag/Deg	No Ag	79,4 (M) 71,4 (m)	Potencia perdida para KLP y DAKLP		Afinidad disminuida para KLP y DAKLP
Abreviaturas: Ag = agregación, Deg = degradación								

Tabla 25. Comparación de Nivel 2 de variantes de humanización

	Termoestabilidad			Estabilidad	Confirmación de integridad (LC, HC)	Confirmación de secuencia N-terminal
Variante	Gel-1D	SEC	Biacore	SEC	LC-MS	Secuenciación N-terminal
HC1/ LC1	No Ag/Deg	No Ag/Deg	Velocidad de disociación ligeramente más rápida a 45C que a 4C	No Ag/Deg	LC(+1 Da de desviación) HC(+1 Da de desviación) G0 dominante	N-terminal de LC y HC intacto
HC2a/LC2a	No Ag/Deg	No Ag/Deg	Velocidad de disociación ligeramente más rápida a 45C que a 4C	No Ag/Deg	LC(coincidencia) HC(coincidencia) G0 dominante	N-terminal de LC y HC intacto
HC2b/LC2a	No Ag/Deg	No Ag/Deg	Velocidad de disociación ligeramente más rápida a 45C que a 4C	No Ag/Deg	LC(+1 Da de desviación) HC(+1 Da de desviación) G0 dominante	N-terminal de LC y HC intacto
HC2c/LC2b	X	X	X	X	X	X
HC3a/LC3a	No Ag/Deg	No Ag/Deg	Velocidad de disociación ligeramente más rápida a 45C que a 4C	No Ag/Deg	LC(-2Da de desviación) HC(-2Da de desviación) G0 dominante	N-terminal de LC y HC intacto
HC3b/LC3b	X	X	X	X	X	X
Termoestabilidad = incubación a 4 °C (control) y 45 °C durante 3 días; gel-1D estaba en condiciones no reductoras; Estabilidad = 2 ciclos de congelación/descongelación; LC-MS = reducida y reducida/desglucosilación						
Abreviaturas: Ag = agregación, Deg = degradación, X = no se presentaron datos						

ES 2 673 869 T3

Tabla 26. Comparación entre F151 parental y la variante humanizada de F151 (HC3a/LC3a)

F151 parental		
	Variable de cadena pesada	Variable de cadena ligera
Gen	GAGATCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTG GTGAAGCCTGGGACTTCAGTGAAGGTGTCCTGC AAGGCTTCTGGTTACTCATTCACTGACTACAAC ATCTACTGGGTGAAACAGAGCCATGGAAAGAGC CTTGAGTGGATTGGATATTTTGATCCTTACAAT GGTAATACTGGCTACAACCAGAAGTTCAGGGGC AAGGCCACATTGACTGTTGACAAGTCTCCAGC ACAGCCTTCATGCATCTCAGCAGCCTGACATCT GATGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAACACTAC TATAGGTATGACGACCATGCTATGGACTATTGG GGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:127)	GACATTGTGATGTCACAGTCTCCATCCT CCCTAGCTGTGTCAAGTGGAGAGAAGGT TACTATGAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGC CTTTTATATAGTAGCAATCAAAGAAGT ACTTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGG GCAGTCTCCTAAACCGCTGATTTACTGG GCATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTG ATCGCTTACAGGCAGTGGATCTGGGAC AGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTGTG AAGGCTGAAGACCTGGCAATTTATTACT GTCAGCAATATTATAGCTATCCGTGGAC GTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATC AAA (SEQ ID NO:128)
Proteína	<u>EIQ</u> LQQSGPELVKPGT <u>SVK</u> VSC <u>KAS</u> GYSFTDYN <u>IY</u> WVKQSHGKS <u>LEW</u> IGYFDPYNGNTGYNQKFRG <u>KAT</u> LTVDKSSSTAFMHLSSLTSDDSAVYYC <u>CANY</u> <u>YRY</u> DDHAMDYWGQGT <u>SVTVSS</u> (SEQ ID NO:26)	DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMS <u>CKSS</u> QSL LYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKPLIYW <u>STRES</u> GVDPDRFTGSGSGTDFTLTIS <u>SVK</u> AEDLAIYYC <u>QQYYS</u> YPWT <u>FGG</u> GTKLEIK (SEQ ID NO:19)
F151 humanizado (HC3a/LC3a)		
Gen	CAGATTCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTG AAGAAACCTGGCGCCAGCGTGAAGGTGTCCTGC AAGGCCAGCGGCTACAGCTTACCGACTACAAC ATCTACTGGGTCCGACAGGCTCCAGGCCAGGGA CTGGAATGGATCGGCTACTTTCGACCCCTACAAC GGCAACACCGGCTACAACCAGAAGTTCGGGGC AGAGCCACCCTGACCGTGGACAAGAGCACCAGC ACCGCCTACATGGAAGTGCAGGAGCCTGAGAAGC GACGACACCGCGTGTACTACTGCGCCAACTAC TACAGATACGACGACCACGCCATGGACTACTGG GGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTGTCTCTCT (SEQ ID NO:129)	GACATCGTGATGACCCAGAGCCCCGACA GCCTGGCCGTGTCTCTGGGCGAGCGGGC CACCATCAACTGCAAGAGCAGCCAGAGC CTGCTGTACTCTAGCAACCAGAAGAAGT ACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGG CCAGCCCCCAAGCCCCTGATCTACTGG GCCAGCACCCGCGAGAGCGGCGTGCCCG ATAGATTTTCCGGCAGCGGCTCCGGCAC CGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCCTG CAGGCCGAGGACGTGGCCGTGTACTACT GCCAGCAGTACTACAGCTACCCCTGGAC CTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAATC AAG (SEQ ID NO:130)
Proteína	<u>QI</u> QLVQSGAEVKKPGASVKVSC <u>KAS</u> GYSFTDYN <u>IY</u> WVRQAPGQGLEWIGYFDPYNGNTGYNQKFRG <u>RAT</u> LTVDKSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYC <u>CANY</u> <u>YRY</u> DDHAMDYWGQGT <u>LVTVSS</u> (SEQ ID NO:24)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATIN <u>CKSS</u> QS LLYSSNQKNYLAWYQQKPGQPPKPLIYW <u>ASTRES</u> GVDPDRFSGSGSGTDFTLTIS <u>SSL</u> QAEDVAVYYC <u>QQYYS</u> YPWT <u>FGQ</u> GTKVEI K (SEQ ID NO:30)
Subrayado sencillo = región CDR; doble subrayado = aminoácidos característicos para identificar las CDRs		

Para el alineamiento de las cadenas ligera y pesada de F151 parental frente a variante humanizada de F151 (HC3a/LC3a) véase la Figura 3.

Ejemplo 7: Estructura cristalina del anticuerpo F151 humanizado frente a Ligando BRK1 Calidina y des-arg¹⁰-Calidina

Se determinaron las estructuras cristalinas de Fab de F151 humanizado (HC3a/LC3a) unido a Calidina o des-arg¹⁰-calidina y se analizaron las interacciones moleculares.

- 5 Se adquirió Calidina en polvo de Phoenix Pharmaceuticals (Cat. N.º 009-37). Para la generación de la proteína Fab, el ADN de la región VH de la cadena pesada (HC) HC3a del F151 humanizado se clonó en el pFF0366 del vector CH1 etiquetado 6XHis. El plásmido de la cadena ligera (LC) usado aquí era el mismo que el LC3a de F151 original usado en la humanización de F151 (véase el Ejemplo 5). Los dos plásmidos se cotransfectaron en células HEK293 de estilo libre para la expresión de Fab. La proteína Fab se purificó usando cobalto-resina, se cambió el tampón a MES 50 mM pH 6,0, NaCl 50 mM antes de ser concentrado hasta aproximadamente 9 mg/ml. La proteína Fab F151 purificada se mezcló con calidina en una proporción molar de 1:2 y se preparó para el cribado por cristalización. El cribado por cristalización se realizó con una amplia gama de condiciones. El mejor cristal se observó en las condiciones B10, B12 y G10 del HT PEG/ION del kit de cribado de Hampton Research. Los cristales se crioprotegieron con glicerol 20 % en tampón adecuado y se congelaron para la recopilación de datos de difracción. Los datos de difracción de rayos X para ambos complejos se recogieron en Canadian Light Source, línea de haz CMCF-08ID. El Rmerge para el complejo F151-KD es 8,9% e I/s(I) = 20,2, mientras que los del F151-DAKD son 7,7% y 18,5, respectivamente. La estructura F151-KD se resolvió por sustitución molecular en Phaser usando coordenadas Fab de 3QOS de la entrada PDB, tratando los dominios VL-VH y CL-CH1 como unidades independientes. La estructura se refinó en autoBuster con una resolución de 2,07 Å en el grupo espacial P2₁2₁2₁ a un Rfactor de 0,205 y un valor de Rfree de 0,228. La estructura F151-DAKD se resolvió utilizando las coordenadas F151-KD. La estructura se refinó en autoBuster con una resolución de 1,86 Å en el grupo espacial P2₁2₁2₁ a un Rfactor de 0,232 y un Rfree de 0,238.

Los mapas de densidad de electrones mostrados en las Figuras 4 y 5 representan la unión de calidina (KD) y Des-Arg¹⁰-calidina (DAKD) al Fab F151 y determinan inequívocamente las posiciones de cada aminoácido. Para la calidina, la densidad de electrones para el resto Arg¹⁰ del extremo C-terminal no está presente. Esto está de acuerdo con la observación de que DAKD, al que le falta el resto arginina C-terminal (mostrado en la Tabla 27 a continuación), se une igualmente bien a F151 como KD. Los valores de CI50 de F151 en el ensayo celular FDSS de neutralización hacia KD y DAKD son de 0,12 nM y 0,09 nM, respectivamente. En ambos casos, la densidad de electrones es más débil hacia los C-terminales de los péptidos. Dado que Phe⁹ en KD tiene una densidad de electrones ligeramente mejor que en DAKD, es posible que la presencia de la arginina adicional en el C-terminal de KD establezca el C-terminal de este péptido cuando se une a F151 aunque esta arginina en sí misma no es lo suficientemente estable como para ser observada por rayos X. Dado que las dos estructuras son esencialmente idénticas (rms entre KD y DAKD es 0,139 para átomos de C y 0,328 para todos los átomos), todas las discusiones siguientes se basan en la estructura F151-KD.

35 Tabla 27. Una lista seleccionada de péptidos de cinina

Nombre del péptido	SEQ ID NO:	Secuencia									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
KD (Calidina)	1	Lys	-Arg	-Pro	-Pro	-Gly	-Phe	-Ser	-Pro	-Phe	-Arg
DAKD (des-Arg ¹⁰ -Calidina)	2	Lys	-Arg	-Pro	-Pro	-Gly	-Phe	-Ser	-Pro	-Phe	
KLP (ortólogo KD de roedor)	3	Arg	-Arg	-Pro	-Pro	-Gly	-Phe	-Ser	-Pro	-Phe	-Arg
BK (Bradicinina)	5		Arg	-Pro	-Pro	-Gly	-Phe	-Ser	-Pro	-Phe	-Arg

KD está unido con su N-terminal enterrado en la interfaz entre las subunidades Fv de las cadenas ligera y pesada, como se muestra en la Figura 6. La interfaz entre las cadenas ligera y pesada está empaquetada con aminoácidos aromáticos, incluyendo Tyr-L42, Tyr-L93, Tyr-L100, Trp_L102, Phe-L104 y Tyr-H35, Trp-H47, Tyr-H50, Tyr-H99, Trp-H110, estabilizando los demás mediante el apilamiento y las interacciones hidrófobas. Los restos de cada una de las CDRs de cadenas ligeras y pesadas contribuyen a la unión. Los restos a lo largo de las cadenas ligera y pesada que participan en las interacciones con KD tal como se mapean en las CDRs se muestran en las Figuras 7 y 8. La CDR H3 de la cadena pesada es el bucle más largo y el más frecuentemente utilizado en las interacciones con KD, formando una cubierta lateral para KD. El bucle se estabilizó principalmente mediante interacciones con las otras dos CDRs, H1 y H2 de la cadena pesada, concretamente, puente salino entre Asp-H101 y Arg-H52 (estabilizando H1 y H3), interacción areno-H entre Tyr-H102 y Tyr-H54 (estabilizando H2 y H3), enlace H entre Asp-H108 y Tyr-H35 y enlace de H entre His-H105 y Tyr-L55 (estabilizando H3 y L2).

Comparando los restos que interactúan con KD entre los anticuerpos generados, se puede ver que hay similitud entre los anticuerpos, y algunos estaban más relacionados en el uso de aminoácidos particulares para la interacción KD que otros. Por ejemplo, en el F151 de la cadena ligera, C63 e I22 usan aminoácidos más similares en sus CDRs para unirse a KD, mientras que B21 e I54 son más similares. En la cadena pesada, F151 y C63 fueron sorprendentemente únicos entre sí y de B21, I22 e I54. Los tres últimos parecen formar un grupo en similitud. C63 es particularmente interesante en su cadena pesada, ya que la longitud del bucle en H2 y H3 es más diferente de los demás. Considerando el Fab como un conjunto, B21 e I54 estaban más estrechamente relacionados.

En la estructura cristalina, se encontró que KD está implicado en enlaces sistemáticos de hidrógeno e interacciones hidrófobas con el Fab. El N-terminal de KD está enterrado en el Fab y alberga interacciones más intensas, mientras que el C-terminal está esencialmente expuesto al disolvente. Excepto por los primeros 4 restos (Lys-Arg-Pro-Pro), los otros restos de KD se extienden gradualmente al disolvente en masa. El grupo amidinio de la cadena lateral de Lys1 está anclado por Glu-L61 (L: cadena ligera) a través de puentes salinos, mientras que el grupo amino del amino terminal de Lys 1 forma un puente salino con Asp-H108 (H: cadena pesada). El grupo amidinio de la cadena lateral de Lys1 también cuelga sobre el anillo aromático de Tyr-L55, implicado en interacciones de catión. Tales interacciones intensivas implicadas con Lys1 anclan firmemente el amino terminal de KD en el Fab. Esto también explica la importancia de Lys1 en la unión de KD a F151. Sin él (es decir, bradicinina), no se puede medir ninguna unión detectable a hF151 o F151. Al igual que Lys1, Arg2 interactúa con el Fab a través de un puente salino. El grupo guanidino de Arg2 interactúa con la cadena lateral de Asp-H104. La cadena lateral de Arg2 está también unida por H con el oxígeno del carbonilo de la cadena principal de Arg-H101. Además, el oxígeno de la cadena principal de Pro8 está unido por H con la cadena lateral de Arg-H101. Tyr-H102 está intercalado a mitad de camino entre Phe8 y Pro9, lo que implica interacciones hidrófobas con KD. Además de la interacción directa, también se observan numerosos enlaces de H mediados por agua entre KD y Fab. También es interesante observar que los restos de tirosina se usan con mayor frecuencia en la interacción en comparación con otros aminoácidos; 9 de los 16 restos marcados con asteriscos en las Figuras 7 y 8 son tirosinas. Todos los restos de F151 que rodean KD parecen desempeñar una función en la unión del ligando, excepto Asn-H33, que está cerca de la cadena lateral de Phe6 pero es incompatible en polaridad y carece de otras interacciones importantes. La sustitución con restos aromáticos/hidrófobos, tales como Trp o Tyr frente a la interacción con Phe8 parece ser una elección rápida si se considera la maduración de afinidad. Estos dos aminoácidos aromáticos se observan de hecho en otros anticuerpos (Trp en C63 y Tyr en B21, I22, I54). La Tabla 28 a continuación proporciona un análisis detallado de 16 restos de aminoácidos que interactúan con KD marcados en las Figuras 7 y 8 y expone las sustituciones funcionales que pueden realizarse en las regiones de CDR que no deberían interrumpir la unión al antígeno.

Tabla 28. Una lista de restos de aminoácidos encontrados alrededor de la bolsa de unión de KD, y sus funciones en la unión de KD y posibles sustituciones funcionales (restos de la cadena ligera en células de color gris y restos de la cadena pesada en células no sombreadas)

Resto	Función en la unión de KD o en la estabilización de la CDR	Sustitución funcional
Tyr-L31	<ul style="list-style-type: none"> • Interacciones hidrófobas con Pro4 en el borde • Junto con Tyr-L38 y Tyr-L98 forman tres planos ortogonales que rodean el giro de 90 grados de KD en Pro4 	<ul style="list-style-type: none"> • His para agregar un enlace de H con el N de la amida de Pro5 • Otros a.a. aromáticos, tal como Trp y Phe
Tyr-L38	<ul style="list-style-type: none"> • Apilamiento hidrófobo con Pro4 • Junto con Tyr-L31 y Tyr-L98 forman tres planos ortogonales que rodean el giro de 90 grados de KD en Pro4 	<ul style="list-style-type: none"> • His para agregar un enlace de H con el O del carbonilo de Arg2
Tyr-L55	<ul style="list-style-type: none"> • interacción catiónica con ion amidinio de la cadena lateral de Lys1 • Enlace de H con His-H105; el emparejamiento Tyr-L55-His-H105 añade estabilización entre los bucles L2 y H3 	<ul style="list-style-type: none"> • Trp para emparejarse con las mutaciones H105 de Gln, Asn, Glu o Asp (manteniendo el enlace de H); Otras variantes de His_H105 son Tyr y Ser. • Otros a.a. aromáticos, como Trp, His y Phe
Glu-L61	<ul style="list-style-type: none"> • Formar puentes salinos clave con la cadena lateral de Lys1 	<ul style="list-style-type: none"> • Asp, Gln, ASN (Asp se observa ya en B21 e I54, Figura 7)

Resto	Función en la unión de KD o en la estabilización de la CDR	Sustitución funcional
Tyr-L97	<ul style="list-style-type: none"> • Enlace de H con el N de amida de Trp-L56 • Formar bolsa para la cadena lateral extendida de Arg1 	<ul style="list-style-type: none"> • A.a. aromáticos como Phe o His (espacio demasiado ajustado para Trp)
Tyr-L98	<ul style="list-style-type: none"> • Junto con Tyr-L31 y Tyr-L38 forman tres planos ortogonales que rodean el giro de 90 grados de KD en Pro4 	<ul style="list-style-type: none"> • Otros a.a aromáticos, tal como Phe, Trp o His
Tyr-L100	<ul style="list-style-type: none"> • Formar una superficie de bolsa para Pro3 • Parte de la interfaz de agrupamiento de a.a aromáticos entre las cadenas L/H, que incluye además Tyr-L42, Tyr-L93, Trp_L102, Phe-L104 y Tyr-H35, Trp-H47, Tyr-H50, Tyr-H99, Trp-H110 • Apilamiento parcial con Tyr-H50 	<ul style="list-style-type: none"> • A.a aromático, como Phe (mejores interacciones hidrófobas con Pro3) • Otras variantes vistas son Thr (en B21 e I54) y His (en I22)
Trp-L102	<ul style="list-style-type: none"> • Parte de la interfaz de agrupaciones de a.a. aromáticos entre las cadenas L/H • Apilamiento con Trp-H47 	<ul style="list-style-type: none"> • Otros a.a aromáticos, tal como Tyr (en C63 y B21), Phe y His • Otros restos hidrófobos, tal como L (en I22)
Asn-H33	<ul style="list-style-type: none"> • Cerca de la cadena lateral Phe6 pero incompatible en polaridad, ni se observan otras funciones; puede ser una diana para la maduración de afinidad 	<ul style="list-style-type: none"> • Reemplazar con a.a. aromáticos/hidrófobos, como Trp (visto en C63) o Tyr (visto en B21, I22, I54)
Asp-H52	<ul style="list-style-type: none"> • Puente salino con Arg-H101, estabilizando los bucles H1 y H3 	<ul style="list-style-type: none"> • Mutar como un par con Arg-H101 a a.a. cargados inversamente, tales como Arg-H52/Asp-H101, o un par de a.a. hidrófobos a.a. (Leu, Ile, Val, Met, Phe, Tyr, Trp, Ala) para formar un agrupamiento con Phe6 de KD
Tyr-H54	<ul style="list-style-type: none"> • Cerca de Pro8 pero sin interacciones específicas • Cerca de Arg-H101, pero sin interacciones de carga 	<ul style="list-style-type: none"> • Mutado a a.a. cargados negativamente para estabilizar Arg-H101, tal como D o E (observado en B21, I22 e I54) o N o Q, también proporciona enlace de H con el O del carbonilo de Pro8 (una Lys en C63, que puede ser invertido en la carga Glu)
Tyr-H99	<ul style="list-style-type: none"> • Parte de la interfaz aromática entre las cadenas H y L • Enlace de H con Asn-H33 • Espacio reducido 	<ul style="list-style-type: none"> • Mutar a a.a. aromático pequeño excepto W, tal como Phe y His
Arg-H101	<ul style="list-style-type: none"> • Enlace de H con amida de Pro8 • soportado por Asp-H52 (puente salino) 	<ul style="list-style-type: none"> • Mutar como un par con Asp-H52 a a.a. cargado inversamente, tal como Arg-H52/Asp-H101, o un par de a.a. hidrófobos para formar una agrupación con Phe6 de KD
Tyr-H102	<ul style="list-style-type: none"> • Intercalación a medio camino en Phe9 y Pro8, interacciones hidrófobas con KD 	<ul style="list-style-type: none"> • Phe puede ser mejor, Trp o His también puede estar bien
Asp-H104	<ul style="list-style-type: none"> • Resto clave para el puente salino con Arg2 	<ul style="list-style-type: none"> • Glu para mantener el puente salino con Arg2 • A.a. mayores para llenar el hueco de Pro3, tal como Tyr como se ve en B21, I22 e I54

Resto	Función en la unión de KD o en la estabilización de la CDR	Sustitución funcional
Asp-H108	<ul style="list-style-type: none"> • Resto clave para el puente salino con -NH3+ N-terminal de KD • Enlace de H con Tyr-H33, estabilizando el bucle H3 • Resto conservado! No en CDR 	<ul style="list-style-type: none"> • Glu

5 El análisis del epítipo conformacional de calidina (KD) o des-Arg¹⁰-Calidina (DAKD) reveló que adopta una conformación de "trenzado Pro4". Como se muestra en la Figura 17, un sello distintivo de la conformación "trenzado Pro 4" es un giro cerrado de tipo II en la estructura principal del polipéptido de la cadena principal de KD o DAKD en Prolina 4 (véase Richardson JS. "The anatomy and taxonomy of protein structure". Adv Protein Chem. 1981; 34: 167-339, que se incorpora por referencia en el presente documento). La conformación de "trenzado Pro 4" puede definirse adicionalmente por todos o sustancialmente todos los aminoácidos restantes de KD (1-2 y 6-9) o DAKD que adoptan repeticiones de una forma sigmoidea que alinean las cadenas laterales hidrófobas en un modo de apilamiento espacial.

10 Ejemplo 8: Farmacología *in vivo* de anticuerpos anti-BKR1-ligando en modelos de dolor

Los ejemplos de la presente divulgación ilustran la eficacia *in vivo* de anticuerpos receptor anti-BKR1-ligando en diferentes modelos preclínicos de dolor agudo y crónico según los procedimientos modificados descritos en (a) Saddi GM y Abbott FV., Pain (2000), 89: 53-63; (b) Chen y col., Molecular Pain (2010), 2: 6-13 y (c) Bennett GJ y Xie YK., Pain (1988), 33: 87-107.

15 Animales

Los experimentos se llevaron a cabo utilizando ratones OF1 machos adultos (20-30 gr) para estudios de formalina y ratones C57Bl/6J machos adultos (25-30 gr) para estudios tanto con CFA como con CCI. Los ratones se mantuvieron en un espacio de temperatura controlada en un ciclo de luz-oscuridad de 12 h. Alimentos y agua se proporcionaron *ad libitum*. Para todos los experimentos, los ratones se aclimataron a la sala de laboratorio durante al menos 2 horas antes de la prueba. No se realizó aleatorización en los estudios. Los experimentadores que realizan las pruebas de comportamiento no fueron cegados en el tratamiento; sin embargo, no estaban al tanto de la hipótesis del estudio. Todos los procedimientos han sido aprobados por el "Comité d'Expérimentation pour la Protection de l'Animal de Laboratoire" (Comité para el Cuidado y Uso de los Animales) de Investigación y Desarrollo de Sanofi-Aventis y se llevaron a cabo de conformidad con la legislación francesa (Decreto n ° 87-848 - 19 de octubre de 1987- y decisión -19 de abril de 1988) aplicando la Directiva europea 86/609/CEE.

A. Dolor inflamatorio agudo inducido por formalina

La prueba de formalina se usó para medir el dolor nociceptivo e inflamatorio. De hecho, la inyección intraplantar de formalina induce una respuesta conductual nociceptiva aguda inicial (0-12 minutos), seguida de una segunda respuesta mediada por la inflamación (15-45 minutos), que se atribuye a la excitabilidad de la médula espinal.

30 Se diluyó formaldehído (37 %, Sigma) en solución salina (v/v) para obtener una concentración de formaldehído al 2,5% (es decir, concentración de formalina \cong 6,25%). A los ratones se les sujetó con cuidado y se les inyectaron 20 μ l de esta solución por vía subcutánea en la parte dorsal de una pata trasera. Las respuestas conductuales se puntuaron inmediatamente después de la inyección de formalina, después a intervalos de 3 minutos durante 45 minutos de la siguiente manera: (0): soporte normal del peso de la pata inyectada; (1): pata inyectada descansando ligeramente sobre el suelo; (2) elevación-alzado de la pata inyectada; (3): lamiendo o mordisqueando la pata inyectada. El tamaño de los grupos fueron 11-12 ratones OF1 machos.

Se representaron en un gráfico las puntuaciones frente al tiempo y se calcularon las áreas bajo las curvas (AUC) a partir de las puntuaciones medias (\pm SEM) tanto para las fases temprana (0-12 min) como tardía (15-45 min). La inversión de los comportamientos similares al dolor se expresó como un cambio en la AUC en %.

40 El anticuerpo EE1 inhibió el comportamiento similar al dolor en la fase tardía de la prueba de formalina en ratones OF1 macho. El anticuerpo EE1, cuando se administró por vía intravenosa 48 horas antes de la inyección intraplantar de formalina, mostró una inversión dependiente de la dosis del comportamiento similar al dolor solo en la fase tardía con una Dosis Eficaz Mínima (MED) = 2,5 mg/kg, como se muestra en la Figura 9. De hecho, cuando se administró a 2,5, 10 y 30 mg/kg, el EE1 invirtió la fase tardía en 35 ± 5 %, 33 ± 5 % y 45 ± 7 %, respectivamente, como se muestra en la Tabla 29.

Por el contrario, F151 inhibe débilmente el comportamiento similar al dolor en la fase tardía de la prueba de

formalina cuando se administra 48 horas antes de la inyección intraplantar de formalina. De hecho, cuando se administró a 2,5 y 10 mg/kg, F151 invirtió la fase tardía en $15 \pm 7 \%$ y $21 \pm 5 \%$, respectivamente, como se muestra en la Tabla 29.

5 Tabla 29. Efecto de los anticuerpos EE1 y F151 sobre el comportamiento similar al dolor inducido por formalina en ratones OF1 macho

Grupo	Dosis (mg/kg, i.v.)	A.U.C. \pm SEM (15-45 min)	Inversión del comportamiento similar al dolor (en %) \pm SEM (15-45 min)
1B7.11 (EE1) de control de isotipo	30	$63,6 \pm 2,9$	0 ± 5
EE1	2,5	$41,6 \pm 3,4$ (***)	35 ± 5
	10	$42,9 \pm 2,9$ (***)	33 ± 5
	30	$36,5 \pm 4,3$ (***)	45 ± 7
1B7.11 (F151) de control de isotipo	10	$57,3 \pm 3$	0 ± 5
F151	2,5	$48,9 \pm 3,8$ (NS)	15 ± 7
	10	$45,0 \pm 2,8$ (*)	21 ± 5

* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$: Se usó la prueba de la *t* de Student frente a un control adecuado.
NS: no significativo

B. Dolor inflamatorio crónico inducido por CFA (adyuvante completo de Freund)

10 Se indujo inflamación crónica con poca anestesia breve (isoflurano, 3 %) mediante una administración intraplantar de 25 μ l de Adyuvante Completo de Freund (CFA) que contenía 1 μ g/ μ l de tuberculosis por *Micobacteria* destruida por calor en aceite mineral y monooleato de manida (Sigma). El tamaño de los grupos eran 8 ratones C57Bl/6 machos.

El anticuerpo EE1 se administró por vía intravenosa 22 horas después de la inyección de CFA intraplantar a 2,5 y 30 mg/kg y las hipersensibilidades mecánicas y térmicas se evaluaron en el Día 1 (D1), Día 4 (D4) y Día 7 (D7) tras la administración intraplantar de CFA.

15 B1. Hipersensibilidad mecánica

La hipersensibilidad mecánica se evaluó midiendo la frecuencia de la respuesta de retraimiento (FR, en %) después de 10 aplicaciones de un filamento Von Frey de 0,6 g (Bioseb, Francia) en la superficie plantar de la pata inyectada.

Para investigar la eficacia del anticuerpo EE1 en el comportamiento similar al dolor, calculamos la inversión de la hipersensibilidad mecánica (en %) de la siguiente manera:

20 Las inversiones porcentuales se calcularon como $(\text{Media de FR-control de isotipo}_{\text{postdosis}} - \text{FR-lpsi}_{\text{postdosis}}) / (\text{Media de FR-control de isotipo}_{\text{postdosis}} - \text{Media FR-sham}_{\text{postdosis}})$ para cada ratón.

25 En D1, D4 y D7 después de inyección intraplantar de CFA, se observó un aumento significativo de la FR para los filamentos de Von Frey en el grupo tratado con 1B7.11 de control de isotipo en comparación con el grupo sin tratamiento previo, mostrando el desarrollo de hipersensibilidad mecánica. El anticuerpo EE1, cuando se administró por vía intravenosa 22 horas después del CFA intraplantar, fue capaz de disminuir significativamente esta FR a los diferentes tiempos estudiados en comparación con el obtenido en el grupo tratado con el 1B7.11 de control del isotipo. (Figura 10).

La inversión de la hipersensibilidad mecánica fue $41 \pm 8\%$ y $22 \pm 8\%$ en D1, $36 \pm 9\%$ y $32 \pm 9\%$ en D4 y $27 \pm 10\%$ y $50 \pm 9\%$ en D7 para una dosis de 2,5 mg/kg y 30 mg/kg de administración intravenosa del anticuerpo EE1, respectivamente (Tabla 30).

5 Tabla 30. Efecto del anticuerpo EE1 sobre la hipersensibilidad mecánica inducida por CFA en ratones C57Bl/6 machos

Grupo	Dosis (mg/kg, i.v.)	Día 1 después de CFA		Día 4 después de CFA		Día 7 después de CFA	
		FR (%)	% efecto	FR (%)	% efecto	FR (%)	% efecto
Sin tratamiento	n.a.	$41,3 \pm 4,4$	100 ± 11	$43,8 \pm 2,6$	100 ± 8	45 ± 5	100 ± 13
1B7.11 de control de isotipo	30	$81,3 \pm 4,4$	0 ± 11	$78,8 \pm 3$	0 ± 8	$82,5 \pm 2,5$	0 ± 7
EE1	2,5	$65 \pm 3,3 (**)$	41 ± 8	$66,3 \pm 3,2 (*)$	36 ± 9	$72,5 \pm 3,7 (*)$	27 ± 10
	30	$72,5 \pm 3,1 (*)$	22 ± 8	$67,5 \pm 3,1 (*)$	32 ± 9	$63,8 \pm 3,2 (***)$	50 ± 9

FR: Frecuencia de Respuesta (en %) \pm SEM, % del efecto \pm SEM, n.a. no aplicable

* p <0,05, ** p <0,01 y *** p <0,001, ANOVA de dos vías con el tiempo como medida repetida seguida de la prueba de Dunnett para el factor grupo para cada nivel de factor tiempo

B2. Hipersensibilidad térmica

Para la hipersensibilidad térmica, se evaluaron medidas de Latencias de Retraimiento de la Pata (PWL, en segundos) en respuesta a un calor radiante usando un aparato plantar (IITC, Woodland Hills, EE.UU.).

- 10 Para investigar la eficacia del anticuerpo EE1 en el comportamiento similar al dolor, se calculó la inversión de la hipersensibilidad térmica (en %) de la siguiente manera:

Las inversiones porcentuales se calcularon como $(PWL_{\text{postdosis}} - \text{Media del Control de isotipo}_{\text{postdosis}}) / (\text{Media de control de isotipo}_{\text{predosis}} - \text{Media del control de isotipo}_{\text{postdosis}})$ para cada ratón.

- 15 Las hipersensibilidades térmicas no fueron diferentes entre todos los grupos al inicio, antes de la inyección intraplantar de CFA (datos no mostrados).

En D1, D4 y D7 después de la inyección intraplantar de CFA, se observó una disminución significativa en la latencia de retraimiento de pata de la pata inyectada en el grupo de ratones tratados con 1B7.11 de control de isotipo, demostrando que CFA inducía una hipersensibilidad térmica (datos no mostrados).

- 20 El anticuerpo EE1, administrado por vía intravenosa 22 horas después de la inyección de CFA intraplantar (es decir, en el Día 1 después de la inyección de CFA intraplantar), y no fue capaz de aumentar la Latencia del Retraimiento de la Pata en el D1, cualquiera que fuera la dosis ensayada (Figura 11). Sin embargo, el EE1 aumentó significativamente la Latencia del Retraimiento de la Pata en el D4 y este efecto también estuvo presente en el D7 (Figura 11).

- 25 La inversión de la hipersensibilidad térmica fue $41 \pm 15\%$ y $58 \pm 21\%$ en D4 y $46 \pm 10\%$ y $52 \pm 17\%$ en D7 para una administración intravenosa de EE1 de 2,5 mg/kg y 30 mg/kg, respectivamente (Tabla 31).

Tabla 31. Efecto del anticuerpo EE1 sobre la hipersensibilidad térmica inducida por CFA en ratones C57Bl/6 machos

Grupo	Dosis (mg/kg, i.v.)	Día 1 después de CFA		Día 4 después de CFA		Día 7 después de CFA	
		PWL (s)	% efecto	PWL (s)	% efecto	PWL (s)	% efecto
1B7.11 de control del isotipo	30	3,3 ± 0,3	n.a.	4,1 ± 0,1	n.a.	3,6 ± 0,3	n.a.
EE1	2,5	3,1 ± 0,3	-7 ± 10	5,2 ± 0,4	41 ± 15	5,0 ± 0,3 (*)	46 ± 10
	30	2,6 ± 0,2	-20 ± 5	5,7 ± 0,6 (*)	58 ± 21	5,2 ± 0,6 (*)	52 ± 17

PWL: Latencia de retraimiento de la pata ± SEM, % del efecto ± SEM, n.a. no aplicable

* p <0,05, ANOVA de dos vías con el tiempo como medida repetida seguida de la prueba de Dunnett para el factor grupo para cada nivel de factor tiempo

C. Dolor de tipo neuropático inducido por CCI (lesión por constricción crónica) (modelo de Bennett)

5 Se usó el modelo de CCI como modelo de lesión del nervio periférico. En resumen, los ratones fueron anestesiados con isoflurano (3 %) y el nervio ciático derecho se expuso al nivel de la mitad del muslo a través de una pequeña incisión. Se colocaron tres ligaduras flojas de catgut cromado 6.0 (Ethicon) en un espacio de 1 mm alrededor del nervio ciático. El procedimiento quirúrgico se completó al cerrar los músculos y la piel. El día de la cirugía de la CCI se consideró como Día 0. Los tamaños de los grupos fueron 6-10 ratones C57Bl/6 machos.

10 El anticuerpo EE1 se administró por vía intravenosa de 2,5 y 30 mg/kg el Día 11 después de la cirugía y las hipersensibilidades mecánicas y térmicas se evaluaron el Día 12 (D12), el Día 14 (D14) y el Día 18 (D18) después de la cirugía, que correspondió al Día 1 (D1), Día 3 (D3) y Día 7 (D7) después del tratamiento.

C1. Hipersensibilidad mecánica

15 La hipersensibilidad mecánica se evaluó midiendo los umbrales de retraimiento de la pata trasera (tanto en las patas lesionadas [es decir, Ipsi] como no lesionadas [es decir Contra]) a un estímulo de presión creciente (en g) usando un Estesiómetro Plantar Dinámico (Ugo-Basile, Italia); se aplicó una varilla de acero a las patas traseras de los ratones con una fuerza creciente (5 gramos en 10 segundos).

Para investigar la eficacia del anticuerpo EE1 en el comportamiento similar al dolor, se determinó la inversión de la hipersensibilidad mecánica de la siguiente manera:

Las inversiones porcentuales se calcularon como $(Ipsi_{postdosis} - Ipsi_{predosis}) / (Contra_{predosis} - Ipsi_{predosis})$ para cada ratón.

20 Tras la cirugía, los ratones operados desarrollaron una fuerte sensibilización al estímulo mecánico en la pata lesionada, mientras que la pata no lesionada no se vio afectada. En el Día 11, la sensibilización mecánica en la pata lesionada alcanzó un tope (datos no mostrados).

25 El anticuerpo EE1, administrado por vía intravenosa el Día 11 demostró una ligera tendencia a invertir la hipersensibilidad mecánica inducida por CCI en los D12, D14 y D18 con $15,2 \pm 4,9\%$ y $15,2 \pm 5,7\%$ en el D12, $26,8 \pm 5,7\%$ y $25,7 \pm 4,5\%$ en el D14 y $30,3 \pm 7,1\%$ y $20,8 \pm 5,9\%$ en el D18, a 2,5 y 30 mg/kg respectivamente (Figura 12 y Tabla 32).

Tabla 32. Efecto del anticuerpo EE1 sobre la hipersensibilidad mecánica inducida por CCI en ratones C57Bl/6 machos

Grupo	Dosis (mg/kg, i.v.)	Día 12 después de CCI % efecto ± SEM	Día 14 después de CCI % efecto ± SEM	Día 18 después de CCI % efecto ± SEM
1B7.11 de control de isotipo	30	0,2 ± 3,0	1,8 ± 4,3	18,1 ± 6,6
EE1	2,5	15,2 ± 4,9	26,8 ± 5,7 (**)	30,3 ± 7,1
	30	15,2 ± 5,7	25,7 ± 4,5 (*)	20,8 ± 5,9

* p <0,05 y ** p <0,01 ANOVA de dos vías con el tiempo como medida repetida seguida de la prueba de Dunnett para el factor grupo para cada nivel de factor tiempo (estadísticas realizadas en valores ipsi Delta)

C2. Hipersensibilidad térmica

5 Para la hipersensibilidad térmica, se evaluaron las medidas de las latencias de retraimiento de la pata (en segundos) en respuesta a un calor radiante utilizando un aparato plantar (IITC, Woodland Hills, EE.UU.) en la pata trasera inyectada.

Para investigar la eficacia del anticuerpo EE1 en el comportamiento similar al dolor, se calculó la inversión de la hipersensibilidad térmica (en %) de la siguiente manera:

10 Las inversiones porcentuales se calcularon como $(Ipsi_{postdosis} - Media\ del\ control\ de\ isotipo_{postdosis}) / (Media\ del\ sin\ tratamiento_{postdosis} - Media\ del\ control\ de\ isotipo_{postdosis})$ para cada ratón.

Tras la cirugía, los ratones operados desarrollaron una gran sensibilización al estímulo térmico en la pata lesionada, mientras que la pata no lesionada no se vio afectada. En el día 11, la sensibilización térmica en la pata lesionada alcanzó un tope (datos no mostrados).

15 El anticuerpo EE1, administrado por vía intravenosa el día 11, no aumentó significativamente la Latencia de Retraimiento de la Pata de la pata lesionada en D12, incluso aunque se observara una tendencia. Sin embargo, a partir del D14, el anticuerpo EE1 aumentó significativamente el Retraimiento de la Pata (Figura 13).

20 La inversión de la hipersensibilidad térmica fue $41 \pm 16\%$ y $56 \pm 24\%$ en D12 y $51 \pm 16\%$ y $98 \pm 48\%$ en D14 y $78 \pm 19\%$ y $84 \pm 22\%$ en el D18, para una administración intravenosa de 2,5 mg/kg y 30 mg/kg de anticuerpo EE1, respectivamente (Tabla 33).

Tabla 33. Efecto del anticuerpo EE1 sobre la hipersensibilidad térmica inducida por CCI en ratones C57Bl/6 machos

Evaluación cinética

Grupo	Dosis (mg/kg, i.v.)	Día 12 después de CCI		Día 14 después de CCI		Día 18 después de CCI	
		PWL (s)	% efecto	PWL (s)	% efecto	PWL (s)	% efecto
Sin tratamiento	n.a.	6,3 ± 0,5	100 ± 19	6,2 ± 0,4	100 ± 14	6,1 ± 0,5	100 ± 17
1B7.11 de control de isotipo	30	3,8 ± 0,2	0 ± 7	3,4 ± 0,2	0 ± 5	3,4 ± 0,2	0 ± 7

Grupo	Dosis (mg/kg, i.v.)	Día 12 después de CCI		Día 14 después de CCI		Día 18 después de CCI	
		PWL (s)	% efecto	PWL (s)	% efecto	PWL (s)	% efecto
EE1	2,5	4,8 ± 0,4	41 ± 16	4,8 ± 0,5	51 ± 16	5,5 ± 0,5 (*)	78 ± 19
	30	5,2 ± 0,6	56 ± 24	6,1 ± 1,3(**)	98 ± 48	5,7 ± 0,6 (**)	84 ± 22

PWL: Latencia de retraimiento de la pata ± SEM, % efecto ± SEM, n.a. no aplicable

* p <0,05 y ** p <0,01 ANOVA de dos vías con el tiempo como medida repetida seguida de la prueba de Dunnett para el factor grupo para cada nivel de factor tiempo

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> SANOFI
- <120> ANTICUERPOS FRENTE A LIGANDOS DEL RECEPTOR B1 DE BRADICININA
- 5 <130> 543895 SA9-029PC
- <140> Nueva Aplicación
- <141> Coincidentemente adjuntos
- <150> 61/616,845
- <151> 2012-03-28
- 10 <150> FR 1350953
- <151> 2013-02-04
- <160> 137
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- 15 <211> 10
- <212> PRT
- <13> Homo sapiens
- <400> 1
- Lys Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe Arg**
- 1 5 10
- 20 <210> 2
- <211> 9
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 2
- Lys Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe**
- 25 1 5
- <210> 3
- <211> 10
- <212> PRT

<213> Mus musculus
 <400> 3
Arg Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe Arg
 1 5 10
 <210> 4
 5 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 4
Arg Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe
 1 5
 10 <210> 5
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Desconocido
 <220>
 15 <221> origen
 <223> /anotar="Descripción de desconocido: Péptido Bradicinina"
 <400> 5
Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe Arg
 1 5
 <210> 6
 20 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Desconocido
 <220>
 <221> origen
 25 <223> /anotar="Descripción de desconocido: Péptido des-Arg⁹-Bradicinina"
 <400> 6
Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe
 1 5
 <210> 7
 <211> 11
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <221> origen
 <223> /anotar="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido de consenso sintético"
 35 <220>

- <221> VARIANTE
 <222> (1)..(1)
 <223> /sustituir="Phe" o "His"
 <220>
- 5 <221> Características_diversas
 <222> (1)..(1)
 <223> /anotar="El resto dado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en las anotaciones para dicha posición"
 <220>
- 10 <221> VARIANTE
 <222> (3)..(3)
 <223> /sustituir="Asp" o "Ala" o "Val" o "Leu" o "Ile" o "Met" o "Phe" o "Tyr" o "Trp"
 <220>
 <221> VARIANTE
- 15 <222> (4)..(4)
 <223> /sustituir="Phe" o "Trp" o "His"
 <220>
 <221> Características_diversas
 <222> (3)..(4)
- 20 <223> /anotar="El resto dado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en las anotaciones para dichas posiciones"
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (6)..(6)
- 25 <223> /sustituir="Glu" o "Tyr"
 <220>
 <221> Características_diversas
 <222> (6)..(6)
- 30 <223> /anotar="El resto dado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en las anotaciones para dicha posición"
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (10)..(10)
 <223> /sustituir="Glu"
- 35 <220>
 <221> Características_diversas
 <222> (10)..(10)
 <223> /anotar="El resto dado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquél en la anotación para dicha

posición"

<400> 7

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

<210> 8

5 <211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> origen

10 <223> /anotar="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido de consenso sintético"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (3)..(3)

<223> /sustituir="Arg" o "Ala" o "Val" o "Leu" o "Ile" o "Met" o "Phe" o "Tyr" o "Trp"

15 <220>

<221> Características_diversas

<222> (3)..(3)

<223> /anotar="El resto dado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en las anotaciones para dicha posición"

20 <220>

<221> VARIANTE

<222> (5)..(5)

<223> /sustituir="Asp" o "Glu" o "Asn" o "Gln"

<220>

25 <221> Características_diversas

<222> (5)..(5)

<223> /anotar="El resto dado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en las anotaciones para dicha posición"

<400> 8

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

30 Gly

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

35 <220>

- <221> origen
<223> /anotar="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido de consenso sintético"
<220>
<221> VARIANTE
- 5 <222> (8)..(8)
<223> /sustituir="Trp" o "Tyr"
<220>
<221> Características_diversas
<222> (8)..(8)
- 10 <223> /anotar="El resto dado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en las anotaciones para dicha posición"
<400> 9
Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr Asn Ile Tyr
1 5 10
<210> 10
- 15 <211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<221> origen
- 20 <223> /anotar="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido de consenso sintético"
<220>
<221> VARIANTE
<222> (3)..(3)
<223> /sustituir="Phe" o "His"
- 25 <220>
<221> VARIANTE
<222> (4)..(4)
<223> /sustituir="Phe" o "His" o "Trp"
<220>
- 30 <221> Características_diversas
<222> (3)..(4)
<223> /anotar="El resto dado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en las anotaciones para dichas posiciones"
<220>
- 35 <221> VARIANTE
<222> (6)..(6)
<223> /sustituir="Phe" o "Thr" o "His"

- <220>
 <221> Características_diversas
 <222> (6)..(6)
 <223> /anotar="El resto dado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en las anotaciones para dicha posición"
 5 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (8)..(8)
 <223> /sustituir="Tyr" o "Phe" o "His" o "Leu"
 10 <220>
 <221> Características_diversas
 <222> (8)..(8)
 <223> /anotar="El resto dado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en las anotaciones para dicha posición"
 15 <400> 10
Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Trp Thr
1 5
 <210> 11
 <211> 6
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <221> origen
 <223> /anotar="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido de consenso sintético"
 <220>
 25 <221> VARIANTE
 <222> (6)..(6)
 <223> /sustituir="Asp" o "Gln" o "Asn"
 <220>
 <221> Características_diversas
 30 <222> (6)..(6)
 <223> /anotar="El resto dado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en las anotaciones para dicha posición"
 <400> 11
Trp Ala Ser Thr Arg Glu
1 5
 35 <210> 12
 <211> 17
 <212> PRT

- <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <221> origen
 <223> /anotar="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido de consenso sintético"
- 5 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (8)..(8)
 <223> /sustituir="His" o "Tyr" o "Phe"
 <220>
- 10 <221> Características_diversas
 <222> (8)..(8)
 <223> /anotar="El resto dado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en las anotaciones para dicha posición"
 <220>
- 15 <221> VARIANTE
 <222> (15)..(15)
 <223> /sustituir="Tyr"
 <220>
 <221> Características_diversas
- 20 <222> (15)..(15)
 <223> /anotar="El resto dado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquél en la anotación para dicha posición"
 <400> 12
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Lys | Ser | Ser | Gln | Ser | Leu | Leu | Trp | Ser | Ser | Asn | Gln | Lys | Asn | His | Leu |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
- Ala**
- 25 <210> 13
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 13
- | | | | | | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Tyr | Tyr | Arg | Tyr | Asp | Asp | His | Ala | Met | Asp | Tyr |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | |
- 30 <210> 14
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
- 35 <400> 14

ES 2 673 869 T3

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

Gly

<210> 15

<211> 10

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 15

Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr Asn Ile Tyr
 1 5 10

<210> 16

<211> 9

10 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 16

Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Trp Thr
 1 5

<210> 17

15 <211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 17

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
 1 5

20 <210> 18

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 18

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

25 Ala

<210> 19

<211> 120

<212> PRT

<213> Mus musculus

30 <400> 19

ES 2 673 869 T3

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

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

Asn Ile Tyr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

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

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

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

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

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 20

<211> 120

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> origen

<223> /anotar="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"

10 <400> 20

ES 2 673 869 T3

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

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

Asn Ile Tyr Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

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

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

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 21

<211> 120

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> origen

<223> /anotar="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"

<400> 21

ES 2 673 869 T3

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

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

Asn Ile Tyr Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

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

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

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 22

<211> 120

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> origen

<223> /anotar="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"

<400> 22

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

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

Asn Ile Tyr Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Phe Asp Pro Tyr Asn Gly Asn Thr Gly Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

10

ES 2 673 869 T3

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

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

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

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 23

<211> 120

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> origen

<223> /anotar="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"

<400> 23

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

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

Asn Ile Tyr Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

Met His Leu Ser Ser Lys Thr Ser Glu Glu Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

10 Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 24

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

ES 2 673 869 T3

<221> origen

<223> /anotar="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"

<400> 24

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

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

Asn Ile Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

5 <210> 25

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <221> origen

<223> /anotar="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"

<400> 25

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

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

Asn Ile Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Tyr Phe Asp Pro Tyr Asn Gly Asn Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe

ES 2 673 869 T3

50

55

60

Arg Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 26

<211> 113

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 26

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
20 25 30

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

Ser Pro Lys Pro Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

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

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

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

Lys

<210> 27

<211> 113

10 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> origen

<223> /anotar="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"

ES 2 673 869 T3

<400> 27

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

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

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

Ser Pro Lys Pro Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

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

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

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

Lys

<210> 28

<211> 113

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> origen

<223> /anotar="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"

10 <400> 28

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

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

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

Ser Pro Lys Pro Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

ES 2 673 869 T3

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

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

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

Lys

<210> 29

<211> 113

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> origen

<223> /anotar="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"

<400> 29

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

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

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

Ser Pro Lys Pro Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

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

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

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

10 Lys

<210> 30

<211> 113

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<221> origen

ES 2 673 869 T3

<223> /anotar="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"

<400> 30

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

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

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

Pro Pro Lys Pro Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

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

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

Tyr Tyr Ser Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 31

5 <211> 113

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> origen

10 <223> /anotar="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"

<400> 31

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

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

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

ES 2 673 869 T3

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

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

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

Tyr Tyr Ser Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 32

<211> 11

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 32

Trp Glu Tyr Asp Gly Tyr Tyr Asp Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 33

<211> 17

10 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 33

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

Gly

<210> 34

15 <211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 34

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr Tyr Leu His
1 5 10

20 <210> 35

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 35

25 Leu Gln Gly Thr His Phe Pro Tyr Thr
1 5

ES 2 673 869 T3

<210> 36

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

5 <400> 36

Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser
1 5

<210> 37

<211> 16

<212> PRT

10 <213> Mus musculus

<400> 37

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

<210> 38

<211> 120

15 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 38

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

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

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

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

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

Leu His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Phe
85 90 95

Asn Ala Trp Glu Tyr Asp Gly Tyr Tyr Asp Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 39

20 <211> 112

<212> PRT

ES 2 673 869 T3

<213> Mus musculus

<400> 39

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
20 25 30

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

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ile Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Gly
85 90 95

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

<210> 40

5 <211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 40

Glu Asp Tyr Gly Gly Asp Tyr
1 5

10 <210> 41

<211> 19

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 41

Glu Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu Ser
1 5 10 15

15 Val Lys Gly

<210> 42

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

20 <400> 42

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Trp Met Asn
1 5 10

ES 2 673 869 T3

<210> 43

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

5 <400> 43

Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 44

<211> 17

<212> PRT

10 <213> Mus musculus

<400> 44

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Ser Asp Gln Arg Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 45

<211> 118

15 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 45

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

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

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

Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser
65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr
85 90 95

Tyr Cys Ile Gly Glu Asp Tyr Gly Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 46

20 <211> 113

ES 2 673 869 T3

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 46

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
20 25 30

Ser Asp Gln Arg Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Ser Gly Gln
35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

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

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

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

Lys

5 <210> 47

<211> 12

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 47

10 Phe Glu Tyr Asp Gly Asn Tyr Ser Pro Leu Asp Phe
1 5 10

<210> 48

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

15 <400> 48

Trp Val Asp Pro Glu Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Ala Pro Lys Phe Gln
1 5 10 15

<210> 49

<211> 10

<212> PRT

20 <213> Mus musculus

<400> 49

ES 2 673 869 T3

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr Tyr Met His
 1 5 10
 <210> 50
 <211> 9
 <212> PRT
 5 <213> Mus musculus
 <400> 50
 Gln Asn Asp His Ser Tyr Pro Leu Thr
 1 5
 <210> 51
 <211> 7
 10 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 51
 Gly Ala Ser Thr Arg Glu Ser
 1 5
 <210> 52
 15 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 52
 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
 1 5 10 15
 Ala
 20 <210> 53
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 53
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Ser Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Trp Val Asp Pro Glu Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Ala Pro Lys Phe
 50 55 60
 25 Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80

ES 2 673 869 T3

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

Asn Ala Phe Glu Tyr Asp Gly Asn Tyr Ser Pro Leu Asp Phe Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 54

<211> 113

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 54

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

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

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

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

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

Asp His Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
100 105 110

Lys

<210> 55

<211> 12

10 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 55

Phe Glu Tyr Asp Gly Asn Tyr Ser Pro Leu Asp Phe
1 5 10

<210> 56

15 <211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

ES 2 673 869 T3

<400> 56

Trp Val Asp Pro Glu Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Ala Pro Lys Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 57

<211> 10

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 57

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr Tyr Met His
 1 5 10

<210> 58

10 <211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 58

Met Gln Gly Thr His Phe Pro Tyr Thr
 1 5

15 <210> 59

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 59

20 Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser
 1 5

<210> 60

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

25 <400> 60

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

<210> 61

<211> 121

<212> PRT

30 <213> Mus musculus

<400> 61

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

ES 2 673 869 T3

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

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

Gly Trp Val Asp Pro Glu Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Ala Pro Lys Phe
 50 55 60

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

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

Asn Ala Phe Glu Tyr Asp Gly Asn Tyr Ser Pro Leu Asp Phe Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 62

<211> 112

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 62

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
 20 25 30

Asn Gly Glu Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ser Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly
 85 90 95

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

<210> 63

<211> 12

10 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> origen
 <223> /anotar="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido de consenso sintético"
 <220>

5 <221> VARIANTE
 <222> (1)..(1)
 <223> /sustituir="Phe"
 <220>
 <221> Características_diversas

10 <222> (1)..(1)
 <223> /anotar="El resto dado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquél en la anotación para dicha posición"
 <220>
 <221> VARIANTE

15 <222> (6)..(6)
 <223> /sustituir=" "
 <220>
 <221> Características_diversas
 <222> (6)..(6)

20 <223> /anotar="El resto dado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquél en la anotación para dicha posición"
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (8)..(8)

25 <223> /sustituir="Ser"
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (9)..(9)
 <223> /sustituir="Pro"

30 <220>
 <221> Características_diversas
 <222> (8)..(9)
 <223> /anotar="El resto dado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en las anotaciones para dichas posiciones"

35 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (12)..(12)
 <223> /sustituir="Tyr"

<220>
 <221> Características_diversas
 <222> (12)..(12)
 <223> /anotar="El resto dado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquél en la anotación para dicha posición"
 5 <400> 63
 Trp Glu Tyr Asp Gly Asn Tyr Tyr Asp Leu Asp Phe
 1 5 10
 <210> 64
 <211> 17
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <221> origen
 <223> /anotar="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido de consenso sintético"
 15 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (2).. (2)
 <223> /sustituir="Val"
 <220>
 20 <221> Características_diversas
 <222> (2)..(2)
 <223> /anotar="El resto dado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquél en la anotación para dicha posición"
 <220>
 25 <221> VARIANTE
 <222> (9)..(9)
 <223> /sustituir="Ser"
 <220>
 <221> Características_diversas
 30 <222> (9)..(9)
 <223> /anotar="El resto dado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquél en la anotación para dicha posición"
 <220>
 <221> VARIANTE
 35 <222> (10)..(10)
 <223> /sustituir="Asp"
 <220>

ES 2 673 869 T3

- <221> Características_diversas
<222> (10)..(10)
<223> /anotar="El resto dado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquél en la anotación para dicha posición"
- 5 <400> 64
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Trp | Ile | Asp | Pro | Glu | Asn | Gly | Asp | Thr | Gly | Tyr | Ala | Pro | Lys | Phe | Gln |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
- Gly**
<210> 65
<211> 10
<212> PRT
- 10 <213> Secuencia Artificial
<220>
<221> origen
<223> /anotar="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido de consenso sintético"
<220>
- 15 <221> VARIANTE
<222> (9)..(9)
<223> /sustituir="Met"
<220>
<221> Características_diversas
- 20 <222> (9)..(9)
<223> /anotar="El resto dado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquél en la anotación para dicha posición"
<400> 65
- | | | | | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Gly | Phe | Asn | Ile | Lys | Asp | Tyr | Tyr | Leu | His |
| 1 | | | | 5 | | | | 10 | |
- 25 <210> 66
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
- 30 <221> origen
<223> /anotar="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido de consenso sintético"
<220>
<221> VARIANTE
<222> (2)..(2)
- 35 <223> /sustituir="Asn"

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (3)..(3)
 <223> /sustituir="Phe" o "Asp" o "His"

5 <220>
 <221> Características_diversas
 <222> (2)..(3)
 <223> /anotar="El resto dado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en las anotaciones para dichas posiciones"

10 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (4)..(4)
 <223> /sustituir="Phe" o "His" o "Trp"
 <220>

15 <221> Características_diversas
 <222> (4)..(4)
 <223> /anotar="El resto dado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en las anotaciones para dicha posición"
 <220>

20 <221> VARIANTE
 <222> (6)..(6)
 <223> /sustituir="Phe" o "Thr" o "His"
 <220>
 <221> Características_diversas

25 <222> (6)..(6)
 <223> /anotar="El resto dado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en las anotaciones para dicha posición"
 <220>
 <221> VARIANTE

30 <222> (8)..(8)
 <223> /sustituir="Tyr" o "Phe" o "His" o "Leu"
 <220>
 <221> Características_diversas
 <222> (8)..(8)

35 <223> /anotar="El resto dado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en las anotaciones para dicha posición"
 <400> 66
 Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Trp Thr
 1 5

<210> 67
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <221> origen
 <223> /anotar="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido de consenso sintético"
 <220>
 <221> VARIANTE
 10 <222> (1)..(1)
 <223> /sustituir="Gly"
 <220>
 <221> Características_diversas
 <222> (1)..(1)
 15 <223> /anotar="El resto dado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquél en la anotación para dicha posición"
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (6)..(6)
 20 <223> /sustituir="Asp" o "Gln" o "Asn"
 <220>
 <221> Características_diversas
 <222> (6)..(6)
 <223> /anotar="El resto dado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en las anotaciones para dicha posición"
 25 <400> 67
Trp Ala Ser Thr Arg Glu
1 5
 <210> 68
 <211> 17
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <221> origen
 <223> /anotar="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido de consenso sintético"
 35 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (8)..(8)

<223> /sustituir="His" o "Tyr" o "Phe"
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (9)..(9)

5 <223> /sustituir="Gly"
 <220>
 <221> Características_diversas
 <222> (8)..(9)

10 <223> /anotar="El resto dado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en las anotaciones para dichas posiciones"
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (11)..(11)
 <223> /sustituir="Asp"

15 <220>
 <221> Características_diversas
 <222> (11)..(11)
 <223> /anotar="El resto dado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquél en la anotación para dicha posición"

20 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (13)..(13)
 <223> /sustituir="Arg"
 <220>

25 <221> Características_diversas
 <222> (13)..(13)
 <223> /anotar="El resto dado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquél en la anotación para dicha posición"
 <220>

30 <221> VARIANTE
 <222> (15)..(15)
 <223> /sustituir="Tyr"
 <220>
 <221> Características_diversas

35 <222> (15)..(15)
 <223> /anotar="El resto dado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquél en la anotación para dicha posición"
 <400> 68

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Trp Ser Ser Asn Gln Lys Asn His Leu
 1 5 10 15

Ala

<210> 69

<211> 9

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> origen

<223> /anotar="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido de consenso sintético"

<220>

10 <221> VARIANTE

<222> (1)..(1)

<223> /sustituir="Met"

<220>

<221> Características_diversas

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

<223> /anotar="El resto dado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquél en la anotación para dicha posición"

<400> 69

Leu Gln Gly Thr His Phe Pro Tyr Thr
 1 5

20 <210> 70

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <221> origen

<223> /anotar="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido de consenso sintético"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (12)..(12)

30 <223> /sustituir="Glu"

<220>

<221> Características_diversas

<222> (12)..(12)

35 <223> /anotar="El resto dado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquél en la anotación para dicha posición"

<400> 70

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

<210> 71

<211> 9

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> origen

<223> /anotar="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

10 <220>

<221> origen

<223> /anotar="Biotina en C-terminal"

<400> 71

Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe Arg
 1 5

15 <210> 72

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <221> origen

<223> /anotar="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> origen

<223> /anotar="KLH en N-terminal"

25 <400> 72

Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe Arg
 1 5

<210> 73

<211> 9

<212> PRT

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> origen

<223> /anotar="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

35 <221> origen

<223> /anotar="KLH en C-terminal"
 <400> 73
Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe Arg
 1 5
 <210> 74
 5 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <221> origen
 10 <223> /anotar="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"
 <220>
 <221> origen
 <223> /anotar="Biotina en N-terminal"
 <400> 74
Lys Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe Arg
 1 5 10
 <210> 75
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <221> origen
 <223> /anotar="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"
 <220>
 <221> origen
 25 <223> /anotar="Biotina en C-terminal"
 <400> 75
Lys Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe Arg
 1 5 10
 <210> 76
 <211> 10
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <221> origen
 <223> /anotar="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"
 35 <220>

<221> origen
 <223> /anotar="KLH en N-terminal"
 <400> 76
Lys Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe Arg
 1 5 10

5 <210> 77
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>

10 <221> origen
 <223> /anotar="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"
 <220>
 <221> origen
 <223> /anotar="KLH en C-terminal"

15 <400> 77
Lys Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe Arg
 1 5 10

<210> 78
 <211> 8
 <212> PRT

20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <221> origen
 <223> /anotar="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"
 <220>

25 <221> origen
 <223> /anotar="Biotina en N-terminal"
 <400> 78
Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe
 1 5

<210> 79

30 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <221> origen

35 <223> /anotar="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>
 <221> origen
 <223> /anotar="Biotina en C-terminal"
 <400> 79
 5 **Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe**
 1 5
 <210> 80
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <221> origen
 <223> /anotar="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"
 <220>
 <221> origen
 15 <223> /anotar="KLH en N-terminal"
 <400> 80
 Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe
 1 5
 <210> 81
 20 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <221> origen
 25 <223> /anotar="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"
 <220>
 <221> origen
 <223> /anotar="KLH en C-terminal"
 <400> 81
 Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe
 30 1 5
 <210> 82
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <221> origen

<223> /anotar="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"
 <220>
 <221> origen
 <223> /anotar="Biotina en N-terminal"
 5 <400> 82
Lys Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe
 1 5
 <210> 83
 <211> 9
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <221> origen
 <223> /anotar="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"
 <220>
 15 <221> origen
 <223> /anotar="Biotina en C-terminal"
 <400> 83
Lys Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe
 1 5
 <210> 84
 20 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <221> origen
 25 <223> /anotar="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"
 <220>
 <221> origen
 <223> /anotar="KLH en N-terminal"
 <400> 84
Lys Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe
 30 1 5
 <210> 85
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>

<221> origen
 <223> /anotar="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"
 <220>
 <221> origen
 5 <223> /anotar="KLH en C-terminal"
 <400> 85
Lys Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe
 1 5
 <210> 86
 <211> 10
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <221> origen
 <223> /anotar="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"
 15 <220>
 <221> origen
 <223> /anotar="Biotina en N-terminal"
 <400> 86
Arg Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe Arg
 1 5 10
 20 <210> 87
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <221> origen
 <223> /anotar="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"
 <220>
 <221> origen
 <223> /anotar="Biotina en C-terminal"
 30 <400> 87
Arg Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe Arg
 1 5 10
 <210> 88
 <211> 10
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> origen
 <223> /anotar="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"
 <220>
 5 <221> origen
 <223> /anotar="KLH en N-terminal"
 <400> 88
Arg Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe Arg
 1 5 10
 <210> 89
 10 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <221> origen
 15 <223> /anotar="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"
 <220>
 <221> origen
 <223> /anotar="KLH en C-terminal"
 <400> 89
Arg Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe Arg
 20 1 5 10
 <210> 90
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 25 <400> 90
Arg Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe
 1 5
 <210> 91
 <211> 9
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <221> origen
 <223> /anotar="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"
 <220>
 35 <221> origen

<223> /anotar="Biotina en N-terminal"
 <400> 91
Arg Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe
 1 5
 <210> 92
 5 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <221> origen
 10 <223> /anotar="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"
 <220>
 <221> origen
 <223> /anotar="Biotina en C-terminal"
 <400> 92
Arg Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe
 15 1 5
 <210> 93
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <221> origen
 <223> /anotar="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"
 <220>
 <221> origen
 25 <223> /anotar="KLH en N-terminal"
 <400> 93
Arg Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe
 1 5
 <210> 94
 <211> 9
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <221> origen
 <223> /anotar="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"
 35 <220>

<221> origen
 <223> /anotar="KLH en C-terminal"
 <400> 94
Arg Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe
 1 5

5 <210> 95
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Desconocido
 <220>

10 <221> origen
 <223> /anotar="Descripción de desconocido: Péptido 1-5 de Bradicinina"
 <400> 95
Arg Pro Pro Gly Phe
 1 5

15 <210> 96
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <221> origen

20 <223> /anotar="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"
 <220>
 <221> origen
 <223> /anotar="Biotina en N-terminal"
 <400> 96
Arg Pro Pro Gly Phe
 1 5

25 <210> 97
 <211> 136
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

30 <400> 97
Leu Pro Glu Phe Gln Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Ala Glu Leu Val
 1 5 10 15

ES 2 673 869 T3

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

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

Leu Glu Trp Ile Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Gly Tyr
 50 55 60

Ala Arg Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Ser
 65 70 75 80

Asn Thr Val Tyr Leu His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala
 85 90 95

Val Tyr Tyr Phe Asn Ala Trp Glu Tyr Asp Gly Tyr Tyr Asp Leu Asp
 100 105 110

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

Pro Pro Ser Val Tyr Gly Ser Ser
 130 135

<210> 98

<211> 134

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 98

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

Gln Pro Gly Gly Ser Met Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr
 20 25 30

Phe Ser Asn Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly
 35 40 45

Leu Glu Trp Val Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr
 50 55 60

His Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp
 65 70 75 80

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

ES 2 673 869 T3

Thr Gly Ile Tyr Tyr Cys Ile Gly Glu Asp Tyr Gly Gly Asp Tyr Trp
 100 105 110

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

Ser Val Tyr Gly Ser Ser
 130

<210> 99

<211> 136

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 99

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

Lys Pro Gly Thr Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser
 20 25 30

Phe Thr Asp Tyr Asn Ile Tyr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser
 35 40 45

Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Phe Asp Pro Tyr Asn Gly Asn Thr Gly Tyr
 50 55 60

Asn Gln Lys Phe Arg Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser
 65 70 75 80

Ser Thr Ala Phe Met His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala
 85 90 95

Val Tyr Tyr Cys Ala Asn Tyr Tyr Arg Tyr Asp Asp His Ala Met Asp
 100 105 110

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

Pro Pro Ser Val Tyr Gly Ser Ser
 130 135

<210> 100

<211> 137

10 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 100

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

ES 2 673 869 T3

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

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

Leu Glu Trp Ile Gly Trp Val Asp Pro Glu Asn Gly Asp Ser Asp Tyr
 50 55 60

Ala Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Ser
 65 70 75 80

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

Val Tyr Tyr Cys Asn Ala Phe Glu Tyr Asp Gly Asn Tyr Ser Ser Leu
 100 105 110

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

Thr Pro Pro Ser Val Tyr Gly Ser Ser
 130 135

<210> 101

<211> 137

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 101

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

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

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

Leu Glu Trp Ile Gly Trp Val Asp Pro Glu Asn Gly Asp Ser Asp Tyr
 50 55 60

Ala Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Ser
 65 70 75 80

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

ES 2 673 869 T3

Val Tyr Tyr Cys Asn Ala Phe Glu Tyr Asp Gly Asn Tyr Ser Pro Leu
 100 105 110

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

Thr Pro Pro Ser Val Tyr Gly Ser Ser
 130 135

<210> 102

<211> 133

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 102

Glu Leu Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Thr Leu Thr Leu Ser Val Thr
 1 5 10 15

Ile Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu
 20 25 30

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

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

Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
 65 70 75 80

Lys Ile Ile Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Leu
 85 90 95

Gln Gly Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu
 100 105 110

Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser
 115 120 125

Lys Leu Glu Leu Tyr
 130

<210> 103

<211> 134

10 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 103

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

ES 2 673 869 T3

Val Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu
20 25 30

Tyr Ser Ser Asp Gln Arg Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Ser
35 40 45

Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
50 55 60

Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
65 70 75 80

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

Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
100 105 110

Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro
115 120 125

Ser Lys Leu Glu Leu Tyr
130

<210> 104

<211> 134

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 104

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

Val Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu
20 25 30

Tyr Thr Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
35 40 45

Gly Gln Ser Pro Lys Pro Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
50 55 60

Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
65 70 75 80

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

ES 2 673 869 T3

Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 100 105 110

Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro
 115 120 125

Ser Lys Leu Glu Leu Tyr
 130

<210> 105

<211> 133

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 105

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

Ile Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Arg Gln Ser Leu Leu
 20 25 30

Tyr Ser Asn Gly Glu Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly
 35 40 45

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

Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
 65 70 75 80

Lys Ile Ser Arg Val Glu Ser Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Met
 85 90 95

Gln Gly Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu
 100 105 110

Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser
 115 120 125

Lys Leu Glu Leu Tyr
 130

<210> 106

<211> 133

10 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 106

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

ES 2 673 869 T3

Ile Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu
 20 25 30

Tyr Ser Asn Gly Glu Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly
 35 40 45

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

Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
 65 70 75 80

Lys Ile Ser Arg Val Glu Ser Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Met
 85 90 95

Gln Gly Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu
 100 105 110

Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser
 115 120 125

Lys Leu Glu Leu Tyr
 130

<210> 107

<211> 46

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> origen

<223> /anotar="Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético"

<400> 107

10 aaaagcaggc ttaggagcgg ccgcatggc gtcccaggcc tcgctg

46

<210> 108

<211> 46

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<221> origen

<223> /anotar="Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético"

<400> 108

caagaaagct gggtcggatc cttataaagt tcccagaacc ctggtc

46

20 <210> 109

<211> 30

<212> ADN

ES 2 673 869 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> origen

<223> /anotar="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

5 <400> 109

gcatacccat acgacgtccc agactacgct 30

<210> 110

<211> 1005

<212> ADN

10 <213> Mus musculus

<400> 110

atggcgtccc aggcctcgct gaagctacag ctttctaacc aaagccagca ggcccctccc 60
aacatcacct cctgcgaggg cgccccgaa gcctgggatc tgctgtgtcg ggtgctgcca 120
gggtttgtca tcaactgtctg tttctttggc ctctctggga accttttagt cctgtccttc 180
ttccttttgc cttggcgacg atgggtggcag cagcggggc agcgcctaac catagcagaa 240
atctacctgg ctaacttggc agcttctgat ctggtgttg tgctgggcct gcccttctgg 300
gcagagaacg ttgggaaccg tttcaactgg ccctttggaa gtgacctctg ccgggtggtc 360
agcgggggtca tcaaggccaa cctgttcatc agcatcttcc tgggtggtggc catcagtcag 420
gaccgctaca ggttgctggt ataccccatg accagctggg ggaaccggcg gcgacggcaa 480
gcccgaagtga cctgcctgct catctgggta gctggggggc tcttgagcac ccccacgttc 540
cttctgcggt ccgtaaaagt cgtccctgat ctgaacatct ctgcctgcat cctgcttttc 600
ccccacgaag cttggcactt tgtaaggatg gtggagtga acgttttggg tttcctcctc 660
ccattggctg ccatcctcta cttcaacttt cacatcctgg cctccctgag aggacagaag 720
gaggccagca gaaccgggtg tgggggaccc aaggacagca agacaatggg gctgatcctc 780
aactggttag cctccttctc ggtctgctgg gccccctacc acttctttgc cttcctggat 840
ttcctgggtc aggtgagagt gatccaggac tgcttctgga aggagctcac agacctgggc 900
ctgcagctgg ccaacttctt tgcttttgtc aacagctgcc tgaaccact gatttatgtc 960
tttgcaggcc ggctctttaa gaccagggtt ctgggaactt tataa 1005

<210> 111

<211> 111

15 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 111

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

ES 2 673 869 T3

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
 20 25 30

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

Ser Pro Lys Pro Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

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

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

Tyr Tyr Ser Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu
 100 105 110

<210> 112

<211> 105

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 112

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 100 105

<210> 113

<211> 120

10 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 113

ES 2 673 869 T3

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

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

Asn Ile Tyr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

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

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

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 114

<211> 123

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 114

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Trp Gly Tyr Asp Tyr Asp Val Phe Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
100 105 110

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

<210> 115

ES 2 673 869 T3

<211> 113

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <221> origen

<223> /anotar="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"

<400> 115

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

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

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

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

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

Tyr Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 116

10 <211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> origen

15 <223> /anotar="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"

<400> 116

ES 2 673 869 T3

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

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

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

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Tyr Ser Ser Ser Ser Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 117

<211> 9

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> origen

<223> /anotar="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

10 <221> origen

<223> /anotar="Biotina en N-terminal"

<400> 117

Arg Pro Pro Gly Phe Ser Pro Phe Arg
1 5

<210> 118

15 <211> 127

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 118

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

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

ES 2 673 869 T3

20 25 30

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

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

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

Leu His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Phe
85 90 95

Asn Ala Trp Glu Tyr Asp Gly Tyr Tyr Asp Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser
115 120 125

<210> 119

<211> 125

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 119

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

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

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

Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser
65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr
85 90 95

Tyr Cys Ile Gly Glu Asp Tyr Gly Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser
115 120 125

<210> 120

<211> 127

10 <212> PRT

ES 2 673 869 T3

<213> Mus musculus

<400> 120

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

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

Asn Ile Tyr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

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

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

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser
115 120 125

<210> 121

5 <211> 128

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 121

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

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

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

Gly Trp Val Asp Pro Glu Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Ala Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Val Tyr

ES 2 673 869 T3

65 70 75 80
Leu Gln Phe Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Asn Ala Phe Glu Tyr Asp Gly Asn Tyr Ser Pro Leu Asp Phe Trp Gly
 100 105 110

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

<210> 122

<211> 128

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 122

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

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

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

Gly Trp Val Asp Pro Glu Asn Gly Asp Ser Asp Tyr Ala Pro Lys Phe
 50 55 60

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

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

Asn Ala Phe Glu Tyr Asp Gly Asn Tyr Ser Pro Leu Asp Phe Trp Gly
 100 105 110

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

<210> 123

<211> 119

10 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 123

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

ES 2 673 869 T3

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
 20 25 30

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

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ile Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Gly
 85 90 95

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

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr
 115

<210> 124

<211> 120

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 124

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
 20 25 30

Ser Asp Gln Arg Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Ser Gly Gln
 35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

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

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

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

Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr

115 120

<210> 125

10 <211> 120

ES 2 673 869 T3

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 125

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

5 <210> 126

<211> 120

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 126

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

10

ES 2 673 869 T3

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

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

Asp His Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
100 105 110

Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr
115 120

<210> 127

<211> 360

<212> ADN

5 <213> Mus musculus

<400> 127

gagatccagc tgcagcagtc tggacctgag ctggtgaagc ctgggacttc agtgaaggtg 60
tcctgcaagg cttctgggta ctcatcact gactacaaca tctactgggt gaaacagagc 120
catggaaga gccttgagt gattggatat tttgatoctt acaatggtaa tactggctac 180
aaccagaagt tcaggggcaa ggccacattg actgttgaca agtcctccag cacagccttc 240
atgcatctca gcagcctgac atctgatgac tctgcagtct attactgtgc aaactactat 300
aggtatgacg accatgctat ggactattgg ggtcaaggaa cctcagtcac cgtctcctca 360

<210> 128

<211> 339

10 <212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 128

gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc cttagctgtgt cagttggaga gaaggttact 60
atgagctgca agtccagtc gagccttita tatagtagca atcaaaagaa ctacttggcc 120
tggtaccagc agaaaccagg gcagctctcct aaaccgctga tttactgggc atccactagg 180
gaatctgggg tcctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 240
atcagcagtg tgaaggctga agacctggca atttattact gtcagcaata ttatagctat 300
ccgtggacgt tcggtggagg caccaagctg gaaatcaaa 339

<210> 129

15 <211> 360

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> origen

20 <223> /anotar="Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 129

```

cagattcagc tggcgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggcgccag cgtgaaggtg      60
tcctgcaagg ccagcggcta cagcttcacc gactacaaca tctactgggt ccgacaggct      120
ccaggccagg gactggaatg gatcggctac ttcgaccctt acaacggcaa caccggctac      180
aaccagaagt tccggggcag agccaccctg accgtggaca agagcaccag caccgcctac      240
atggaactgc ggagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc caactactac      300
agatacgacg accacgccat ggactactgg ggcaggggca ccctggtcac cgtgtcctct      360
    
```

<210> 130

<211> 339

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> origen

<223> /anotar="Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

10 <400> 130

```

gacatcgtga tgaccagag ccccgacagc ctggccgtgt ctctgggcca gcgggccacc      60
atcaactgca agagcagcca gagcctgctg tactctagca accagaagaa ctacctggcc      120
tggtatcagc agaagcccgg ccagcccccc aagcccctga tctactgggc cagcaccogc      180
gagagcggcg tgcccgatag attttccggc agcggctccg gcaccgactt caccctgacc      240
atcagcagcc tgcaggccga ggacgtggcc gtgtactact gccagcagta ctacagctac      300
ccctggacct tcggccaggg caccaaggtg gaaatcaag      339
    
```

<210> 131

<211> 119

<212> PRT

15 <213> Mus musculus

<400> 131

```

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

```

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
20           25           30
    
```

```

Asn Gly Glu Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35           40           45
    
```

```

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50           55           60
    
```

```

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

ES 2 673 869 T3

Ser Arg Val Glu Ser Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly
 85 90 95

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

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr
 115

<210> 132

<211> 4

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 132

Lys Arg Pro Pro
 1

<210> 133

<211> 6

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 133

Arg Pro Pro Gly Phe Ser
 1 5

<210> 134

15 <211> 220

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> origen

20 <223> /anotar="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"

<400> 134

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

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

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

Pro Pro Lys Pro Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

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

ES 2 673 869 T3

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

Tyr Tyr Ser Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
115 120 125

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
130 135 140

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
145 150 155 160

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
165 170 175

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
180 185 190

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
195 200 205

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215 220

<210> 135

<211> 229

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> origen

<223> /anotar="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido Sintético"

<400> 135

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

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

Asn Ile Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

10 Gly Tyr Phe Asp Pro Tyr Asn Gly Asn Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

ES 2 673 869 T3

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

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

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

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

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

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

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

His His His His His
225

<210> 136

<211> 6

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> origen

<223> /anotar="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 136

Ala Ser Thr Lys Gly Pro
1 5

10

<210> 137

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<221> origen

<223> /anotar="Descripción de Secuencia Artificial: Synthetic 6xHis tag"

<400> 137

His His His His His His
1 5

5

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a Calidina o des-Arg₁₀-Calidina pero no a Bradicinina o des-Arg₉-Bradicinina, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende:

5 i) un dominio variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la región 3 determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR3), una secuencia de aminoácidos de la región 2 determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR2) y una secuencia de aminoácidos de la región 1 determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR1), seleccionadas del grupo que consiste en:

a) SEQ ID NO: 7 [X₁Y X₂ X₃D X₄HAM X₅Y], en donde

- 10 X₁ es Y, F o H,
 X₂ es R, D, A, V, L, I, M, F, Y o W,
 X₃ es Y, F, W o H,
 X₄ es D, E o Y, y
 X₅ es D o E;

15 SEQ ID NO: 8 [YFX₁PX₂NGNTGYNQKFRG], en donde

- X₁ es D, R, A, V, L, I, M, F, Y o W, y
 X₂ es Y, D, E, N o Q; y

SEQ ID NO: 9 [GYSFTDYX₁IY], en donde X₁ es N, W o Y;
 respectivamente,

20 b) SEQ ID NO: 63 [X₁EYDGX₂YX₃X₄LDX₅], en donde

- X₁ es W o F,
 X₂ es N o ningún aminoácido;
 X₃ es Y o S,
 X₄ es D o P, y
 25 X₅ es F o Y;

SEQ ID NO: 64 [WX₁DPENGDX₂X₃YAPKFQG], en donde

- X₁ es I o V,
 X₂ es T o S, y
 X₃ es G o D;

30 SEQ ID NO: 65 [GFNIKDYYX₁H], en donde X₁ es L o M;
 respectivamente,

c) SEQ ID NO: 13;

SEQ ID NO: 14; y

SEQ ID NO: 15;

35 respectivamente,

d) SEQ ID NO: 32;

SEQ ID NO: 33; y

SEQ ID NO: 34;

respectivamente,

e) SEQ ID NO: 40;
 SEQ ID NO: 41; y
 SEQ ID NO: 42;
 respectivamente,

5 f) SEQ ID NO: 47;
 SEQ ID NO: 48; y
 SEQ ID NO: 49;
 respectivamente,

y

10 g) SEQ ID NO: 55;
 SEQ ID NO: 56; y
 SEQ ID NO: 57;
 respectivamente; y

15 ii) un dominio variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la región 3 determinante de la complementariedad de la cadena ligera (LCDR3), una secuencia de aminoácidos de la región 2 determinante de la complementariedad de la cadena ligera (LCDR2) y una secuencia de aminoácidos de la región 1 determinante de la complementariedad de la cadena ligera (LCDR1), seleccionadas del grupo que consiste en:

h) SEQ ID NO: 10 [QQ X₁ X₂S X₃P X₄T], en donde

20 X₁ es Y, F o H,
 X₂ es Y, F, H o W,
 X₃ es Y, F, T o H, y,
 X₄ es W, Y, F, H o L:

SEQ ID NO: 11 [WASTRX₁], en donde X₁ es E, D, Q o N; y

SEQ ID NO: 12 [KSSQSLL X₁SSNQKN X₂LA], en donde

25 X₁ es W, H, Y o F, y
 X₂ es H o Y;

respectivamente,

i) SEQ ID NO: 66 [QX₁X₂X₃SX₄PX₅T], en donde

30 X₁ es Q o N,
 X₂ es Y, F, D o H,
 X₃ es Y, F, H o W,
 X₄ es Y, F, T o H, y
 X₅ es W, Y, F, H o L;

SEQ ID NO: 67 [X₂ASTRX₂], en donde

35 X₁ es W o G, y
 X₂ es E, D, Q o N; y

SEQ ID NO: 68 [KSSQSLLX₁X₂SX₃QX₄NX₅LA], en donde

X₁ es W, H, Y o F,

X₂ es S o G,

X₃ es N o D,

X₄ es K o R,

X₅ es H o Y;

5 respectivamente,

j) SEQ ID NO: 69 [X₁QGTHFPYT], en donde X₁ es L o M;

SEQ ID NO: 36; y

SEQ ID NO: 70 [KSSQSLLYSNGX₁TYLN], en donde X₁ es K o E;

respectivamente,

10 k) SEQ ID NO: 16;

SEQ ID NO: 17; y

SEQ ID NO: 18;

respectivamente,

l) SEQ ID NO: 35;

15 SEQ ID NO: 36; y

SEQ ID NO: 37;

respectivamente,

m) SEQ ID NO: 43;

SEQ ID NO: 17; y

20 SEQ ID NO: 44;

respectivamente,

n) SEQ ID NO: 50;

SEQ ID NO: 51; y

SEQ ID NO: 52;

25 respectivamente,

y

o) SEQ ID NO: 58;

SEQ ID NO: 59; y

SEQ ID NO: 60;

30 respectivamente.

2. El anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a Calidina o des-Arg₁₀-Calidina pero no a Bradicinina o des-Arg₉-Bradicinina de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende:

35 a) un dominio variable de la cadena pesada que comprende las secuencias amino de las regiones HCDR3, HCDR2 y HCDR1 expuestas en las SEQ ID NO: 13, 14 y 15, respectivamente, y una o más sustituciones de aminoácidos en posiciones seleccionadas del grupo que consiste en H1, H5, H9, H11, H12, H16, H38, H40, H41, H43, H44, H66, H75, H79, H81, H82A, H83, H87 y H108, según Kabat; y

40 b) un dominio variable de la cadena ligera que comprende las secuencias amino de las regiones LCDR3, LCDR2 y LCDR1 expuestas en las SEQ ID NO: 16, 17 y 18, respectivamente, y una o más sustituciones de aminoácidos en posiciones seleccionadas del grupo que consiste en L5, L9, L15, L18, L19, L21, L22, L43, L63, L78,

L79, L83, L85, L100 y L104, según Kabat.

5 3. El anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a Calidina o des-Arg₁₀-Calidina pero no a Bradicinina o des-Arg₉-Bradicinina de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende las secuencias de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada y de la cadena ligera expuestas en las SEQ ID NO: 24 y 30, respectivamente.

4. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1 y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables.

10 5. El anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a Calidina o des-Arg₁₀-Calidina pero no a Bradicinina o des-Arg₉-Bradicinina de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende:

una secuencia de aminoácidos del dominio de la región variable de la cadena pesada, y una secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena ligera con al menos un 90% de identidad con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

- 15 a) SEQ ID NO: 19 y 26, respectivamente,
- b) SEQ ID NO: 20 y 27, respectivamente,
- c) SEQ ID NO: 21 y 28, respectivamente,
- d) SEQ ID NO: 22 y 28, respectivamente,
- e) SEQ ID NO: 23 y 29, respectivamente,
- f) SEQ ID NO: 24 y 30, respectivamente,
- 20 g) SEQ ID NO: 25 y 31, respectivamente,
- h) SEQ ID NO: 38 y 39, respectivamente,
- i) SEQ ID NO: 45 y 46, respectivamente,
- j) SEQ ID NO: 53 y 54, respectivamente,
- k) SEQ ID NO: 61 y 62, respectivamente.

25 6. El anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a Calidina o des-Arg₁₀-Calidina pero no a Bradicinina o des-Arg₉-Bradicinina de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende:

30 un dominio variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos, y un dominio variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos, seleccionadas del grupo que consiste en:

- a) SEQ ID NO: 19, y 26, respectivamente,
- b) SEQ ID NO: 20 y 27, respectivamente,
- c) SEQ ID NO: 21 y 28, respectivamente,
- d) SEQ ID NO: 22 y 28, respectivamente,
- 35 e) SEQ ID NO: 23 y 29, respectivamente,
- f) SEQ ID NO: 24 y 30, respectivamente,
- g) SEQ ID NO: 25 y 31, respectivamente,
- h) SEQ ID NO: 38 y 39, respectivamente,
- i) SEQ ID NO: 45 y 46, respectivamente,
- 40 j) SEQ ID NO: 53 y 54, respectivamente
- k) SEQ ID NO: 61 y 62, respectivamente.

7. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la

reivindicación 2 y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables.

8. El anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a Calidina o des-Arg₁₀-Calidina pero no a Bradicinina o des-Arg₉-Bradicinina de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende:

5 a) un dominio variable de la cadena pesada que comprende las secuencias amino de consenso de las regiones HCDR3, HCDR2 y HCDR1 expuestas en las SEQ ID NO: 7, 8 y 9, respectivamente; y

b) un dominio variable de la cadena ligera que comprende las secuencias amino de las regiones LCDR3, LCDR2 y LCDR1 expuestas en las SEQ ID NO: 10, 11 y 12, respectivamente.

10 9. El anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a Calidina o des-Arg₁₀-Calidina pero no a Bradicinina o des-Arg₉-Bradicinina de la reivindicación 8, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende:

a) un dominio variable de la cadena pesada que comprende las secuencias amino de las regiones HCDR3, HCDR2 y HCDR1 expuestas en las SEQ ID NO: 13, 14 y 15, respectivamente; y

15 b) un dominio variable de la cadena ligera que comprende las secuencias amino de las regiones LCDR3, LCDR2 y LCDR1 expuestas en las SEQ ID NO: 16, 17 y 18, respectivamente.

10. El anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a Calidina o des-Arg₁₀-Calidina pero no a Bradicinina o des-Arg₉-Bradicinina de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende:

20 a) un dominio variable de la cadena pesada que comprende las secuencias amino de las regiones HCDR3, HCDR2 y HCDR1 expuestas en las SEQ ID NO: 32, 33 y 34, respectivamente; y

b) un dominio variable de la cadena ligera que comprende las secuencias amino de las regiones LCDR3, LCDR2 y LCDR1 expuestas en las SEQ ID NO: 35, 36 y 37, respectivamente.

11. El anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a Calidina o des-Arg₁₀-Calidina pero no a Bradicinina o des-Arg₉-Bradicinina de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende:

25 a) un dominio variable de la cadena pesada que comprende las secuencias amino de las regiones HCDR3, HCDR2 y HCDR1 expuestas en las SEQ ID NO: 40, 41 y 42, respectivamente; y

b) un dominio variable de la cadena ligera que comprende las secuencias amino de las regiones LCDR3, LCDR2 y LCDR1 expuestas en las SEQ ID NO: 43, 44 y 44, respectivamente.

30 12. El anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a Calidina o des-Arg₁₀-Calidina pero no a Bradicinina o des-Arg₉-Bradicinina de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende:

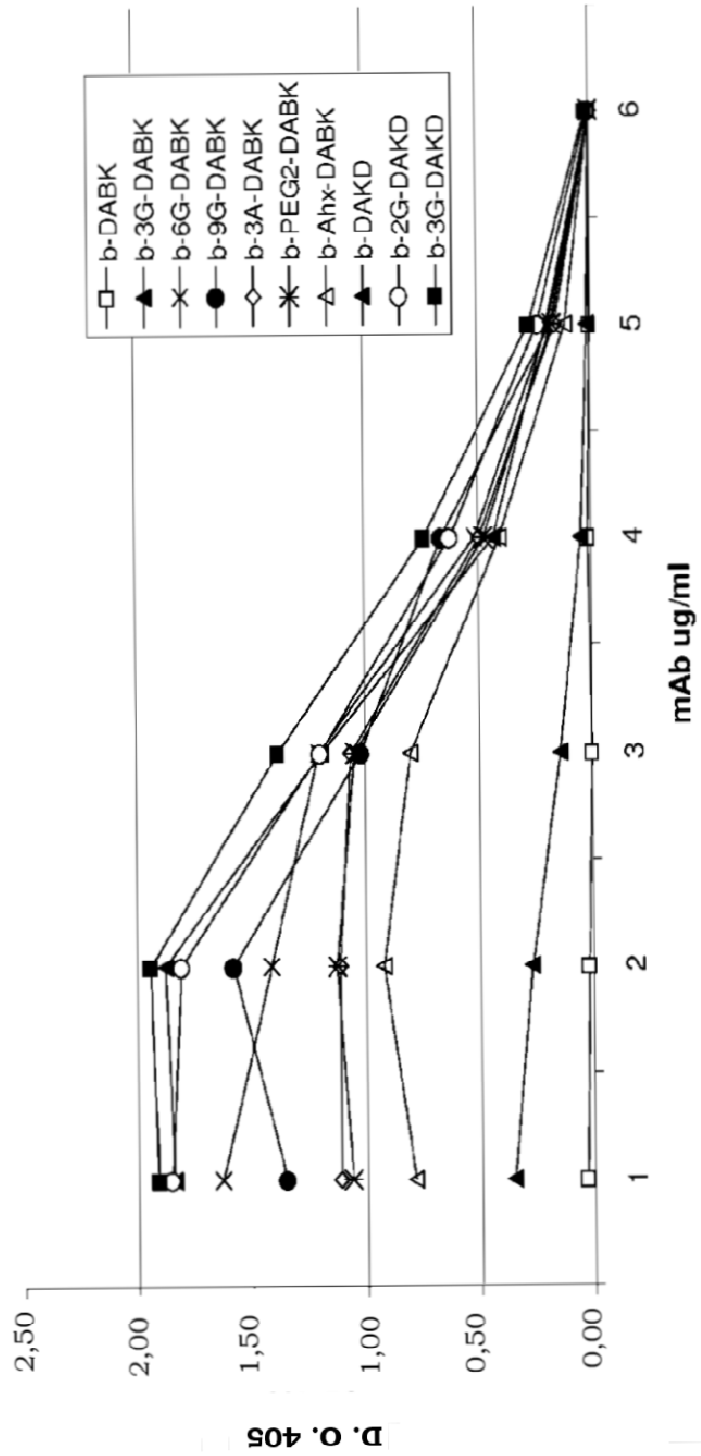
a) un dominio variable de la cadena pesada que comprende las secuencias amino de las regiones HCDR3, HCDR2 y HCDR1 expuestas en las SEQ ID NO: 47, 48 y 49, respectivamente; y

35 b) un dominio variable de la cadena ligera que comprende las secuencias amino de las regiones LCDR3, LCDR2 y LCDR1 expuestas en las SEQ ID NO: 50, 51 y 52, respectivamente.

13. El anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a Calidina o des-Arg₁₀-Calidina pero no a Bradicinina o des-Arg₉-Bradicinina de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende:

40 a) un dominio variable de la cadena pesada que comprende las secuencias amino de las regiones HCDR3, HCDR2 y HCDR1 expuestas en las SEQ ID NO: 55, 56 y 57, respectivamente; y

b) un dominio variable de la cadena ligera que comprende las secuencias amino de las regiones LCDR3, LCDR2 y LCDR1 expuestas en las SEQ ID NO: 58, 59 y 60, respectivamente.



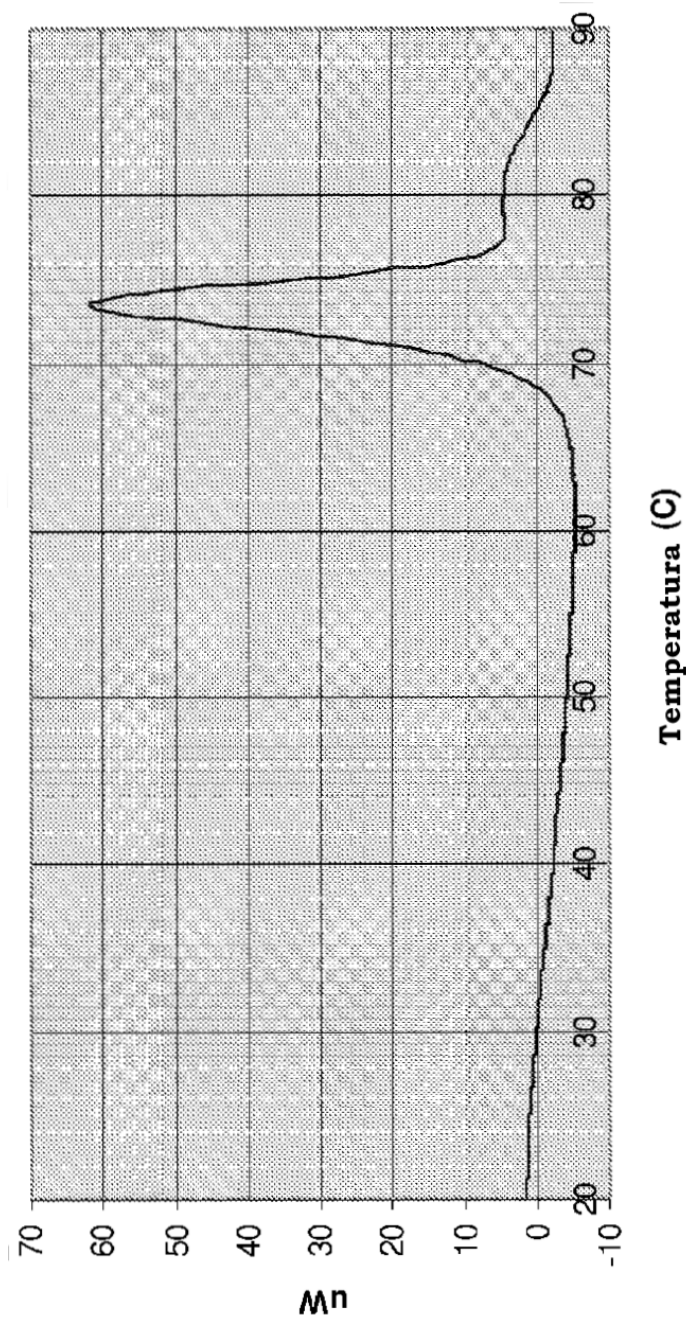


Figura 2

Alineamiento de cadena pesada

Parental: EIQLQQSGPELVKPGTSVKVSCCKASGYSFIDYNIYWKQSHGKSLEWIGYDFPYNGNTGY
 +IQL QSG E+ KPG SVKVSCKASGYSFIDYNIYWV+Q+ G+ LEWIGYDFPYNGNTGY

Humanizada: QIQLVQSGAEVKKFGASVKVSCCKASGYSFIDYNIYWVRQAFGGGLEWIGYDFPYNGNTGY

Parental: NQKERGKATLTVDKSSSTAFMHLSSLTSDDSAVYYCANYRYRDDHAMDYWGQGTSTVTVSS
 NQKERG+ATLTVDKS+STAM L SL SDD+AVYYCANYRYRDDHAMDYWGQGT VTVSS

Humanizada: NQKFRGRATLTVDKSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCANYRYRDDHAMDYWGQGTLLVTVSS

Alineamiento de cadena ligera

Parental: DIVMSQSPS SLAVSVGEKVTMSCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKPLIYWASTR
 DIVM+QSP SLAVS+GE+ T++CKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQ PKPLIYWASTR

Humanizada: DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQPPKPLIYWASTR

Parental: ESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLAIYCCQYYSPWTFGGGTKLEIK
 ESGVPDRF+GSGSGTDFTLTISS++AED+A+YCCQYYSPWTFG GTK+EIK

Humanizada: ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDEVVYYCCQYYSPWTFGGGTKVEIK

Figura 3

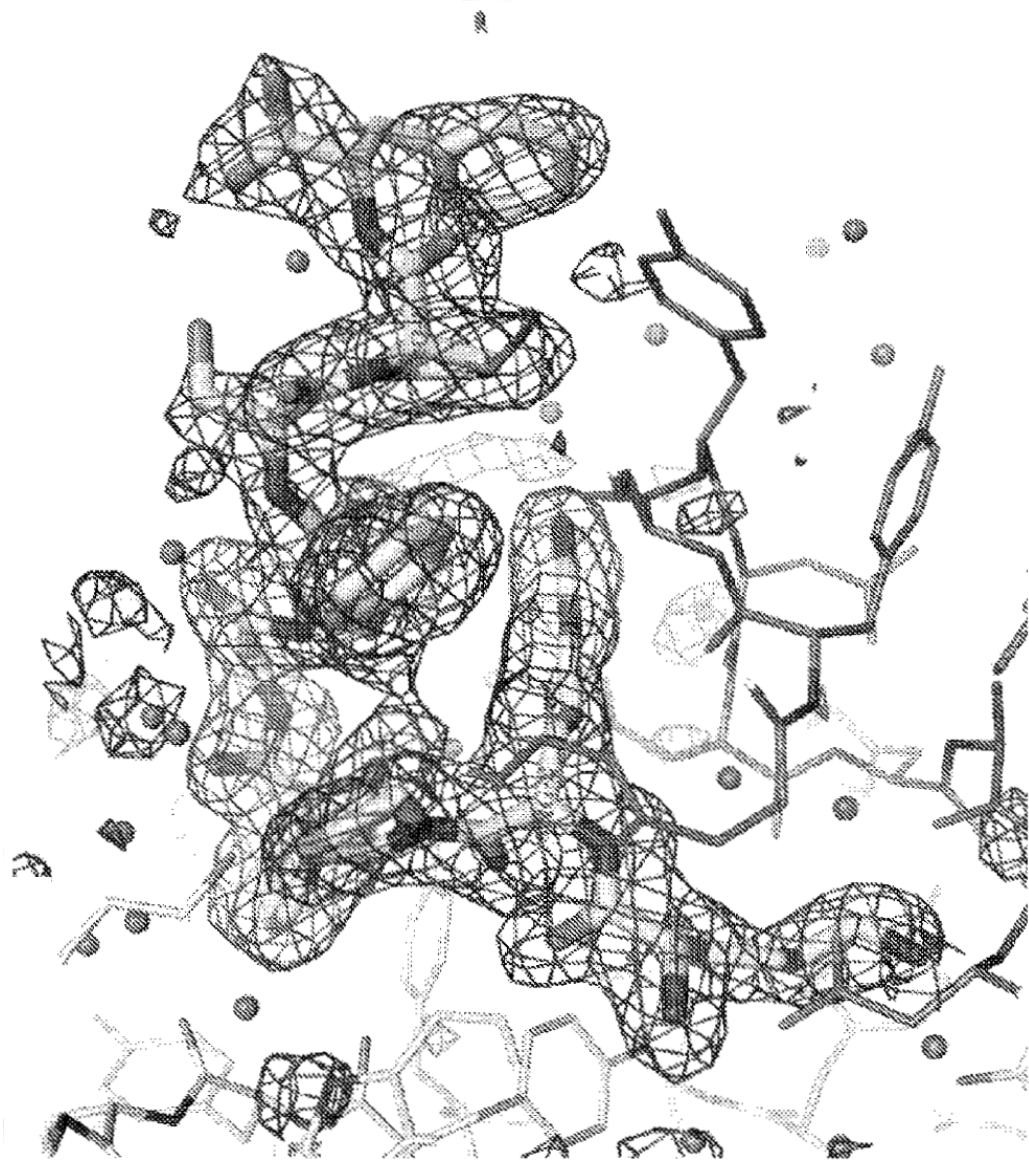


Figura 4

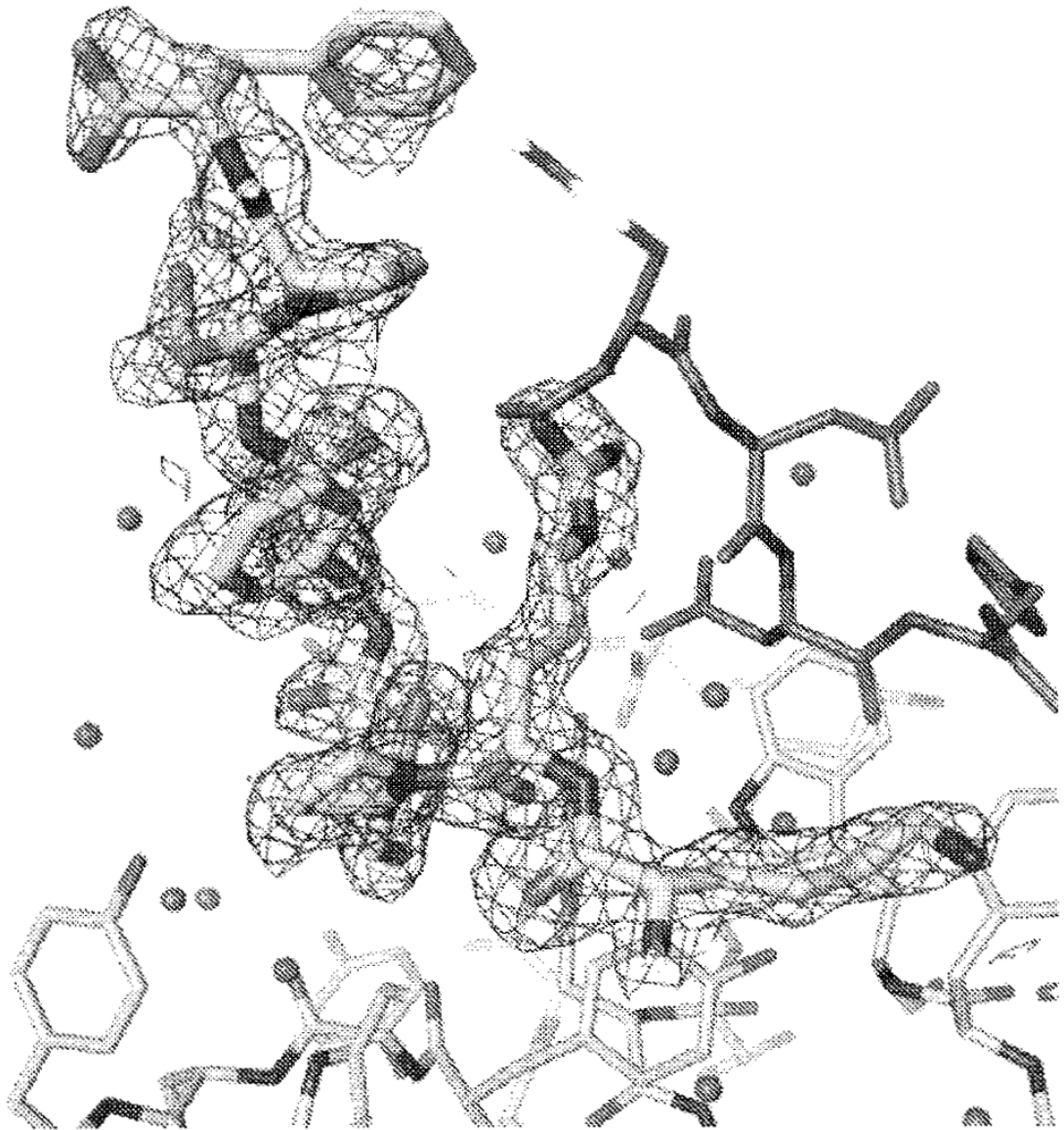


Figura 5

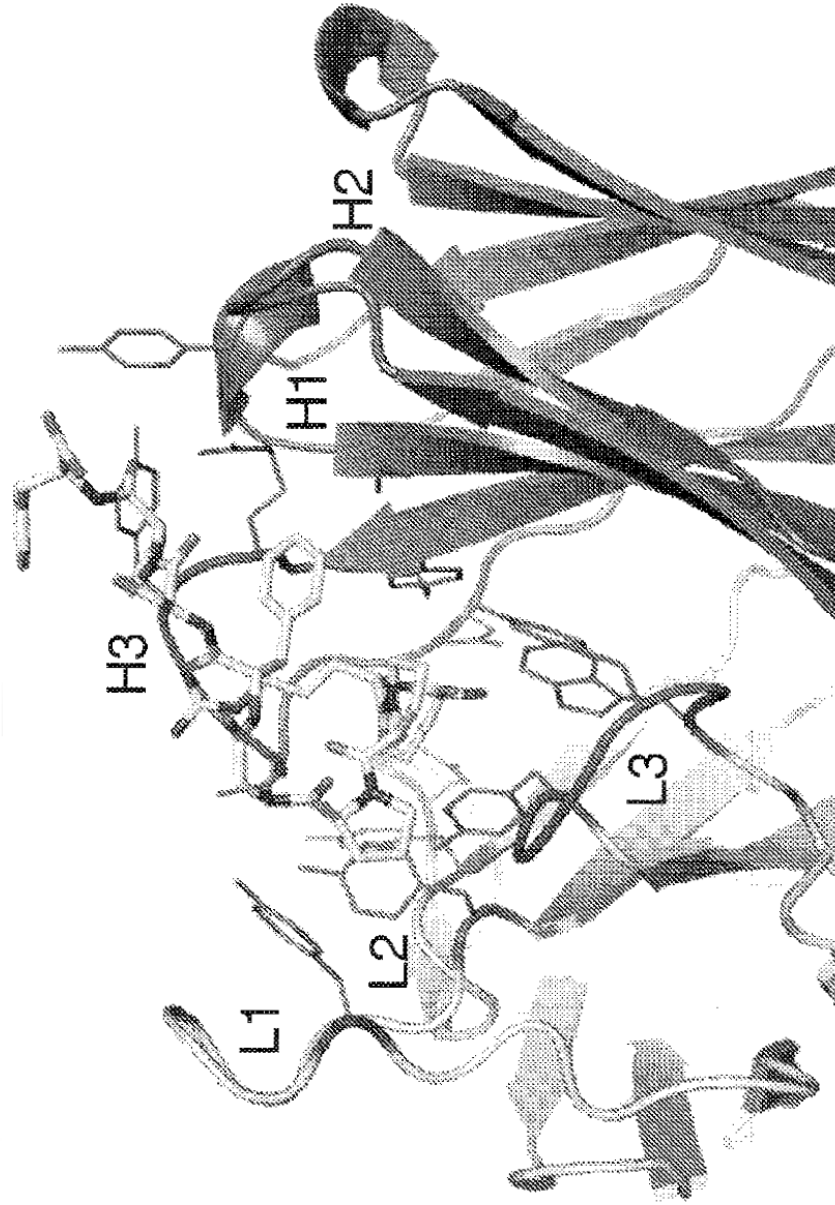


Figura 6

Cadena Ligera

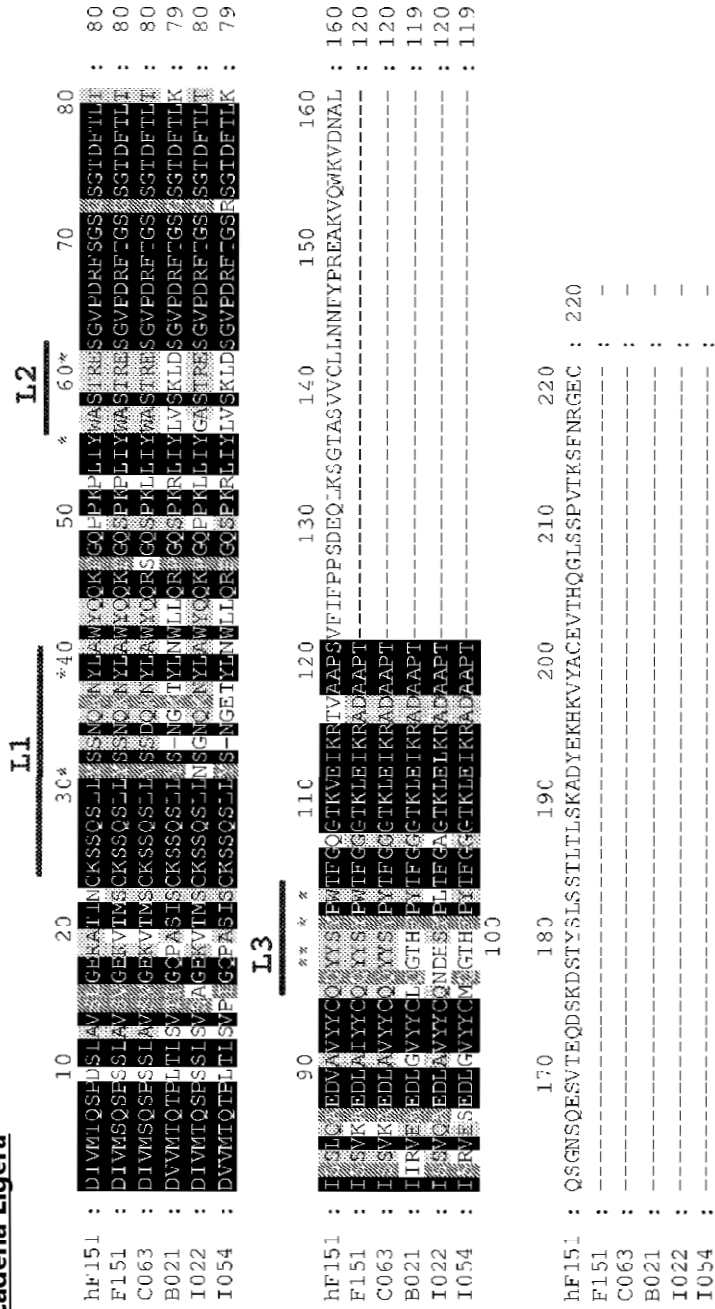


Figura 7

Cadena Pesada

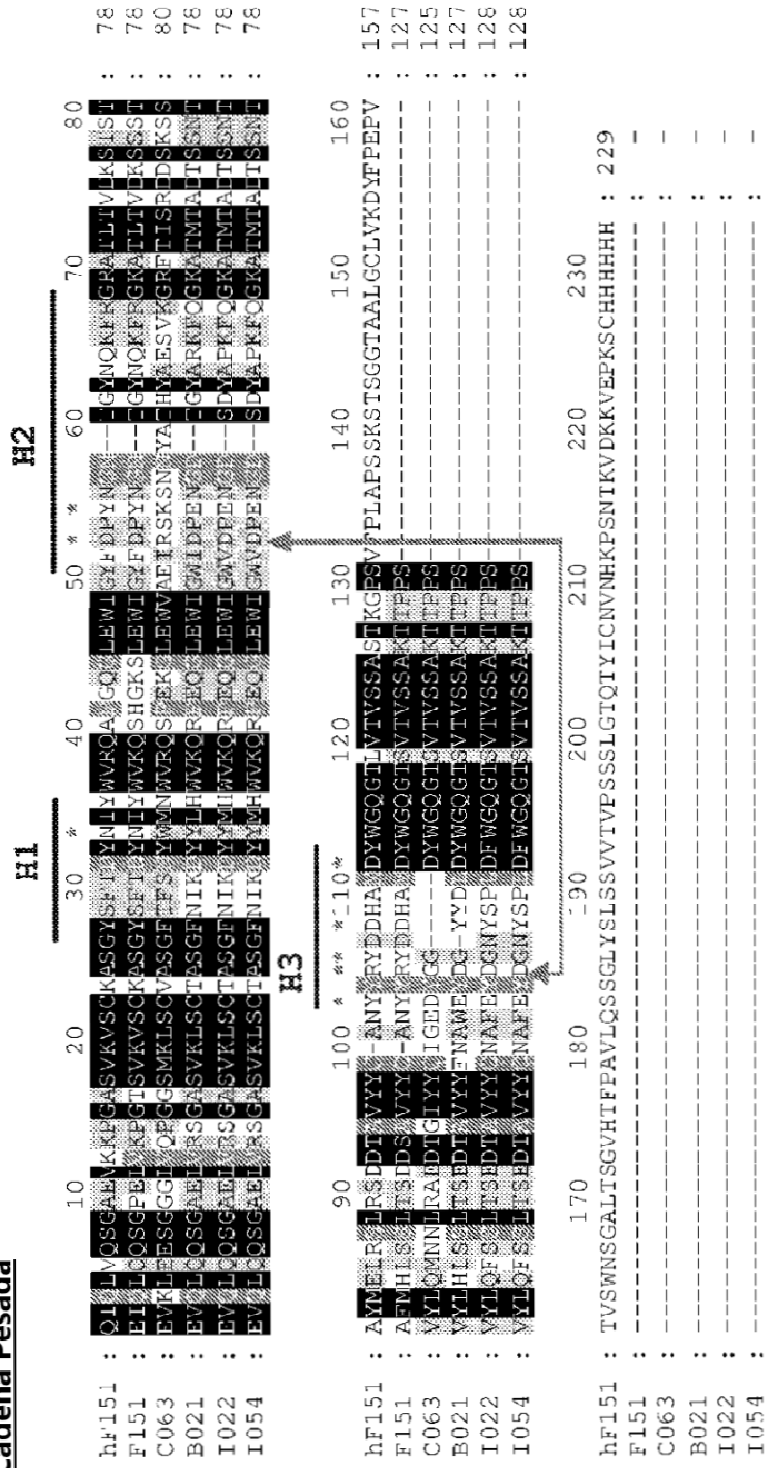


Figura 8

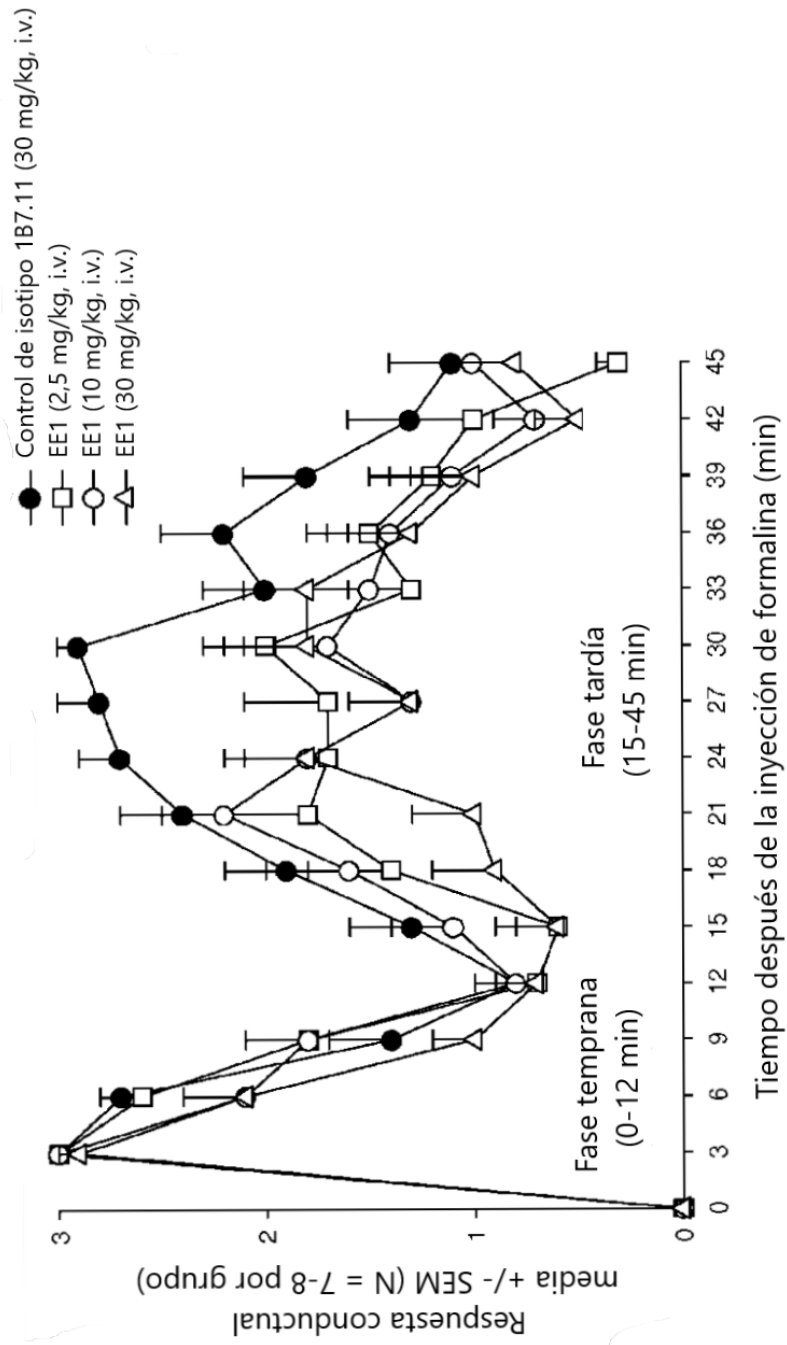


Figura 9

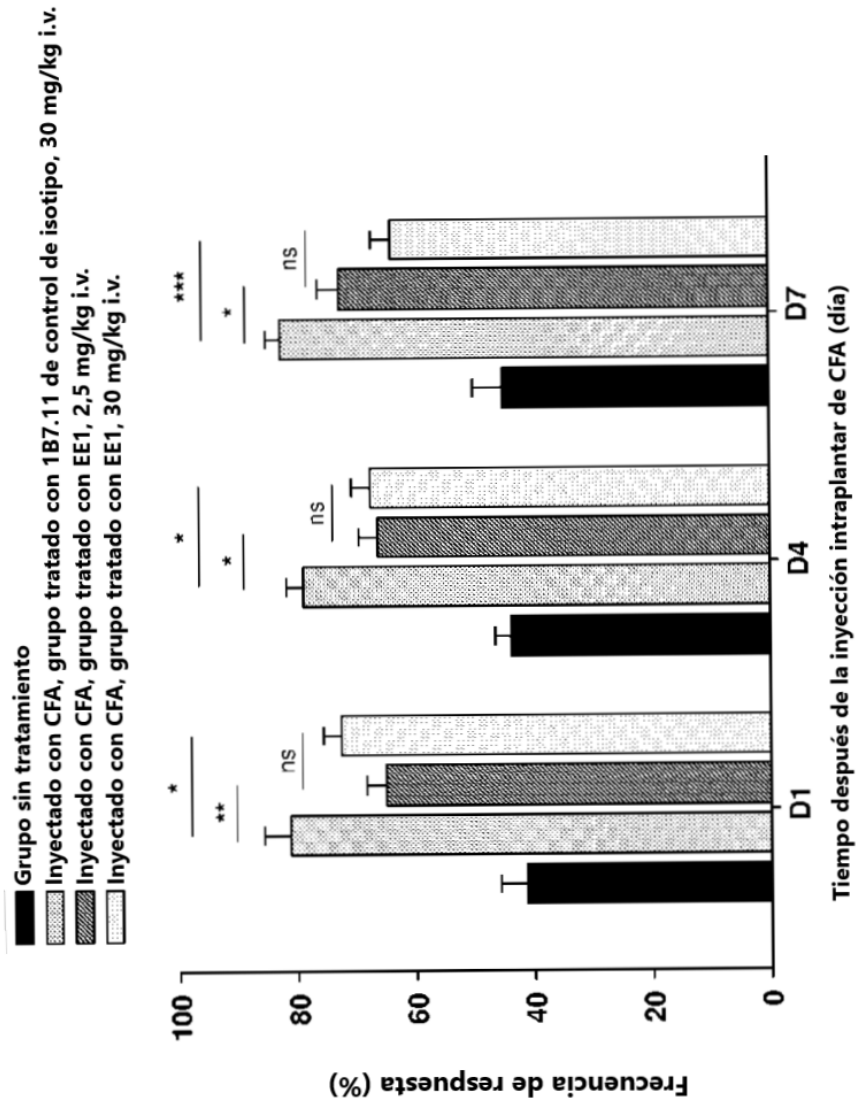


Figura 10

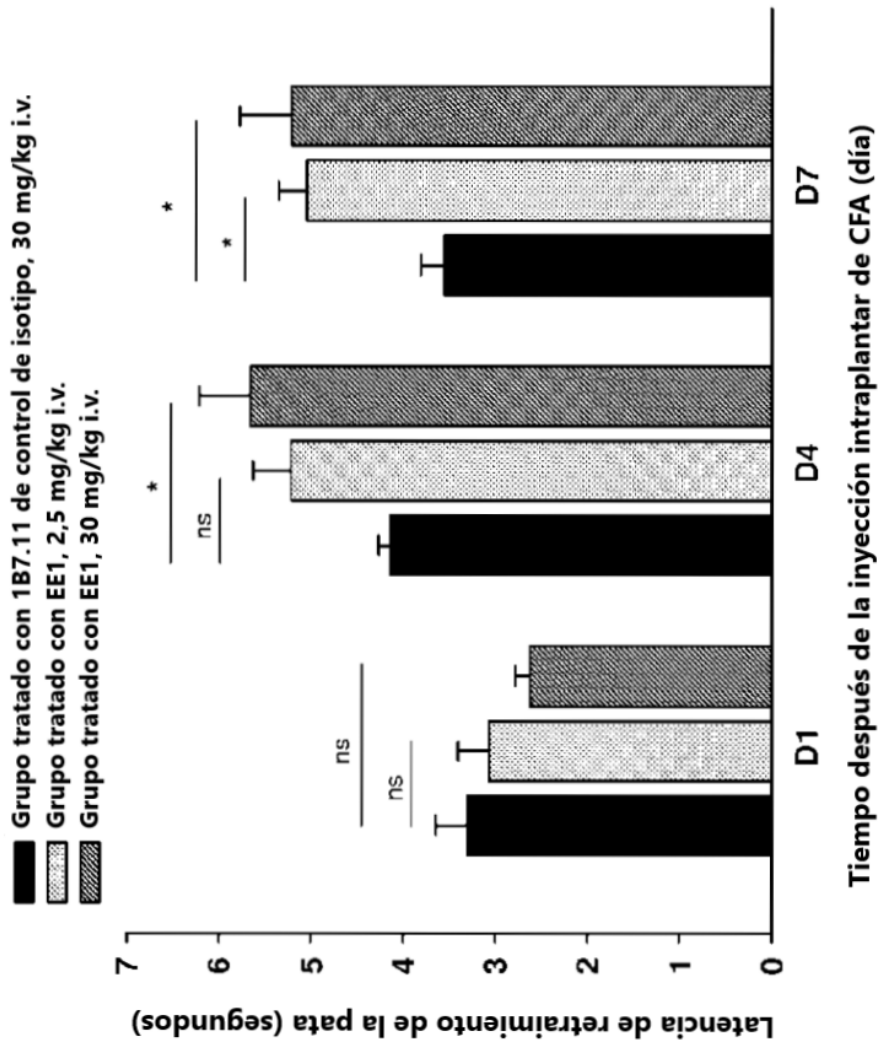


Figura 11

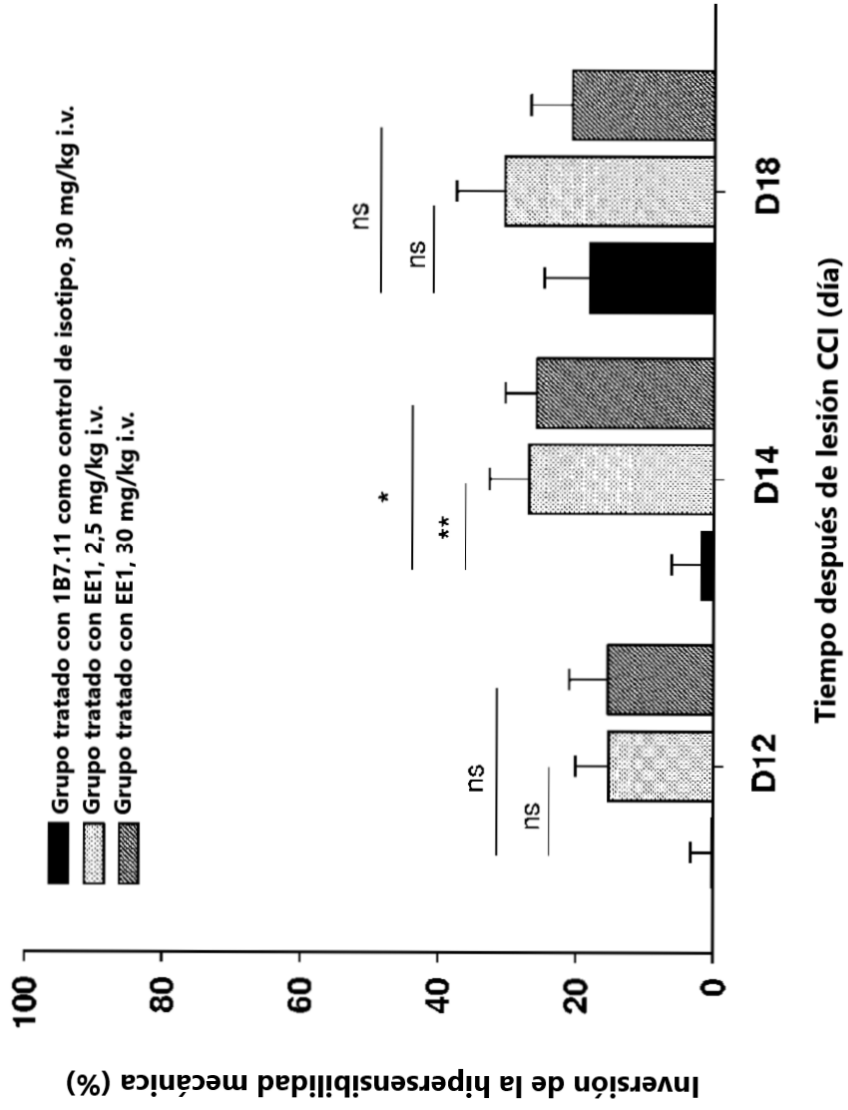


Figura 12

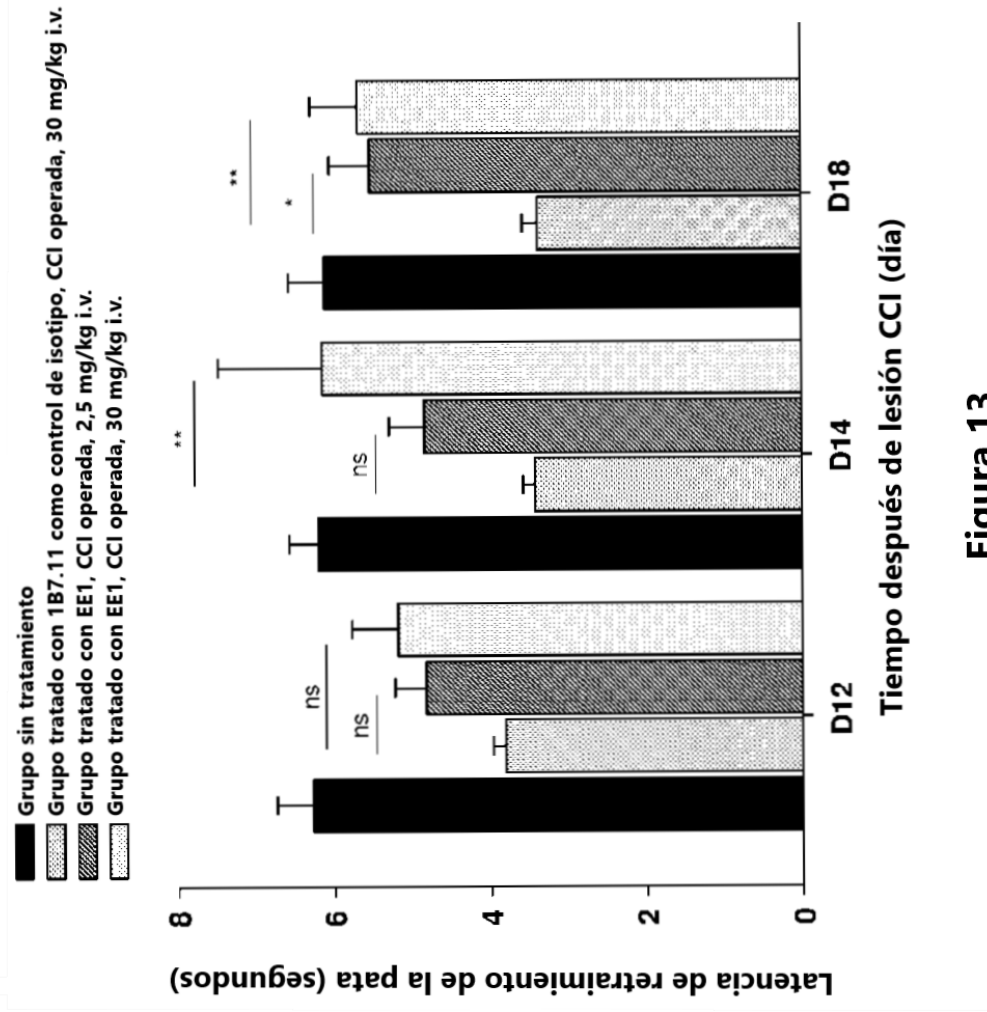


Figura 13

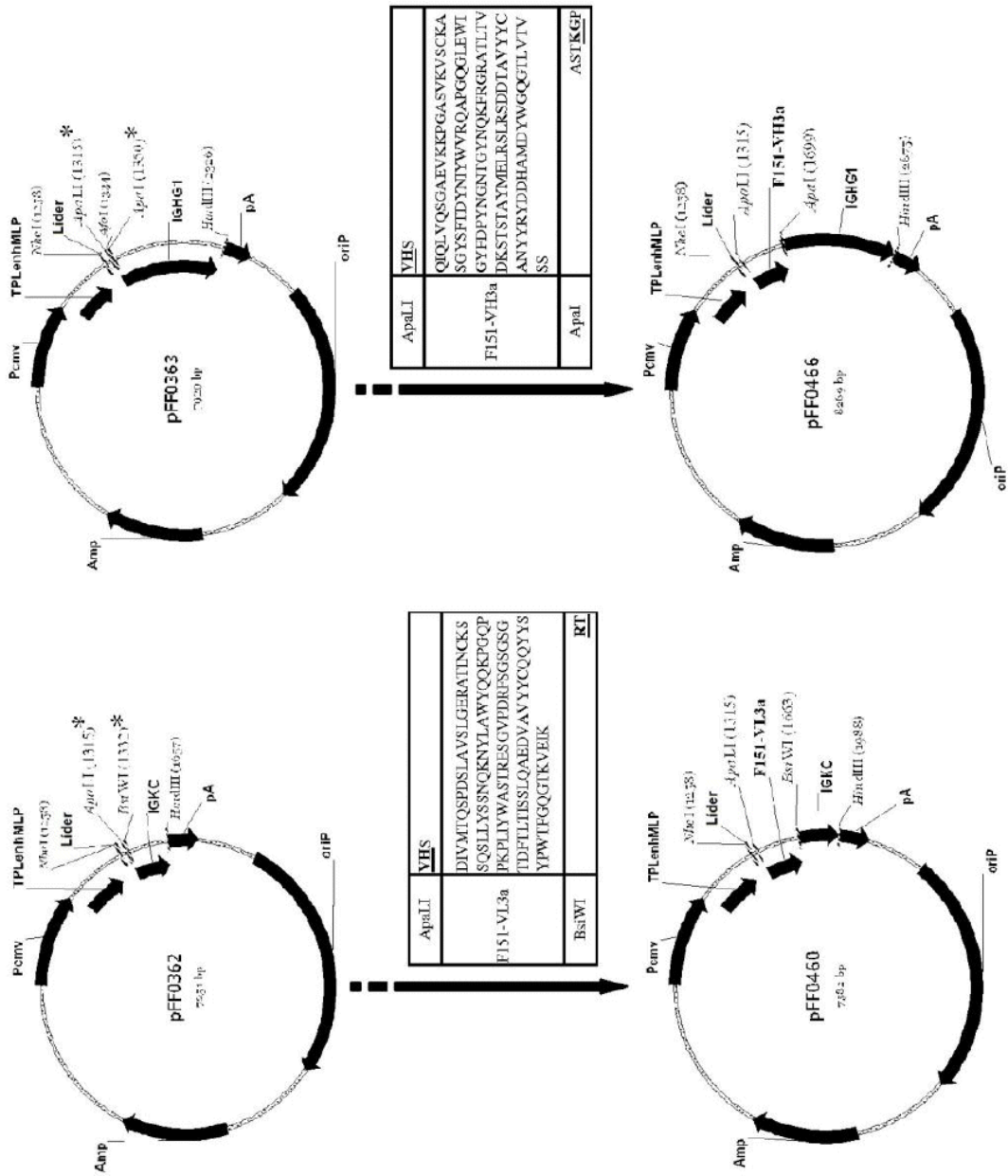


Figure 14

A.

```

10          20          30          40          50          60
F151LC DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSEQSLLYSNQKNYLAWYQQKPGQSPKPLIYWASTR
:: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
VK1  DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSI-----SSYLNWYQQKPKAPKLLIYAASSL
      10      20      30      40      50

      70      80      90      100      110
F151LC ESGVPDRFTGSGGTDFILIISSVKAEDLAIYYCQQYYSPFTFGGKLE (SEQ ID NO: 111)
:: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
VK1  QSCVPSRFSGCSGTDFILIISSLQPEDLAIYYCQQSYSTPFTFGQTIKE (SEQ ID NO: 112)
      60      70      80      90      100

```

B.

```

10          20          30          40          50          60
F151FC EIQLQQSGPELVKPGTSVKVSKASGYFIDYNIYWKQSHGKSLWIGYFDYPNGNIGY
:: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
VH1b  QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFISYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNY
      10      20      30      40      50      60

      70      80      90      100      110
F151FC NQKFRGKAILIVDKSSSTAFMHLSSLSLSDSVAIYICANY-YRYD--DHAMDYWGQTSVT
:: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
VH1b  AQKFQGRVTMTRDKSSSTAYMELSSLRSEDIAYIYCARWYCYDVFYAMDYWGQGLVT
      70      80      90      100      110      120

120
F151FC VSS (SEQ ID NO: 113)
:::
VH1b  VSS (SEQ ID NO: 114)

```

Figure 15

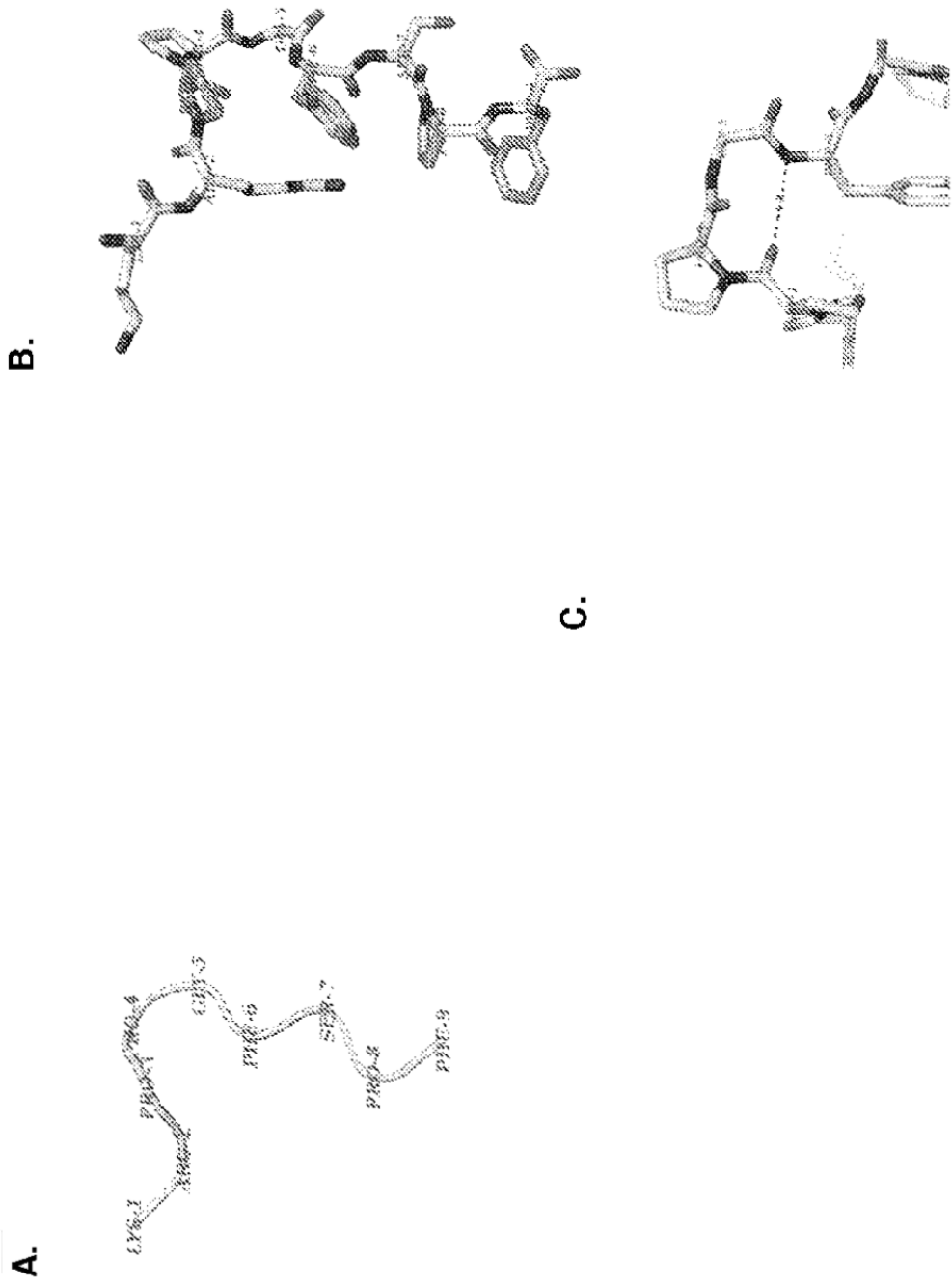


Figura 17