

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 687 520**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.09.2013** **PCT/EP2013/068907**
87 Fecha y número de publicación internacional: **20.03.2014** **WO14041069**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.09.2013** **E 13765328 (3)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.07.2018** **EP 2895512**

54 Título: **Anticuerpos específicos para polipéptido amiloide de islote humano (HIAPP) y usos de los mismos**

30 Prioridad:

12.09.2012 EP 12184134
12.09.2012 US 201261700110 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.10.2018

73 Titular/es:

NEURIMMUNE HOLDING AG (100.0%)
Wagistrasse 13
8952 Schlieren, CH

72 Inventor/es:

GRIMM, JAN;
HEITZ, FABRICE;
CHEN, FENG y
COMBALUZIER, IOANA

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

Observaciones :

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

ES 2 687 520 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 específicos para polipéptido amiloide de islote humano (HIAPP) y usos de los mismos

5 **Campo de la Invención**

La presente invención se refiere de manera general a moléculas novedosas que enlazan específicamente a polipéptido amiloide de islote humano (HIAPP) también conocido como amilina y/o su polipéptido amiloide de proislote precursor (proIAPP), particularmente anticuerpos humanos, así como a fragmentos, derivados y variantes de los mismos, que reconocen las proteínas IAPP, proIAPP, formas agregadas de IAPP, formas agregadas de proIAPP, y/o fibrillas de IAPP. Además, la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas y de diagnóstico que comprenden las moléculas de unión, anticuerpos y miméticos de los mismos valiosos tanto como una herramienta de diagnóstico para identificar IAPP, proIAPP, IAPP agregado, especies proIAPP y/o fibrillas de IAPP en plasma, como también en estrategias de vacunación pasiva para tratar trastornos relacionados con IAPP agregado, proIAPP agregado, y fibrillas de IAPP tal como diabetes mellitus tipo 2 (T2D) y rechazo de islote seguido de trasplante clínico de islote pancreática en individuos con diabetes mellitus tipo 1 (T1D).

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La acumulación, modificaciones y agregación de proteína son aspectos patológicos de numerosas enfermedades metabólicas incluyendo enfermedades neurodegenerativas bien conocidas como enfermedades de Huntington, Alzheimer (AD) y Parkinson (PD) (Taylor et al, Science 296 (2005), 1991-1995). La agregación de proteína patológica también está implicada en enfermedades metabólicas tal como diabetes mellitus tipo 2 (T2D) y en rechazo de islote después de trasplante clínico de islote pancreática en individuos con diabetes mellitus tipo 1 (T1D). El mal pliegue y la agregación de proteínas conduce al desarrollo de depósitos amiloides y parece estar directamente relacionados con toxicidad celular en estas enfermedades. El polipéptido amiloide islote (IAPP o amilina), un péptido fisiológico segregado junto con insulina mediante células β en el páncreas, forma agregados fibrilares en islotes pancreáticas (también llamados islotes de Langerhans) de pacientes T2D y se ha sugerido que desempeña un papel importante en el desarrollo de la enfermedad (Westermarck et al. (2011), Physiol. Rev. 91(3): 795-826). Además, tal como se mencionó anteriormente, los agregados de IAPP se ha descubierto en islotes pancreáticos al momento del trasplante de islotes aislados en pacientes con diabetes mellitus tipo 1 (T1D).

IAPP humano (HIAPP) es una hormona de péptido que consiste en 37 aminoácidos, con un puente de disulfuro entre los residuos de cisteína 2 y 7 y un C término amidado. Los islotes pancreáticos están compuestos del 65 al 80% de células β , las cuales producen y segregan insulina y IAPP esencial para regulación de niveles de glucosa en la sangre y metabolismo celular. IAPP se procesa a partir de la preprohormona preproIAPP, un precursor de 89 aminoácidos producidos en células- β pancreáticas.

PreproIAPP se disocia rápidamente de la traducción en polipéptido amiloide de proislote, un péptido de 67 aminoácidos, que pasa por proteólisis y modificaciones post-traducción adicionales para generar HIAPP. La expresión de HIAPP es regulada junto con la insulina, ya que una producción incrementada de insulina conduce a niveles HIAPP incrementados. HIAPP se libera de las células- β pancreáticas en la circulación sanguínea y está implicado en la regulación glicémica a través del vaciado gástrico y control de saciedad en sinergia con la insulina.

Aunque HIAPP actúa como un regulador del metabolismo celular bajo condiciones fisiológicas, HIAPP puede agregarse y formar fibrillas amiloides (amiloidosis IAPP) asociadas con deficiencia de célula- β y muerte de célula- β incrementada y masa de célula- β reducida. Las diversas evidencias señalan hacia una amiloidosis de HIAPP como un disparador importante para la patogénesis de T2D. En primer lugar, la deposición de las fibrillas de IAPP se encuentra en más del 90% de los pacientes con diabetes tipo-2 (Zraika et al. (2010), Diabetologia 53(6): 1046-1056). En segundo lugar, la agregación de HIAPP es tóxica para células β y se correlaciona con la reducción en las células- β que producen insulina (Butler et al. (2003), Diabetes 52(9): 2304-2314; Ritzel et al. (2007), Diabetes 56(1): 65-71; Jurgens et al. (2011), Am. J. Pathol. 178(6): 2632-2640). En tercer lugar, los modelos transgénicos de murino que expresan HIAPP muestran depósitos amiloides de islote pancreático y desarrollan en forma espontánea T2D (Janson et al. (1996), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(14): 7283-7288; Hoppener et al. (1999), Diabetologia 42(4): 427-434; Hull et al. (2003), Diabetes 52(2): 372-379; Butler et al. (2004), Diabetes 53(6): 1509-1516; Matveyenko et al. (2006), ILAR J. 47(3): 225-233; Hoppener et al. (2008), Exp. Diabetes Res. 697035). Recapitulan la enfermedad humana con disfunción de célula- β , deficiencia de la masa de célula- β y pérdida de célula- β , en comparación con lo que se observa en los tejidos de pacientes T2D. La expresión de HIAPP y la formación amiloide se correlaciona directamente con la apoptosis de célula- β y el desarrollo de diabetes en estos modelos, proporcionando de esta forma evidencia para la contribución de IAPP humana en el

desarrollo de la enfermedad. Además, el tratamiento que interfiere con la agregación de hIAPP disminuyó el fenotipo diabético e incremento la duración de vida del animal (Aitken et al. (2009), *Diabetes* 59(1): 161-171). La agregación y la amiloidosis de hIAPP es un prerrequisito para toxicidad. El roedor no amiloidogénico IAPP (rIAPP), que no tiene la capacidad de formar fibrillas como un resultado de la sustitución de seis aminoácidos, es no tóxico para células- β . En el desarrollo de la enfermedad, la agregación hIAPP patológica encontrada en islotes pancreáticos humanos puede originar disfunción de célula- β y muerte asociada con daño por secreción de insulina. Además, el incremento compensador en masa de célula- β e insulina y la secreción de amilina para mantener niveles de glucosa en sangre normales puede favorecer la formación de hIAPP oligómeros y la deposición de fibrillas de IAPP. Aunque los oligómeros hIAPP iniciales se consideran como la principal especie citotóxica, el producto final de la fibrila hIAPP también puede desempeñar un papel importante en la pérdida de célula- β (Meier et al. (2006), *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 291(6): E1317-1324; Haataja et al. (2008), *Endocr. Rev.* 29(3): 303-316; Engel et al. (2008), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105(16): 6033-6038). Las fibrillas de IAPP también se han observado en los lotes pancreáticos de donadores y se han asociado con pérdida de célula β después de trasplante de islotes pancreáticos clínicos en individuos con diabetes tipo-1 (Andersson et al. (2008), *Exp. Diabetes Res.* 562985; Udayasankar et al. (2009), *Diabetologia* 52(1): 145-153; Bohman et al. (2012), *Amyloid* 19(2): 87-93). El mecanismo exacto que conduce a la agregación de hIAPP y a la amiloidosis en T2D es desconocido. La resistencia a insulina en T2D incrementa la demanda de secreción a insulina junto con el contenido de célula proIAPP y la liberación de hIAPP, lo cual puede provocar amiloidosis ya que la formación de la fibrila hIAPP depende de la concentración. Otro mecanismo propuesto es la acumulación y agregación de proIAPP no procesado N-terminal originado por deficiencia en proteólisis en el establecimiento de la resistencia a insulina, ya que se encuentran formas de proIAPP parcialmente procesadas en depósitos amiloides, en particular el proIAPP₁₋₄₈ intermedio de 48 residuos (Marzban et al. (2006), *Diabetes* 55(8): 2192-2201). Dentro de este contexto, el procesamiento normal de proIAPP puede actuar como una semilla para amiloidosis hIAPP e incrementar la formación amiloide (Paulsson et al. (2005), *Diabetes* 54(7): 2117-2125; Paulsson et al. (2006), *Diabetologia* 49(6): 1237-1246; Marzban et al. (2006), *Diabetes* 55(8): 2192-2201). Por consiguiente ProlAPP también se considera como un objeto terapéutico adecuado.

Las características clínicas de T2D son altos niveles de glucosa en la sangre y resistencia y/o deficiencia de insulina. La diabetes mellitus es un grupo de enfermedades metabólicas que incluyen T1D, T2D, y diabetes gestacional. T2D, también nombrada como diabetes de generación en adultos, diabetes relacionada con la obesidad y diabetes mellitus no dependiente de insulina (NIDDM) es la forma de diabetes más común que abarca aproximadamente el 90% de todos los casos (Gerich et al. (1998), *Endocr. Rev.* 19(4): 491-503). T2D está caracterizada por una disminución en el número de células β que producen insulina funcional. Mientras progresa la patología, esto puede conducir a complicaciones a largo plazo tal como enfermedad cardiovascular, retinopatía diabética, que conduce a ceguera, deficiencia de riñón, infecciones frecuentes y amputaciones originadas por una circulación deficiente. Como consecuencia, T2D está asociada con una expectativa de vida más corta. La enfermedad afecta más de 300 millones de personas a nivel mundial dando como resultado más de un millón de muertes anualmente. Tanto los determinantes genéticos como los factores ambientales conducen al desarrollo de la enfermedad, con obesidad, inactividad física y envejecimiento considerada como la causa primaria (Kahn et al. (2006), *Nature* 444(7121): 840-846).

Los tratamientos actuales para T2D incluyen manejo del estilo de vida (dieta y ejercicio) e intervención farmacológica tal como suministro de metformina e insulina para disminuir los niveles de glucosa en la sangre, ya sea estimulando al páncreas a liberar insulina o incrementando la respuesta de insulina. Esos tratamientos están basados en una mejoría sintomática de la diabetes, con la consecuencia de una carencia de durabilidad. De hecho, ninguno de los tratamientos disponibles ha mostrado contrarrestar la agregación de hIAPP y la pérdida de células- β pancreática. Las nuevas estrategias de tratamiento que implican análogos del péptido 1 de glucagón (GLP-1) (Butler et al. (2009), *Diabetologia* 53(1): 1-6) e inhibidores de la peptidasa 4 de dipeptidilo de enzima de desactivación de GLP-1 (DDP4) están basados en los efectos insulínico potente de GLP-1 y sus efectos para incrementar la proliferación de célula- β . De manera importante, la liberación de insulina incrementada también está acoplada a la liberación de amilina incrementada. En forma experimental, la secreción de insulina estimulada mostrada para promover el desarrollo de amiloidosis de islote en modelos animales y se pueden esperar efectos similares en humanos (Aston-Mourney et al. (2011), *Diabetologia* 54(7): 1756-1765). Estos tratamientos por consiguiente pueden agravar potencialmente la amiloidosis de islote. Las estrategias más recientes y prometedoras implican el desarrollo de fármacos antiinflamatorios o anticuerpos que dirigen la trayectoria IL-1 β (Donath et al. (2008), *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* 4(5): 240-241; Ehes et al. (2009), *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 106(33): 13998-14003; Owyang et al. (2010), *Endocrinology* 151(6): 2515-2527; Dinarello et al. (2010), *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* 17(4): 314-321; Boni-Schnetzler et al. (2011), *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93(10): 4065-4074; Boni-Schnetzler et al. (2012), *Br. J. Clin. Pharmacol.*; Cavelti-Weder et al. (2012), *Diabetes Care*). Es importante observar, que los estudios recientes muestran que hIAPP induce específicamente la inflamación - sistema IL-1 β que conduce a la activación del sistema inmune innato (Masters et al. (2010), *Nat. Immunol.* 11(10): 897-904; Mandrup-Poulsen et al. (2010), *Nat. Immunol.* 11(10): 881-883), soportando de esta forma una estrategia terapéutica que se dirige a la agregación de hIAPP. Además, se ha sugerido la utilización de anticuerpos monoclonales

que reaccionan con hIAPP agregado/fibrilar y/o con hIAPP oligomérico para el tratamiento de T2D (WO2003/092619 y WO 2011/151833).

5 Estos descubrimientos señalan el beneficio potencial asociado con los métodos de inmunoterapia activa o pasiva que dirigen hIAPP y/o proIAPP.

Resumiendo lo anterior, se necesitan urgentemente estrategias terapéuticas novedosas que atiendan la hIAPP agregada, proteínas proIAPP y/o oligómeros hIAPP y/o fibrillas con una terapia eficaz y segura.

10 La inmunización pasiva con anticuerpos humanos que son optimizados en forma de evolución y la afinidad madurada por el sistema inmune humano pueden proporcionar una nueva avenida terapéutica con una alta probabilidad de excelente eficacia y seguridad.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

15 La presente invención se refiere a realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones y hace uso de la respuesta inmune específica de hIAPP de sujetos humanos saludables para el aislamiento de anticuerpos monoclonales humanos específicos de anti-hIAPP naturales. En particular, los experimentos llevados a cabo según la presente invención fueron exitosos en el aislamiento de anticuerpos monoclonales específicos de hIAPP y/o proIAPP de un conjunto de sujetos
20 humanos saludables o de un conjunto de pacientes obesos y otros grupos de pacientes con riesgo incrementado de desarrollar T2D, los cuales al momento del aislamiento del anticuerpo no mostraron signos de T2D.

La presente invención se dirige por lo tanto a anticuerpos humanos, fragmentos de unión a antígeno y moléculas de unión a antígeno similares, tal como se caracteriza en las reivindicaciones, que tienen la capacidad de reconocer
25 específicamente IAPP y/o proIAPP. Si no se indica de otra manera, por el término "que reconoce en forma específica IAPP y/o proIAPP", "anticuerpo específico de/para IAPP y/o proIAPP" y "anticuerpo anti-IAPP y/o anti-proIAPP" se entiende específicamente, de manera general y colectiva anticuerpos para la forma monomérica nativa de IAPP; anticuerpos para la forma de precursora proIAPP de IAPP; anticuerpos de unión específico a otras formas, IAPP y proIAPP; anticuerpos que enlazan a especies IAPP y/o proIAPP, agregadas, oligoméricas, fibrilares y/o no fibrilares. En
30 la presente invención se proporciona a anticuerpos humanos selectivos para formas de longitud total y/o agregadas, tal como formas agregadas oligoméricas, fibrilares y no fibrilares de IAPP y/o proIAPP.

En una realización particularmente preferida de la presente invención, el anticuerpo humano o fragmento de unión a antígeno del mismo muestra las características de unión inmunológicas de un anticuerpo caracterizado por las regiones
35 variables V_H y/o V_L tal como se establece en la figura 1A-E, H y I.

El fragmento de unión a antígeno del anticuerpo puede ser un fragmento F_v de cadena simple, un fragmento F(ab'), un fragmento F(ab), y un fragmento F(ab')₂, o cualquier otro fragmento de unión a antígeno. En una realización específica,
40 infra, el anticuerpo o fragmento del mismo es un anticuerpo de isotipo IgG humano. Alternativamente, el anticuerpo es un anticuerpo de roedor humano quimérico o roedorizado, tal como murino o murinizado, anticuerpo de rata o ratinizado, siendo las versiones de roedor particularmente útiles para métodos de diagnóstico y estudios en animales.

Además, la presente invención se refiere a composiciones que comprenden el anticuerpo de la presente invención o fragmentos activos del mismo y a métodos inmunoterapéuticos o inmunodiagnóstico que utilizan dichas composiciones
45 en la prevención, diagnóstico o tratamiento de trastornos relacionados con IAPP, tal como T2D, en donde se administra a un paciente que necesita del mismo una cantidad efectiva de la composición.

La presente invención también se refiere a polinucleótidos que codifican al menos una región variable de una cadena de inmunoglobulina del anticuerpo de la presente invención. Dicha región variable comprende regiones determinantes de
50 complementariedad (CDR) de la región variable V_H y V_L tal como se establece en la figura 1A-E, H e I.

Por consiguiente, la presente invención también comprende vectores que comprenden los polinucleótidos y células huésped transformadas a partir de los mismos, así como a su uso para la producción de un anticuerpo y moléculas de unión equivalentes que son específicas para IAPP y/o proIAPP. Los medios y métodos para la producción recombinante
55 de anticuerpos y miméticos de los mismos, así como a métodos para clasificar las moléculas de unión de competición, que pueden o no ser anticuerpos, son conocidos en la técnica. Sin embargo, tal como aquí se describe, en particular con respecto a las aplicaciones terapéuticas en humanos, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo humano en el sentido de que la aplicación de dicho anticuerpo está sustancialmente libre de una respuesta inmune dirigida contra el anticuerpo, observada de otra forma para anticuerpos quiméricos e incluso humanizados.

Además, en el presente documento se describen composiciones y métodos que se pueden utilizar para identificar IAPP y/o prolAPP en muestras y/o *in vivo*. Los anticuerpos anti-IAPP y/o prolAPP o los fragmentos de unión de IAPP y/o prolAPP de los mismos descritos, se pueden utilizar para clasificar sangre, plasma, suero, saliva, fluido peritoneal, fluido cerebroespinal ("CSF"), y orina humana para la presencia de IAPP y/o prolAPP en las muestras, por ejemplo, utilizando un ensayo adaptado por superficie o a base de ELISA. En una realización de la presente invención que se refiere a un método para el diagnóstico o control del progreso de una enfermedad relacionada con IAPP y/o prolAPP en un sujeto, el método comprende determinar la presencia de oligómeros, agregados o fibrillas de IAPP y/o prolAPP en una muestra del sujeto que será diagnosticado con al menos un anticuerpo de la presente invención, en el que la presencia de los oligómeros, agregados o fibrillas de IAPP y/o prolAPP, es indicativa del trastorno.

Además, en una realización de la presente invención se proporcionan los anticuerpos anti-IAPP y/o prolAPP o fragmentos de unión a IAPP y/o prolAPP de los mismos para el uso en la detección *in vivo* (también llamada generación de imagen *in vivo*) de o la dirección de un agente terapéutico y/o de diagnóstico a IAPP y/o prolAPP en el cuerpo humano o de animal. Los métodos y composiciones aquí descritos pueden ayudar a trastornos relacionados con IAPP y caracterizados, por ejemplo, mediante el surgimiento de formas agregadas oligoméricas, fibrilares y no fibrilares de, IAPP y/o prolAPP tal como diagnóstico de T2D y pueden utilizarse para monitorear el progreso de la enfermedad y eficacia terapéutica de la terapia proporcionada al sujeto, por ejemplo, en métodos de diagnóstico relacionados con generación de imagen *in vivo*. Por consiguiente, en una realización se proporciona la molécula de unión a IAPP y/o prolAPP de la presente invención, en donde la detección *in vivo* (generación de imagen) comprende tomografía de emisión de positrones (PET), tomografía de emisión de fotón simple (SPECT), generación de imagen óptica casi infrarroja (NIR) o imágenes de resonancia magnética (MRI).

Por lo tanto, la presente solicitud también describe métodos para tratar, diagnosticar o prevenir una enfermedad relacionada con IAPP y/o prolAPP oligomérico y/o agregado fibrilar y/o no fibrilar, tal como Diabetes Tipo 2 (T2D). Los métodos comprenden administrar una concentración efectiva de un anticuerpo o de activado de anticuerpo humano al sujeto, en donde el anticuerpo se dirige a IAPP y/o prolAPP.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un péptido, tal como se caracteriza en las reivindicaciones, que tiene un epítipo de IAPP y/o prolAPP reconocido en forma específica por un anticuerpo de la presente invención. El péptido comprende o consiste de una secuencia de aminoácidos tal como se indica más adelante en la descripción detallada y en los ejemplos. Además, la presente invención proporciona un método para diagnosticar T2D o el riesgo de desarrollar T2D en un sujeto, en donde el método comprende determinar la presencia del paso de un anticuerpo que enlaza al péptido en una muestra biológica del sujeto.

Las realizaciones adicionales de la presente invención podrán ser apreciadas a partir de la descripción y Ejemplos que se encuentran más adelante.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Secuencias de aminoácido y nucleótido de la región variable, es decir, cadena pesada y cadena ligera kappa/lambda de anticuerpos IAPP humanos NI-203.9A2 (A), NI-203.19H8 (B), NI-203.26C11 (C), NI-203.8E3 (D), NI-203.11B12 (E), NI-203.205F8 (F), NI-203.9B3 (G), NI-203.19F2 (H), y NI-203.15C7 (I). Las regiones de estructura (FR) y de determinación de complementariedad (CDRs) están indicadas con las CDRs que están subrayadas. La región de unión de cadena pesada (JH) y la región de unión de cadena ligera (JK) están indicadas también. Debido a la estrategia de clonación, la secuencia de aminoácidos en el N-término de la cadena pesada y la cadena ligera pueden contener potencialmente alteraciones inducidas por cebador en FR1, lo cual sin embargo, no afecta sustancialmente la actividad biológica del anticuerpo. Con el objeto de proporcionar un anticuerpo humano de consenso, las secuencias de nucleótido y aminoácidos del clon original fueron alineadas con y afinadas según las secuencias de región variable de línea germinal humana pertinente en la base de datos. Ver por ejemplo, Vbase (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) albergado por el MRC Centre for Protein Engineering (Centro MRC de Diseño de Proteínas)(Cambridge, UK). La secuencia de aminoácido de los anticuerpos humanos se indica cuando se considera que los aminoácidos de N-término se desvían potencialmente de la secuencia de la línea germinal del consenso debido al cebador PCR y por lo tanto han sido reemplazados por la corrección de mutación inducida por cebador (PIMC). Los aminoácidos modificados por PIMC están indicados por letras negritas en las secuencias.

Figura 2: Las secuencias de aminoácido y nucleótido de la región variable, es decir, cadena pesada y cadena ligera kappa/lambda de los anticuerpos prolAPP humanos NI-203. ID 10 (A), NI-203.2A11 (B), NI-203.10C4 (C), NI-203.20H9 (D), NI-203.26D2 (E) y NI-203.60H3 (F). Las regiones de estructura (FR) y de determinación de complementariedad

(CDRs) están indicadas con las CDRs subrayadas. La región de unión de cadena pesada (JH) y región de unión de cadena ligera (JK) también están indicadas. Debido a la estrategia de clonación la secuencia de aminoácidos del N-término de la cadena pesada y cadena ligera puede contener potencialmente alteraciones inducidas por cebadores en FR1, lo cual, sin embargo, no afecta sustancialmente la actividad biológica del anticuerpo. Con el objeto de proporcionar un anticuerpo humano de consenso, las secuencias de nucleótido y aminoácidos del clon original fueron alineadas con y afinadas según las secuencias de región variable de línea germinal humana pertinentes en la base de datos; ver por ejemplo, Vbase (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) albergada por MRC Centre for Protein Engineering (Centro MRC de Diseño de Proteínas) (Cambridge, UK). La secuencia de aminoácido de los anticuerpos humanos se indica cuando se considera que los aminoácidos de N-término se desvían potencialmente de la secuencia de línea germinal de consenso debido al cebador PCR y por lo tanto han sido reemplazados por la corrección de mutación inducida por el cebador (PIMC). Los aminoácidos modificados por PIMC están indicados en letras negritas en las secuencias.

Figura 3: Especificidad de unión a IAPP de anticuerpos recombinantes humanos evaluados mediante ELISA directo. (A) Imagen de microscopio de electrón de la solución IAPP (2 mg/ml) utilizada para el recubrimiento de la placa ELISA. La barra de escala representa 1 μ m. (B) NI-203.9A2, NI-203.19H8, NI-203.26C 11 y NI-203.8E3 recombinante mostraron una unión específica IAPP (10 μ g/ml) humano. Se utiliza BSA (10 μ g/ml) como un control para determinar una unión no específica. Los datos se expresan como valores OD en 450 nm.

Figura 4: Determinación EC_{50} de los anticuerpos anti-IAPP derivados de humanos recombinantes para IAPP y proIAPP. (A) Imágenes de microscopio de electrones de las soluciones IAPP y proIAPP (2 mg/ml) utilizadas para recubrimiento de placa ELISA. La barra de escala representa 1 μ m. (B) Las placas se incubaron con las concentraciones indicadas de anticuerpos derivados de humanos recombinantes NI-203.9A2, NI-203.19H8, NI-203.26C 1 1 o NI-203.8E3. Los anticuerpos NI-203.9A2, NI-203.19H8, NI-203.26C1 1 y NI-203.8E3 enlazados con alta afinidad a IAPP humano (■, 10 μ g/ml) con una EC_{50} de 9 nM, 22 nM, 6 nM y 4 nM, respectivamente. NI-203.26C 11 también enlaza proIAPP (□, 10 μ g/ml) con una EC_{50} de 260 nM. Las medidas se elaboraron por duplicado y la señal de fondo en BSA se restó. Los datos se expresan como valores OD promedio en 450 nm.

Figura 5: Los anticuerpos anti-IAPP derivados de humanos son específicos de fibrillas de IAPP. (A) Imágenes de microscopio de electrones de soluciones IAPP (2 mg/ml) y no fibrilar IAPP (500 μ g/ml) utilizadas para el recubrimiento de placas ELISA. Aunque la solución IAPP contiene fibrillas, las fibrillas de IAPP no aparecen en la solución no fibrilar IAPP. La barra de escala representa 1 μ m. (B) Las placas fueron incubadas con las concentraciones indicadas en los anticuerpos derivados de humanos recombinantes NI-203.9A2, NI-203.19H8, NI-203.26C11 o NI-203.8E3. Los anticuerpos NI-203.9A2, NI-203.19H8, NI-203.26C11 y NI-203.8E3 enlazan con alta afinidad a las fibrillas de IAPP (solución IAPP, ■, 10 μ g/ml) y con afinidad muy baja para IAPP no fibrilar (Δ , 10 μ g/ml), lo que sugiere especificidad hacia las fibrillas de IAPP. Las medidas se elaboraron por duplicado y se restó la señal de fondo en BSA. Los datos se expresan como valores promedio OD en 450 nm.

Figura 6: Epítomos de unión a IAPP de anticuerpos recombinantes humanos valuados por análisis de pepscan. (A) Imágenes Pepscan de anticuerpos derivados de humano NI-203.19H8 y NI-203.26C11 (1 μ g/ml). La unión NI-203.19H8 ocurrió en los péptidos 6 y 7 (fila A) que cubre los aminoácidos 19-25 (péptido 6: 16-LVHSSNNFGA-25 SEQ ID NO: 6, péptido 7: 19-SSNNFGAILS-28 SEQ ID NO: 8, secuencia de unión de consenso: 19-SSNNFGA-25 SEQ ID NO: 4). La unión NI-203.26C11 ocurrió en el péptido 1 (fila A) que cubre los aminoácidos 1-10 (péptido 1: 1-KCNTATCATQ- 10 SEQ ID NO: 9) pero no en el péptido 2 que cubre los aminoácidos 4-13 (péptido 2: 4-TATCATQRLA-13 SEQ ID NO: 10). La sustitución o reemplazo de alanina en los residuos 2 a 8 en los péptidos 33 a 39 y 41 (fila C) dañaron la unión de NI-203.26C11 (33 mutación de péptido: C2A, mutación de péptido 34: N3A, mutación de péptido 35: T4A, mutación de péptido 36: A5G, mutación de péptido 37: A5P, mutación de péptido 38: T6A, mutación de péptido 39: C7A, mutación de péptido 41: A8P). Se utilizó como control únicamente IgG Fcy anti-humano de burro conjugado con HRP secundario (1:20000; Ilary Ab). (B) Los epítomos de unión identificados de los anticuerpos específicos de IAPP derivados de diferentes humanos dentro del aminoácidos indicados de la secuencia de proteína IAPP humana. Panel superior: secuencia de aminoácidos del IAPP humano de longitud total (aminoácidos 1-37). NI: epítomo de unión no identificado.

Figura 7: Los anticuerpos NI-203.9A2, NI-203.19H8 y NI-203.26C11 reconocieron en forma específica el amiloide IAPP patológico en el páncreas de pacientes diagnosticados con diabetes mellitus tipo 2 (T2D). Los anticuerpos NI-203.9A2, NI-203.19H8 y NI-203.26C11 muestran manchado en islotes pancreáticos T2D de cargados con fibrillas de IAPP (amiloide) (A, B) pero no en islotes pancreáticos T2D que carecen de fibrillas de IAPP (C, D). (A) Manchado con tioflavina S (ThioS, panel izquierdo) y rojo Congo (CR, panel derecho) de amiloide en islotes pancreáticos de un paciente T2D. (B) Detección de fibrillas de IAPP en islotes pancreáticos T2D de positivos amiloides con anticuerpos NI-203.9A2, NI-203.19H8 y NI-203.26C11 (café-CR) en 50 nM (panel grande e inserto izquierdo inferior) y 5 nM (inserto derecho inferior). (C) Ausencia de amiloide islotes pancreáticos de un paciente T2D, tal como se muestra mediante manchado

negativo de tioflavina S (ThioS, panel izquierdo) y rojo Congo (CR, panel derecho). (D) Ausencia de manchado en islotes pancreáticos T2D negativos amiloides con anticuerpos NI-203.9A2, NI-203.19H8 y NI-203.26C11 en 50 nM. Se utilizó como un control únicamente anticuerpos antihumano de burro secundario (Ilary Ab). Insertos inferiores: imágenes de alta magnificación de islotes pancreáticos humanos individuales. Se mancharon los islotes pancreáticos humanos con anticuerpo de anti-insulina (azul en original (i.o.), aquí manchado fuerte) y se llevó a cabo un contramanchado para visualizar el núcleo celular (azul pálido, i.o., aquí manchado pálido).

Figura 8: Los anticuerpos NI-203.9A2, NI-203.19H8 y NI-203.26C11 no reconocen IAPP fisiológico en páncreas de control humano. Los anticuerpos NI-203.9A2, NI-203.19H8 y NI-203.26C11 (50 nM) mostraron manchado débil en islotes de control humanos cuando se compararon con el anticuerpo de control IAPP (1: 100; Ab de control). Se utilizó únicamente anticuerpo anti-humano de burro secundario (Ilary Ab) como un control. Se mancharon islotes pancreáticos humanos con anticuerpo de anti-insulina (azul en original (i.o.), aquí manchado fuerte) y se llevó a cabo el contramanchado para visualizar el núcleo celular (azul pálido i.o., aquí manchado pálido).

Figura 9: Los anticuerpos NI-203.9A2, NI-203.19H8 y NI-203.26C11 reconocen las fibrillas de IAPP patológicas en un páncreas de gato diabético. Detección de fibrillas de IAPP en islotes pancreáticos de un gato T2D con anticuerpos NI-203.9A2, NI-203.19H8 y NI-203.26C11 (50 nM, café-CR). Se mancharon fibrillas de IAPP (amiloides) con rojo Congo (CR). Se utilizó como un control únicamente anticuerpos anti-humano de burro secundario (Ilary Ab). Insertos inferiores: imágenes de alta magnificación de islotes pancreáticos de gato individuales. Se mancharon los islotes pancreáticos de gato con un anticuerpo anti-insulina (azul en original (i.o.), aquí manchado fuerte) y se llevó a cabo el contramanchado para visualizar los núcleos celulares (azul pálido i.o., aquí manchado pálido).

Figura 10: Los anticuerpos NI-203.9A2, NI-203.19H8 y NI-203.26C11 no reconocen los depósitos A β patológicos en un cerebro humano con la enfermedad de Alzheimer. La ausencia de manchado con anticuerpos NI-203.9A2, NI-203.19H8 y NI-203.26C11 (50 nM), en oposición al anticuerpo específico de A β 6E10 (1:2000; Ab el control). Se utilizó como un control únicamente el anticuerpo anti-humano de burro secundario (Ilary Ab). El contramanchado se llevó a cabo para visualizar los núcleos celulares (azul pálido i.o., aquí manchado pálido).

Figura 11: Los anticuerpos quiméricos humanos y de ratón recombinantes NI-203.9A2, NI-203.19H8 y NI-203.26C11 se enlazan con igual afinidad a IAPP humano. (A) Determinación EC₅₀ de los anticuerpos anti-IAPP quiméricos de ratón y humano recombinantes para IAPP (■, 10 μ g/l) y BSA (◇, 10 μ g/ml). Las placas se incubaron con las concentraciones de anticuerpos idénticas. Las medidas se llevaron a cabo por duplicado. Los datos se expresan como valores promedio OD en 450 nm. (B, C) Valores EC₅₀ de anticuerpos quiméricos de humano y ratón.

Figura 12: El anticuerpo quimérico de ratón recombinante NI-203.9A2, NI-203.19H8 y NI-203.26C11 reconoce las fibrillas de IAPP patológicas en el páncreas de pacientes diagnosticados con diabetes mellitus tipo 2 (T2D). Detección de fibrillas de IAPP en islotes pancreáticos de dos pacientes T2D humanos (1 y 2) con anticuerpos NI-203.9A2, NI-203.19H8 y NI-203.26C11 quiméricos en 50 nM (café i.o., aquí manchado fuerte de oscuro a color negro. Se mancharon islotes pancreáticos humanos con anticuerpo anti-insulina (azul i.o., aquí manchado fuerte) y se llevó a cabo el contramanchado para visualizar los núcleos celulares (azul pálido, i.o., aquí manchado pálido).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En diabetes tipo-2 (T2D) las determinantes genéticas y los factores ambientales conducen al desarrollo de resistencia a insulina seguido de un incremento compensador en la masa de célula beta y en la secreción de insulina y amilina (hIAPP) para mantener niveles de glucosa en sangre normales. Las altas concentraciones de amilina resultantes favorecen la formación de oligómeros de polipéptido de amiloide de islote humano tóxicos (hIAPP) y la deposición de fibrillas de IAPP que se encuentran más del 90% de los pacientes con diabetes tipo-2. La deposición de hIAPP se correlaciona con la reducción en células beta que producen insulina y también se propone que desempeñan un papel importante para la pérdida de las células- β en islotes pancreáticos transplantados en individuos con diabetes tipo-1. Los diversos anticuerpos derivados de humano de conjuntos de donadores saludables y obesos con alto riesgo de diabetes tipo-2 pero la ausencia de enfermedad, han sido identificados y caracterizados *in vitro*, clonados y producidos en forma recombinante mediante tecnología Neurimmune's RTM™ tal como se describe con detalle en la Solicitud Internacional WO2008/081008 y se proporcionan en la presente invención. Los candidatos principales son validados en ratones transgénicos que expresan hIAPP y se exponen a una dieta con alto contenido de grasa. La eficacia terapéutica se evaluó determinando la masa de célula beta y la carga amiloide hIAPP en el páncreas, así como los niveles en plasma hIAPP, y pruebas funcionales del metabolismo de glucosa y secreción de insulina.

La forma de diabetes más común, que abarca hasta aproximadamente el 90% de todos los casos. La enfermedad afecta

a más de 200 millones de personas a nivel mundial, dando como resultado en más de un millón de muertes anualmente por diabetes. Más de 300,000 pacientes son afectados en Suiza. La prevalencia de la diabetes incrementa dramáticamente tanto en países desarrollados como en desarrollo debido al crecimiento, envejecimiento de la población, organización y prevalencia cada vez mayor de la obesidad y la inactividad física. El mercado global de diabetes tipo 2 es 25 billones de dólares americanos se prevé que alcance 35 billones de dólares americanos en 2016 con un rango de crecimiento anual del 6.4% entre el 2009 y el 2016. Los tratamientos actuales incluyen manejo de dieta e intervención farmacológica que actúan en diferentes trayectorias para disminuir los niveles de glucosa en la sangre, ya sea mejorando la sensibilidad a insulina o estimulando al páncreas para liberar insulina. Ninguno de los tratamientos disponibles sin embargo, pueden contrarrestar la agresión de hIAPP y la pérdida de células beta pancreáticas. Las nuevas estrategias de tratamiento para la diabetes tipo 2 implican análogos del péptido 1 de glucagon (GLP-1) e inhibidores de la peptidasa-4 de dipeptidilo (DPP 4), cuya enzima inactiva el GLP-1 endógeno. Estas estrategias están basadas en el efecto insulínico potente de GLP-1 y su efecto para incrementar la proliferación de célula beta. De manera importante, la liberación de insulina incrementada también se acopla a la liberación de amilina incrementada. Experimentalmente, la secreción de insulina estimulada ha mostrado promover el desarrollo de amiloidosis de islote en modelos animales y, se pueden esperar efectos similares en humanos. Además del uso particular de moléculas de unión a IAPP de la presente invención, por consiguiente un método terapéutico propuesto adicional es una terapia de combinación atractiva de las moléculas y los tratamientos novedosos antes indicados.

1. Definiciones

A menos que se manifieste lo contrario, un término tal como aquí se utiliza se proporciona como la definición según Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology (Diccionario de Bioquímica y Biología Molecular de Oxford), Oxford University Press, 1997, revisado el 2000 y reimpresso el 2003, ISBN 0 19 850673 2.

Si no se especifica claramente lo contrario, el término "IAPP", se utiliza de manera intercambiable para referirse específicamente a la forma monomérica, oligomérica, no fibrilar y fibrilar nativa del péptido de amiloide de islote (IAPP). El término "IAPP" también se utiliza para identificar generalmente otros conformadores de IAPP, por ejemplo, oligómeros y/o agregados de IAPP, tal como IAPP-fibrillas.

El término "IAPP" también se utiliza para referirse colectivamente a todos los tipos y formas de IAPP. El término proIAPP se utiliza de manera intercambiable para referirse específicamente a la forma nativa monomérica, oligomérica, fibrilar y/o agregada del péptido precursor del polipéptido amiloide de islote (proIAPP). Las letras agregadas en la parte frontal de los términos IAPP o proIAPP se utilizan para indicar el organismo del ortólogo particular que se está originando de, por ejemplo, hIAPP para IAPP humano o mIAPP para origen de murino.

La secuencia de aminoácido de 37 aa para IAPP humanos es:
KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGAILSSTNVGSNTY (SEQ ID NO: 1) con un puente de disulfuro entre los residuos de cisteína 2 y 7 y el C-termino amidado.

IAPP se procesa a partir de la preprohormona preproIAPP, un precursor de 89 aminoácidos producidos en células β pancreáticas. La secuencia de proteína para preproIAPP humano es:
MGILKLQVFLIVLSVALNHLKATPIESHQVEKRKCNTATCATQRLANFLVHSSNNF
GAILSSTNVGSNTYGKRNAVEVLKREPLNYLPL (SEQ ID NO: 2), cuya secuencia puede encontrarse también en las bases de datos pertinentes, por ejemplo, en la base de datos: UniProtID: P10997 (IAPP_HUMAN).

PreproIAPP se disocia rápidamente después de la transición en el polipéptido amiloide de proislote. La secuencia de proteína para proIAPP humano es:
TPIESHQVEKRKCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGAILSSTNVGSNTYGKRNAVEV LKREPLNYLPL (SEQ ID NO: 3), la cual pasa por proteólisis y modificaciones post traducción adicionales para generar hIAPP.

Las secuencias de aminoácido de IAPP, proIAPP y preproIAPP "tipo silvestre" o humanas recombinantes están representadas por las secuencias antes mencionadas según las SEQ ID NOs: 1-3.

Los anticuerpos anti-IAPP y anti-proIAPP humanos aquí descritos se enlazan específicamente a IAPP y/o proIAPP y a los epítopos de los mismos y a varias conformaciones de IAPP y/o proIAPP y epítopos de los mismos. Por ejemplo, en la presente invención se describen anticuerpos que enlazan específicamente a las formas IAPP y/o proIAPP patológicamente agregadas, tal como oligómeros no fibrilares y/o oligómeros fibrilares/fibrillas y/o agregados que consisten en las formas mezcladas de los mismos. El término agregado (patológicamente)/agregados de IAPP y/o proIAPP se utiliza de manera intercambiable para referirse específicamente a las formas antes mencionadas. El término

“formas agregadas” (patológicas) o “agregados” tal como se utiliza en la presente invención, describe los productos de una acumulación o formación de grupos debido a una interacción errónea/patológica de IAPP y/o proIAPP entre si. Estos agregados, acumulaciones o formas de grupo pueden ser, consistir sustancialmente o consistir tanto de IAPP y/o proIAPP como de oligómeros no fibrilares y/o oligómeros fibrilares y fibrillas de los mismos. Tal como se utiliza en la presente invención, la referencia a un anticuerpo que “se enlaza específicamente”, “se enlaza selectivamente”, o “se enlaza preferentemente” a IAPP y/o proIAPP se refiere a un anticuerpo que no enlaza otras proteínas no relacionadas. En un ejemplo, el anticuerpo IAPP y/o proIAPP descrito en la presente invención puede enlazar IAPP y/o proIAPP o un epítipo de los mismos, y no muestra la unión anterior aproximadamente 2 veces antes para otras proteínas. Un anticuerpo que “se enlaza específicamente” o “se enlaza selectivamente” a un conformador IAPP y/o proIAPP se refiere a un anticuerpo que no enlaza a todas las conformaciones de IAPP y/o proIAPP, es decir, no enlaza al menos a otro conformador IAPP y/o proIAPP. Por ejemplo, en la presente invención se describen anticuerpos que enlazan preferentemente formas a agregadas de IAPP y/o proIAPP tanto *in vitro* como en tejidos obtenidos de pacientes con T2D evidente o con riesgo a desarrollar T2D. Ya que los anticuerpos IAPP y/o proIAPP humanos de la presente invención han sido aislados de un conjunto de sujetos humanos saludables o de un conjunto de pacientes obesos y otros grupos de pacientes con riesgo incrementado a desarrollar T2D, los cuales en el tiempo del aislamiento de anticuerpo no mostraron signos de T2D, exhibiendo una respuesta inmune específica de IAPP y/o proIAPP, los anticuerpos IAPP y/o proIAPP de la presente invención también pueden ser llamados “autoanticuerpos humanos” con el objeto de enfatizar que dichos anticuerpos de hecho fueron expresados por los sujetos y no han sido aislados de, por ejemplo, una inmunoglobulina humana que expresa biblioteca de fago, que hasta la fecha representó un método común para tratar de proporcionar anticuerpos tipo humano.

El término “péptido” se entiende que incluye los términos “polipéptido” y “proteína” (los cuales, en ocasiones, pueden ser utilizados intercambiabilmente en la presente invención) dentro de su significado. Similarmente, los fragmentos de proteínas y polipéptidos también están contemplados y pueden ser referidos en la presente invención como “péptidos”. Sin embargo, el término “péptido” indica preferentemente un polímero de aminoácido que incluye al menos 5 aminoácidos contiguos, preferentemente al menos 10 aminoácidos contiguos, más preferentemente al menos 15 aminoácidos contiguos, aún más preferentemente al menos 20 aminoácidos contiguos, y particularmente preferidos al menos 25 aminoácidos contiguos. Además, el péptido según la presente invención normalmente no tiene más de 100 aminoácidos contiguos, preferentemente menos de 80 aminoácidos contiguos y más preferentemente menos de 50 aminoácidos contiguos.

Polinucleótidos:

El término “polinucleótido” pretende comprender un ácido nucleico singular, así como ácidos nucleicos plurales, y se refiere a una molécula o construcción de ácido nucleico aislada, por ejemplo, ARN mensajero (mARN) o ADN de plásmido (pADN). Un polinucleótido puede comprender una unión de fosfodiéster convencional o una unión no convencional (por ejemplo, una unión de amida, tal como el que se encuentra en los ácidos nucleicos de péptido (PNA)). El término “ácido nucleico” se refiere a cualquiera de uno o más segmentos de ácido nucleico, es decir, fragmentos de ADN o ARN, presentes en el polinucleótido. Por el término ácido nucleico o polinucleótido “aislado” se entiende una molécula de ácido nucleico, ADN o ARN que ha sido eliminada de su ambiente nativo. Por ejemplo, un polinucleótido recombinante que codifica un anticuerpo contenido en un vector se considera aislado para los propósitos de la presente invención. Los ejemplos adicionales de un polinucleótido aislado incluyen polinucleótidos recombinantes mantenidos en células huésped heterólogas o polinucleótidos purificados (parcial o sustancialmente) en solución. Las moléculas de ARN aisladas incluyen transcripciones de ARN *in vivo* o *in vitro* de polinucleótidos de la presente invención. Los polinucleótidos o ácidos nucleicos aislados según la presente invención, incluyen además las moléculas producidas en forma sintética. Además, el polinucleótido o ácido nucleico puede ser o puede incluir un elemento regulador tal como un promotor, sitio de unión de ribosoma o un terminador de transcripción.

Tal como se utiliza en la presente invención, una “región de codificación” es una parte de un ácido nucleico que consiste en codones traducidos en aminoácidos. Aunque un “codón de detención” (TAG, TGA o TAA) no se traduce en un aminoácido, puede considerarse como parte de una región de codificación, aunque cualesquiera secuencias de flanqueo, por ejemplo, promotores, sitios de unión de ribosoma, terminadores de transcripción, intrones y similares no son parte de la región de codificación. Dos o más regiones de codificación de la presente invención pueden estar presentes en una sola construcción de polinucleótido, por ejemplo, o un solo vector, o en construcciones de polinucleótido separadas, por ejemplo, en vectores separados (diferentes). Además, cualquier vector puede contener una sola región de codificación, o puede comprender dos o más regiones de codificación, por ejemplo, un solo vector puede codificar por separado una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina y una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina. Además, un vector, polinucleótido, o un ácido nucleico de la presente invención puede codificar regiones de codificación heterólogas, ya sea fusionadas o no fusionadas a un ácido nucleico que codifica una

molécula de unión, un anticuerpo, un fragmento, variante o derivado del mismo. Las regiones de codificación heteróloga incluyen sin limitación elementos o motivos especializados, tal como un péptido de señal de secreción o un dominio funcional heterólogo.

5 En ciertas realizaciones, el polinucleótido o ácido nucleico es ADN. En el caso de ADN un polinucleótido que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido normalmente puede incluir un promotor y/o otros elementos de control de transcripción o traducción que pueden operar asociados con una o más regiones de codificación. Una asociación operable es cuando una región de codificación de un producto de gen, por ejemplo, un polipéptido, está asociada con una o más secuencias reguladoras en tal forma que se pone la expresión del producto de gen bajo la influencia o control de la secuencia(s) reguladora. Dos fragmentos de ADN (tal como una región de codificación de polipéptido y un promotor asociado con la misma) están "asociados en forma operable" o "enlazados en forma operable" si la inducción de la función del promotor da como resultado la transcripción del mRNA que codifica el producto de gen deseado y si la naturaleza de la ligadura entre los dos fragmentos de ADN no interfiere con la capacidad de las secuencias reguladoras de expresión de dirigir la expresión de un producto de gen o interferir con la capacidad que tiene la plantilla de ADN de ser transcrita. Por lo tanto, una región promotora puede asociarse en forma operable con un ácido nucleico que codifica un polipéptido, si el promotor tuvo la capacidad de efectuar la transcripción de dicho ácido nucleico. El promotor puede ser un promotor específico de célula que dirige la transcripción sustancial del ADN únicamente en células predeterminadas. Otros elementos de control de transcripción, además de un promotor, por ejemplo, aumentadores, operadores, represores y señales de terminación de transcripción, pueden ser operables en forma asociada con el polinucleótido para dirigir la transcripción específica de la célula. Los promotores adecuados y otras regiones de control de transcripción se describen en la presente invención.

Una "molécula de unión", tal como se utiliza dentro del contexto de la presente invención se refiere principalmente a anticuerpos, y fragmentos de los mismos.

Anticuerpos:

Los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina" se utilizan de manera intercambiable en la presente invención. Un anticuerpo o inmunoglobulina es una molécula de unión a IAPP y/o proIAPP que comprende al menos el dominio variable de la cadena pesada, y comprende normalmente al menos los dominios variables de una cadena pesada y una cadena ligera. Las estructuras de inmunoglobulina básicas en sistemas de vertebrado están relativamente bien entendidas; ver por ejemplo la Publicación de Harlow *et al.*, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2^o edición 1988).

35 Tal como se describe con mayor detalle más adelante, el término "inmunoglobulina" comprende varias y amplias clases de polipéptidos que pueden ser distinguidos en forma bioquímica. Los expertos en la técnica apreciarán que las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta, o épsilon, (γ , μ , α , δ , ϵ) con algunas subclases entre ellas (por ejemplo, $\gamma 1$ - $\gamma 4$). Es la naturaleza de esta cadena lo que determina la "clase" del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgG o IgE, respectivamente. Las subclases de inmunoglobulina (isotipos) por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, etc. están bien caracterizados y son bien conocidos por conferir especialización funcional. Las versiones modificadas de cada una de estas clases e isotipos son fácilmente discernibles por los expertos en la técnica en virtud de la presente descripción, y por consiguiente, están dentro del alcance de la misma. Todas las clases de inmunoglobulina están claramente dentro del alcance de la presente invención, por lo que la descripción que se encuentra más adelante estará dirigida de manera general a la clase IgG de las moléculas de inmunoglobulina. Con respecto a IgG, una molécula de inmunoglobulina estándar comprende dos polipéptidos de cadena ligera idénticos de un peso molecular de aproximadamente 23,000 Daltons, y dos polipéptidos de cadena pesada idénticos con un peso molecular de 53,000-70,000. Las cuatro cadenas normalmente se unen mediante uniones de disulfuro en una configuración "Y", en donde la cadena pesada soporta el inicio de la cadena ligera en la boca de "Y" y continúa a través de la región variable.

50 Las cadenas ligeras se clasifican ya sea, kappa o lambda (κ , λ). Cada clase de cadena pesada puede enlazarse ya sea con una cadena ligera kappa o lambda. En general, las cadenas ligeras y pesadas se unen covalentemente entre sí, y las partes de "cola" de las dos cadenas pesadas se enlazan entre sí mediante ligaduras de disulfuro covalentes o ligaduras no covalentes, cuando las inmunoglobulinas se generan ya sea mediante hibridomas, células B o células huésped genéticamente diseñadas. En la cadena pesada, las secuencias de aminoácido de un N-término en los extremos bifurcados de la configuración Y al C-término en la parte inferior de cada cadena.

Tanto las cadenas ligeras como pesadas se dividen en regiones de homología estructural y funcional. Los términos "constante" y "variable" se utilizan de manera funcional. En este respecto, se podrá apreciar que los dominios variables

de las partes de cadena tanto ligera (V_L) como pesada (V_H) determinan el reconocimiento y especificidad del antígeno. De manera inversa, los dominios constantes de la cadena ligera (CL) y la cadena pesada (CH1, CH2 o CH3) confieren propiedades biológicas importantes tal como secreción, movilidad transplacenta, unión de receptor Fc, unión de complemento y similares. Por convenio la numeración de los dominios de región constante incrementa conforme se vuelven más distantes del sitio de unión a antígeno o término amino del anticuerpo. La parte N-terminal es una región variable y la parte C-terminal es una región constante; los dominios CH3 y CL realmente comprenden el término carboxi de la cadena pesada y ligera, respectivamente.

Tal como se indicó anteriormente, la región variable permite que el anticuerpo reconozca en forma selectiva y unión en forma específica epítomos en antígenos. Esto es, el dominio V_L y dominio V_H , o subconjunto de las regiones de determinación de complementariedad (CDRs), de un anticuerpo se combinan para formar la región variable que define un sitio de unión a antígeno tridimensional. Esta estructura de anticuerpo cuaternaria forma el sitio de unión a antígeno presente al final de cada brazo de la Y. Más específicamente, el sitio de unión a antígeno se define a través de las tres CDRs en cada una de las cadenas V_H y V_L . Un anticuerpo o fragmento de inmunoglobulina que contiene suficiente estructura para enlazar específicamente a IAPP y/o proIAPP, se indica en la presente invención de manera intercambiable como un "fragmento de unión" o "un fragmento inmunoespecífico".

El anticuerpo de origen natural, un anticuerpo comprende seis regiones hipervariables, algunas veces llamadas "regiones de determinación de complementariedad" o "CDRs" presentes en cada dominio de unión a antígeno, las cuales son secuencias cortas, no contiguas de los aminoácidos que se colocan en forma específica para formar el dominio de unión a antígeno dominio de unión a antígeno, ya que el anticuerpo asume su configuración tridimensional en un ambiente acuoso. Las "CDRs" están flanqueadas por cuatro regiones de "estructura" relativamente conservadas o "FRs", que muestran menos variabilidad intermolecular. Las regiones de estructura adoptan en gran parte una conformación de hoja- β y las CDRs forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de la estructura de hoja- β . Por lo tanto, las regiones de estructura actúan para formar un andamio que proporciona la colocación de las CDRs en una orientación correcta mediante interacciones no covalentes, intercadena. El dominio de unión a antígeno formado por las CDRs colocadas define una superficie complementaria para el epítipo en el antígeno inmunorreactivo. Esta superficie de complementariedad promueve la unión no covalente del anticuerpo a su epítipo cognato. Los aminoácidos que comprenden las CDRs y las regiones de estructura, respectivamente, pueden ser identificadas fácilmente a través de cualquier región variable de cadena pesada o ligera por un experto en la técnica, ya que han sido definidas en forma precisa; ver las Publicaciones de "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (Secuencias de proteínas de Interés Inmunológico), Kabat, E., *et al.*, U.S. Department of Health and Human Services, (1983); y Chothia and Lesk, J. Mol. Biol, 196 (1987), 901-917.

En caso en donde existen dos o más definiciones de un término que se utiliza y/o acepta en la técnica, la definición del término tal como aquí se utiliza, está proyectada para incluir todos de dichos significados a menos que se manifieste explícitamente lo contrario. Un ejemplo específico es el uso del término "región determinante de complementariedad" ("CDRs") para describir el antígeno no contiguo que combina sitios encontrados dentro de la región variable en polipéptidos tanto de cadena pesada como ligera. Esta región particular ha sido descrita por Kabat *et al.*, U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (Secuencias de Proteínas de Interés Inmunológico) (1983) y por Chothia and Lesk, J. Mol. Biol, 196 (1987), 901-917, y las definiciones incluyen el traslape o subconjuntos de residuos de aminoácido cuando se comparan entre sí. Sin embargo, la aplicación de cualquier definición para referirse a una CDR de un anticuerpo o variante del mismo está proyectada para estar dentro del alcance del término, tal como se define y utiliza en la presente invención. Los residuos de aminoácido adecuados que comprenden las CDRs tal como se define a través de cada una de las referencias mencionadas anteriormente se establecen a continuación en la tabla I como una comparación. Los números de residuos exactos que comprenden una CDR particular variarán dependiendo de la secuencia y tamaño de la CDR. Los expertos en la técnica pueden determinar en forma rutinaria que residuos comprenden una región hipervariable particular o CDR del subtipo IgG humano del anticuerpo proporcionado a la secuencia de aminoácido de región variable del anticuerpo.

Tabla 1. Definiciones CDR¹

	Kabat	Chothia
VH CDR1	31-35	26-32
VHCDR2	50-65	52-58
VH CDR3	95-102	95-102
VL CDR1	24-34	26-32
VL CDR2	50-56	50-52
VL CDR3	89-97	91-96

La numeración de todas las definiciones CDR en la tabla I está según los convenios de numeración establecidos por Kabat *et al.* (ver más adelante).

Kabat *et al.* también definió un sistema de numeración para secuencias de dominio variable que puede aplicar a cualquier anticuerpo. Un experto en la técnica puede asignar sin ambigüedad este sistema de “numeración de Kabat” a cualquier secuencia de dominio variable, sin depender de cualquier dato experimental más allá de la propia secuencia. Tal como se utiliza en la presente invención, la “numeración de Kabat” se refiere al sistema de numeración establecido por Kabat *et al.*, U.S. Dept. of Health and Human Services, “Sequence of Proteins of Immunological Interest” (Secuencia de Proteínas de Interés Inmunológico) (1983). A menos que se especifique de otra manera, las referencias a la numeración de posiciones de residuo de aminoácido específicas en un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo de la presente invención son según el sistema de numeración de Kabat, lo cual sin embargo es teórico, y puede no aplicar de manera igual a cada anticuerpo de la presente invención. Por ejemplo, dependiendo de la posición de la primera CDR, las siguientes CDRs deben ser cambiadas en cualquier dirección.

Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno, fragmentos inmuno-específicos, variantes o derivados de los mismos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a anticuerpos policlonales, monoclonales, multiespecíficos, humanos, humanizados, primatizados, murinizados o quiméricos, anticuerpos de cadena simple, fragmentos de unión de epítipo, por ejemplo, Fab, Fab' y F(ab')₂, Fd, Fvs, Fvs de cadena simple (scFv), anticuerpos de cadena simple, Fvs enlazados por disulfuro (sdFv), fragmentos que comprenden cualquiera de un dominio VL o VH, fragmentos producidos por una biblioteca de expresión Fab, y anticuerpos anti-idiotipo (anti-Id) (incluyendo por ejemplo, anticuerpos anti-Id para anticuerpos aquí descritos). Las moléculas ScFv son conocidas en la técnica y se describen por ejemplo en la Patente de Estados Unidos No. 5,892,019. Las moléculas de inmunoglobulina o de anticuerpo de la presente invención pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA y IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 y IgA2) o subclase de una molécula de inmunoglobulina.

En una realización, el anticuerpo de la presente invención no es IgM o un derivado del mismo con una estructura pentavalente. Los IgMs particulares, en aplicaciones específicas de la presente invención, especialmente uso terapéutico, son menos útiles que IgG y otros anticuerpos bivalentes o moléculas de unión correspondientes, ya que IgMs debido a su estructura pentavalente y carencia de maduración de afinidad, con frecuencia muestran reactividades cruzadas no específicas y afinidad muy baja.

El anticuerpo de la presente invención no es un anticuerpo policlonal, es decir, consiste sustancialmente de una especie de anticuerpo particular en lugar de ser una mezcla obtenida de una muestra de inmunoglobulina en plasma.

Los fragmentos de anticuerpo, incluyendo anticuerpos de cadena simple, pueden comprender la región(s) variable sola o en combinación con la totalidad o una parte de lo siguiente: región de articulación, dominios CH1, CH2 y CH3. También se incluyen en la presente invención fragmentos de unión a IAPP y/o proIAPP que comprenden cualquier combinación de la región(s) variable con la región de articulación, dominios CH1, CH2 y CH3.

- En un aspecto, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo monoclonal humano aislado de un humano. Opcionalmente, la región de estructura del anticuerpo humano se alinea y adopta según las secuencias de región variables de línea germinal humana pertinentes en la base de datos; ver por ejemplo la Vbase (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) alojada por el MRC Centre for Protein Engineering (Centro para Ingeniería de Proteína MRC) (Cambridge, UK). Por ejemplo, los aminoácidos considerados para desviarse potencialmente de la secuencia de línea germinal real pueden deberse a las secuencias cebadoras PCR incorporadas durante el proceso de clonación. En comparación con anticuerpos tipo humano generados en forma artificial, tal como fragmentos de anticuerpo de cadena simple (scFvs) de una biblioteca de anticuerpo de despliegue de fago o ratón xenogéneo, el anticuerpo monoclonal humano de la presente invención está caracterizado por (i) obtenerse utilizando la respuesta inmune humana en lugar de los sustitutos animales, es decir, el anticuerpo ha sido generado en respuesta a IAPP o proIAPP natural en su conformación relevante en el cuerpo humano, (ii) teniendo protegido al individuo o es al menos significativo para la presencia de IAPP y/o proIAPP, y (iii) ya que el anticuerpo es de origen humano, se minimizan los riesgos de reactividad cruzada contra autoantígenos. Por lo tanto, según la presente invención, los términos “anticuerpo monoclonal humano”, “autoanticuerpo monoclonal humano”, “anticuerpo humano” y similares se utilizan para indicar una molécula de unión a IAPP y/o proIAPP que es de origen humano, es decir, que ha sido aislada de una célula humana tal como una célula B o hibridoma del mismo o el cADN del cual ha sido clonado directamente a partir de mRNA de una célula humana, por ejemplo, una célula B de memoria humana. Un anticuerpo humano es aún “humano”, incluso si las sustituciones de aminoácido se elaboran en un anticuerpo (por ejemplo, para mejorar las características de unión).
- Los anticuerpos derivados de bibliotecas de inmunoglobulina humana o de animales transgénicos para una o más inmunoglobulinas humanas, y que no expresan inmunoglobulinas endógenas, tal como se describe *infra*, y por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos No. 5,939,598 de Kucherlapati *et al.*, están indicadas como anticuerpos tipo humano con el objeto de distinguirlos de los anticuerpos realmente humanos de la presente invención.
- Por ejemplo, el emparejamiento de cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos tipo humano, tal como anticuerpos sintéticos y semisintéticos normalmente aislados de un despliegue de fago, no reflejan necesariamente el emparejamiento original tal como ocurre en la célula B humana original. Por consiguiente, los fragmentos Fab y scFV obtenidos de bibliotecas de expresión recombinante como comúnmente utilizadas en la técnica anterior, pueden considerarse como siendo artificiales con todos los posibles efectos asociados en la inmunogenicidad y estabilidad.
- En cambio, la presente invención proporciona anticuerpos madurados por afinidad aislados de sujetos humanos seleccionados, que están caracterizados por su utilidad terapéutica y su tolerancia en hombres.
- Tal como se utiliza en la presente invención, el término “anticuerpo roedorizado” o “inmunoglobulina roedorizada” se refieren a un anticuerpo que comprende una o más CDRs de un anticuerpo humano de la presente invención; y una región de estructura humana que contiene sustituciones y/o eliminaciones y/o inserciones de aminoácido que están basadas en una secuencia de anticuerpo de roedor. Cuando se refiere a roedores, preferentemente las secuencias que se originan en ratones y ratas son las utilizadas, en donde los anticuerpos que comprenden dicha secuencias son referidos como “murinizados” o “ratinizados”, respectivamente. La inmunoglobulina humana que proporciona las CDRs se llama “de origen” o “aceptadora”, y el anticuerpo de roedor que proporciona los cambios de estructura se llama “el donador”. Las regiones constantes no necesitan estar presentes, pero si lo están, normalmente son sustancialmente idénticas a las regiones constantes de anticuerpo de roedor, es decir, al menos aproximadamente del 85 al 90%, preferentemente aproximadamente 95% o más idénticas. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la inmunoglobulina de cadena pesada o ligera murinizada de longitud total contiene una región constante de ratón, las CDRs humanas y una estructura sustancialmente humana que tiene un número de sustituciones de aminoácido de “murinización”. Normalmente, un “anticuerpo murinizado” es un anticuerpo que comprende una cadena ligera variable murinizada y/o cadena pesada variable murinizada. Por ejemplo, un anticuerpo murinizado puede no comprender un anticuerpo quimérico típico, por ejemplo, debido a que toda la región variable de un anticuerpo quimérico no es de ratón. Un anticuerpo modificado que ha sido “murinizado” a través del proceso de “murinización” enlaza al mismo antígeno que el anticuerpo de origen que proporciona las CDRs, y normalmente es menos inmunogénico en ratones, tal como se compara con el anticuerpo de origen. Las explicaciones anteriores con respecto a los anticuerpos “murinizados” se aplican en forma análoga para ordenar anticuerpos “roedorizados”, tal como “anticuerpos ratinizados”, en donde se utilizan secuencias de rata en lugar de murido.
- Tal como se utiliza en la presente invención, el término “parte de cadena pesada” incluye secuencias de aminoácido derivadas de cadena pesada de inmunoglobulina. Un polipéptido que comprende una parte de cadena pesada comprende al menos una de: un dominio CH1, un dominio de articulación (por ejemplo, región de articulación superior, medio y/o inferior), un dominio CH2, un dominio CH3, o una variante o fragmento del mismo. Por ejemplo, un polipéptido de unión para utilizarse en la presente invención puede comprender una cadena de polipéptido que comprende un

dominio CH1; una cadena de polipéptido que comprende un dominio CH1, al menos una parte de un dominio de articulación, y un dominio CH2; una cadena de polipéptido que comprende un dominio CH1 y un dominio CH3; una cadena de polipéptido que comprende un dominio CH1, al menos una parte de un dominio de articulación, y un dominio CH3, o una cadena de polipéptido que comprende un dominio CH1, al menos una parte de un dominio de articulación, un dominio CH2 y un dominio CH3. En otra realización, un polipéptido de la presente invención comprende una cadena de polipéptido que comprende un dominio CH3. Además, un polipéptido de unión para utilizarse en la presente invención puede carecer de al menos una parte de un dominio CH2 (por ejemplo, toda o parte de un dominio CH2). Tal como se estableció anteriormente, quedará entendido por un experto en la técnica que estos dominios (por ejemplo, las partes de cadena pesada) pueden modificarse de modo que varíen en la secuencia de aminoácido de la molécula de inmunoglobulina de origen natural.

En ciertos anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos aquí descritos, las partes de cadena pesada de una cadena de polipéptido de un multímero, son idénticas a una segunda cadena de polipéptido del multímero. Alternativamente, los monómeros que contienen una parte de cadena pesada de la presente invención no son idénticos. Por ejemplo, cada monómero puede comprender un diferente sitio de unión objetivo, formando, por ejemplo, un anticuerpo o diacuerpo biespecífico.

En otra realización, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos aquí descritos están compuestos de una cadena de polipéptido simple, tal como scFvs y serán expresados en forma intracelular (intracuerpos) para aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico potenciales *in vivo*.

Las partes de cadena pesada del polipéptido de unión para utilizarse en los métodos de diagnóstico y tratamiento aquí descritos, pueden derivarse de moléculas de inmunoglobulina diferentes. Por ejemplo, la parte de cadena pesada de un polipéptido puede comprender un dominio CH1 derivado de una molécula IgG1, y una región de articulación derivada de una molécula IgG3. En otro ejemplo, una parte de cadena pesada puede comprender una región de articulación derivada, en parte, de una molécula IgG1, y en parte, de una molécula IgG3. En otro ejemplo, la parte de cadena pesada puede comprender una articulación quimérica derivada, en parte, de una molécula IgG1, y en parte de una molécula IgG4.

Tal como se utiliza en la presente invención, el término "parte de cadena ligera" incluye secuencias de aminoácido derivadas de una cadena ligera de inmunoglobulina. Preferentemente, la parte de cadena ligera comprende al menos uno de un dominio VL o CL.

El tamaño mínimo de un epítipo de péptido o polipéptido para un anticuerpo se considera como de aproximadamente cuatro a cinco aminoácidos. Los epítopos de péptido y polipéptido contienen preferentemente al menos siete, más preferentemente al menos nueve y lo más preferentemente entre al menos aproximadamente 15 hasta aproximadamente 30 aminoácidos. Ya que una CDR puede reconocer un péptido o polipéptido antigénico en su forma terciaria, los aminoácidos que comprenden un epítipo no necesitan ser contiguos, y en algunos casos, incluso pueden no estar en la misma cadena de péptido. En la presente invención, un epítipo de péptido o polipéptido reconocido por anticuerpos de la presente invención contiene una secuencia de al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, más preferentemente al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, o entre aproximadamente 15 hasta aproximadamente 30 aminoácidos contiguos o no contiguos de IAPP o proIAPP.

Por el término "unión en forma específica" o "reconocimiento específico" utilizado de manera intercambiable en la presente invención, generalmente se entiende que una molécula de unión, por ejemplo, un anticuerpo que enlaza a un epítipo a través de su dominio de unión a antígeno, y que la unión comprende cierta complementariedad entre el dominio de unión a antígeno y el epítipo. Según esta definición, se dice que un anticuerpo "enlaza específicamente" a un epítipo cuando enlaza a dicho epítipo a través de su dominio de unión a antígeno más fácilmente que lo que podría enlazar a un epítipo no relacionado, aleatorio. El término "especificidad" se utiliza en la presente invención para calificar la afinidad relativa a través de la cual un cierto anticuerpo enlaza a un cierto epítipo. Por ejemplo, el anticuerpo "A" puede considerarse que tiene una mayor especificidad para un epítipo determinado que el anticuerpo "B", o el anticuerpo "A" se puede decir que enlaza al epítipo "C" con una mayor especificidad que para el epítipo relacionado "D".

En donde está presente, el término "características de unión de inmunoglobulina" u otras características de unión de un anticuerpo con un antígeno, y en todas sus formas gramáticas, se refiere a la especificidad, afinidad, reactividad cruzada y otras características de unión de un anticuerpo.

Por el término "enlaza preferentemente" se entiende que la molécula de unión, por ejemplo, anticuerpo que enlaza

específicamente a un epítipo más fácilmente que lo que podría enlazar a un epítipo relacionado similar homólogo o análogo. Por lo tanto, un anticuerpo que “enlaza preferentemente” a un epítipo determinado puede ser más probable que unión a dicho epítipo que el epítipo relacionado, incluso aunque dicho anticuerpo pueda reaccionar en forma cruzada con el epítipo relacionado.

A manera de ejemplo no limitante, la molécula de unión, por ejemplo, un anticuerpo puede considerarse que enlaza a un primer epítipo preferentemente si enlaza al primer epítipo con una constante de disociación (K_D) que es menor a la K_D del anticuerpo para el segundo epítipo. En otro ejemplo no limitante, un anticuerpo puede ser considerado que enlaza a un primer antígeno preferentemente si enlaza al primer epítipo con una afinidad que es al menos de un orden de magnitud menor a la K_D del anticuerpo para el segundo epítipo. En otro ejemplo no limitante, se considera que un anticuerpo puede enlazar a un primer epítipo preferentemente si enlaza al primer epítipo con una afinidad que es al menos de dos órdenes de magnitud menor que la K_D del anticuerpo para el segundo epítipo.

En otro ejemplo no limitante, una molécula de unión, por ejemplo, un anticuerpo puede considerarse que enlaza a un primer epítipo preferentemente si enlaza al primer epítipo con un fuera de rango ($k(\text{fuera})$) que es menor que la $k(\text{fuera})$ del anticuerpo para el segundo epítipo. En otro ejemplo no limitante, un anticuerpo puede considerarse que enlaza a un primer epítipo preferentemente si enlaza al primer epítipo con una afinidad que es al menos de un orden de magnitud menor que la $k(\text{fuera})$ del anticuerpo para el segundo epítipo. En otro ejemplo no limitante, un anticuerpo puede considerarse que enlaza a un primer epítipo preferentemente si enlaza al primer epítipo con una afinidad que es al menos de dos órdenes de magnitud menor a la $k(\text{fuera})$ del anticuerpo para el segundo epítipo.

Una molécula de unión, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado aquí descrito puede decirse que enlaza a IAPP y/o prolAPP o un fragmento, variante o conformación específica del mismo con un fuera de rango ($k(\text{fuera})$) menor o igual a $5 \times 10^{-2} \text{ seg}^{-1}$, 10^{-2} seg^{-1} , $5 \times 10^{-3} \text{ seg}^{-1}$ o 10^{-3} seg^{-1} . Más preferentemente, un anticuerpo de la presente invención se puede decir que enlaza a IAPP y/o prolAPP o un fragmento, variante o conformación específica del mismo con un fuera de rango ($k(\text{fuera})$) menor o igual a $5 \times 10^{-4} \text{ seg}^{-1}$, 10^{-4} seg^{-1} , $5 \times 10^{-5} \text{ seg}^{-1}$ o 10^{-5} seg^{-1} , $5 \times 10^{-6} \text{ seg}^{-1}$, 10^{-6} seg^{-1} , $5 \times 10^{-7} \text{ seg}^{-1}$ o 10^{-7} seg^{-1} .

Una molécula de unión, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, variante, o derivado aquí descrito puede decirse que enlaza a IAPP y/o prolAPP o un fragmento, variante o conformación específica del mismo con un en rango ($k(\text{en})$) mayor o igual a $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$, $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$, $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$ o $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$. Más específicamente, un anticuerpo de la presente invención se puede decir que enlaza a IAPP y/o prolAPP o un fragmento, variante o conformación específica del mismo con un en rango ($k(\text{en})$) mayor o igual a $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$, $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$, $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$, o $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$ o $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$.

Una molécula de unión, por ejemplo, un anticuerpo se dice que inhibe en forma competitiva la unión de un anticuerpo de referencia a un epítipo determinado, si enlaza preferentemente a dicho epítipo hasta un grado en que bloquee, hasta cierto grado, la unión del anticuerpo de referencia al epítipo. La inhibición competitiva puede ser determinada a través de cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, ensayos ELISA de competición. Un anticuerpo se puede decir que inhibe competitivamente la unión del anticuerpo de referencia a un epítipo determinado en al menos 90%, al menos 80%, al menos 70%, al menos 60%, o al menos 50%.

Tal como se utiliza en la presente invención, el término “afinidad” se refiere a una medida de la resistencia dla unión de un epítipo individual con la CDR de una molécula de unión, por ejemplo, una molécula de inmunoglobulina; ver por ejemplo la Publicación de Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual* (Anticuerpos: Manual de Laboratorio), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2° edición (1988) en las páginas 27-28. Tal como se utiliza en la presente invención, el término “avidez” se refiere a la estabilidad general del complejo entre una población de inmunoglobulinas y un antígeno, esto es, la fuerza de combinación funcional de una mezcla de inmunoglobulina con el antígeno; ver por ejemplo la Publicación de Harlow en las páginas 29 a 34. La avidez se relaciona tanto con la afinidad de las moléculas de inmunoglobulina individuales en la población con los epítipos específicos, como también con las valencias de las inmunoglobulinas y el antígeno. Por ejemplo, la interacción entre el anticuerpo monoclonal bivalente y un antígeno con una estructura de epítipo de alta repetición, tal como un polímero, puede ser uno de alta avidez. La afinidad o avidez de un anticuerpo para un antígeno puede determinarse en forma experimental utilizando cualquier método de acuerdo; ver por ejemplo la Publicación de Berzofsky *et al.*, “Interacciones de Anticuerp-Antígeno” En *Fundamental Immunology*, Paul, W. E., Ed., Raven Press Nueva York, N Y (1984), Kubly, Janis Immunology, W. H. Freeman y Company New York, N Y (1992), y los métodos ahí descritos. Las técnicas generales para medir la afinidad de un anticuerpo a un antígeno incluyen ELISA, RIA, y resonancia de plasmón de superficie. La afinidad medida de una interacción de anticuerpo-antígeno particular puede variar si se mide bajo diferentes condiciones, es decir, concentración de sal, pH. Por lo tanto, las medidas de afinidad y otros parámetros de unión a antígeno, por ejemplo, K_D , IC_{50} , se elaboran preferentemente con

soluciones estandarizadas de anticuerpo y antígeno, y un amortiguador estandarizado.

Las moléculas de unión, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la presente invención, también se describen o especifican en términos de su reactividad cruzada.

Tal como se utiliza en la presente invención, el término “reactividad cruzada” se refiere a la capacidad de un anticuerpo, específico para un antígeno, para reaccionar con un segundo antígeno; una medida de la relación entre dos diferentes sustancias antigénicas. Por lo tanto, un anticuerpo es reactivo en forma cruzada si enlaza a un epítipo además de uno que indujo su formación. El epítipo de reactivo cruzado generalmente contiene muchas de las mismas características estructurales complementarias, tal como epítipo de inducción, y en algunos casos, puede realmente ajustar mejor que el original.

Por ejemplo, ciertos anticuerpos tienen cierto grado de reactividad cruzada, ya que enlazan epítopos relacionados pero no idénticos, por ejemplo epítopos con al menos 95%, al menos 90%, al menos 85%, al menos 80%, al menos 75%, al menos 70%, al menos 65%, al menos 60%, al menos 55%, y al menos 50% de identidad (tal como se calcula utilizando métodos conocidos en la técnica y aquí descritos) con un epítipo de referencia. Un anticuerpo se puede decir que tiene poca o ninguna reactividad cruzada si no enlaza epítopos con menos del 95%, menos del 90%, menos del 85%, menos del 80%, menos del 75%, menos del 70%), menos del 65%, menos del 60%, menos del 55% y menos del 50% de identidad (tal como se calcula utilizando métodos conocidos en la técnica y aquí descritos) con un epítipo de referencia. Un anticuerpo puede considerarse “altamente específico” para un cierto epítipo, si no enlaza cualquier otro análogo, ortólogo u homólogo de dicho epítipo.

Las moléculas de unión, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la presente invención también pueden describirse o especificarse en términos de su afinidad de unión para IAPP y/o proIAPP. Las afinidad de unión preferidas incluyen las que tienen una constante de disociación o K_d menor a 5×10^{-2} M, 10^{-2} M, 5×10^{-3} M, 10^{-3} M, 5×10^{-4} M, 10^{-4} M, 5×10^{-5} M, 10^{-5} M, 5×10^{-6} M, 10^{-6} M, 5×10^{-7} M, 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 10^{-12} M, 5×10^{-13} M, 10^{-13} M, 5×10^{-14} M, 10^{-14} M, 5×10^{-15} M o 10^{-15} M.

Tal como se indicó anteriormente, las estructuras de subunidad y la configuración tridimensional de las regiones constantes de las diversas clases de inmunoglobulina son bien conocidas. Tal como se utiliza en la presente invención, el término “dominio V_H ” incluye el dominio variable terminal amino de una cadena pesada de inmunoglobulina, y el término “dominio CH1” incluye el primer dominio de región constante (en su mayoría terminal amino) de una cadena pesada de inmunoglobulina. El dominio CH1 está adyacente al dominio V_H y es terminal amino para la región de articulación de una molécula de cadena pesada de inmunoglobulina.

Tal como se utiliza en la presente invención el término “dominio CH2” incluye una parte de la molécula de cadena pesada que se extiende, por ejemplo, desde aproximadamente el residuo 244 al residuo 360 de un anticuerpo que utiliza esquemas de numeración convencional (residuos 244 a 360, sistema de numeración de Kabat; y residuos 231-340, sistema de numeración EU; ver la Publicación de Kabat EA *et al. op. cit.*). El dominio CH2 es único ya que no se empareja cercanamente con otro dominio. Más bien, dos cadenas de carbohidrato de ramificación enlazadas-N están interpuestas entre los dos dominios CH2 de una molécula IgG nativa intacta. También está bien documentado que el dominio CH3 se extiende en el dominio CH2 hasta el C-terminal de la molécula IgG y comprende aproximadamente 108 residuos.

Tal como se utiliza en la presente invención, el término “región de articulación” incluye la parte de una molécula de cadena pesada que une el dominio CH1 al dominio CH2. Esta región de articulación comprende aproximadamente 25 residuos y es flexible, permitiendo de esta forma que las regiones de unión a antígeno N-terminal se muevan en forma independiente. Las regiones de articulación pueden ser subdivididas en tres dominios distintos: dominios de articulación superior, media e inferior; ver la Publicación de Roux *et al.*, J. Immunol. 161 (1998), 4083-4090.

Tal como se utiliza en la presente invención, el término “unión de disulfuro” incluye la unión covalente formada entre dos átomos de azufre. La cisteína de aminoácido comprende un grupo tiol que puede formar una unión de disulfuro o puente con un segundo grupo tiol. En la mayoría de las moléculas IgG de origen natural, las regiones CH1 y CL están enlazadas por una unión de disulfuro, y las dos cadenas pesadas están enlazadas por dos uniones de disulfuro en las posiciones que corresponden a 239 y 242 utilizando el sistema de numeración de Kabat (posición 226 o 229, sistema de numeración USA).

Tal como se utiliza en la presente invención, los términos “enlazado”, “fusionado” o “fusión” se utilizan en forma

intercambiable. Los términos se refieren a la unión de dos o más elementos o componentes, mediante lo cual se entiende que incluyen medios de conjugación química o recombinantes. Una “fusión intraestructura” se refiere a la unión de dos o más cuadros de lectura abierta de polinucleótidos (ORFs) para formar un ORF más largo continuo, en una forma que mantiene el marco de lectura de traducción correcta de los ORFs originales. Por lo tanto, una proteína de fusión recombinante es una proteína simple que contiene dos o más segmentos que corresponden a polipéptidos codificados por los ORFs originales (cuyos segmentos normalmente no se unen naturalmente). Aunque el marco de lectura se hace de esta forma continuo a lo largo de los segmentos fusionados, los segmentos pueden ser separados física o espacialmente, por ejemplo, mediante la secuencia enlazadora en estructura. Por ejemplo, los polinucleótidos que codifican las CDRs de una región variable de inmunoglobulina pueden ser fusionados, en-estructura, aunque separados por un polinucleótido que codifica al menos una región de estructura de inmunoglobulina o regiones CDR adicionales, siempre que las CDRs “fusionadas” se traduzcan juntas como una parte de un polipéptido continuo.

Tal como se utiliza en la presente invención, el término “muestra” se refiere a cualquier material biológico obtenido de un sujeto o paciente. En un aspecto, una muestra puede comprender sangre, fluido peritoneal, CSF, saliva u orina. En otros aspectos, una muestra puede comprender sangre completa, plasma en sangre, suero en sangre, células B enriquecidas de muestras en sangre y células cultivadas (por ejemplo, las células B de un sujeto). Una muestra puede incluir también una biopsia o muestra de tejido que incluye tejido neural. Aún en otros aspectos, una muestra puede comprender células completas y/o un lisado de células. Las muestras de sangre pueden recolectarse a través de métodos conocidos en la técnica. En un aspecto, el pelet puede ser resuspendido vortizando a una temperatura de 4°C en 200 µl de amortiguador (20 mM Tris, pH. 7.5, 0.5% Nonidet, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 0.1M NaCl, inhibidor de proteasa 1X e inhibidores de fosfatasa Sigma 1X 1 y 2). La suspensión puede mantenerse en hielo durante 20 minutos con vortizado intermitente. Después de girar en 15,000 x g durante 5 minutos a una temperatura de aproximadamente 4°C, las alícuotas del sobrenadante se pueden almacenar en aproximadamente -70°C.

Enfermedades:

A menos que se manifieste lo contrario, los términos “trastorno” y “enfermedad” se utilizan de manera intercambiable en la presente invención y comprenden cualquier cambio fisiológico indeseado en un sujeto, un animal, un órgano, tejido o célula/cultivo celular aislado.

En determinantes genéticas T2D y factores ambientales conducen al desarrollo de resistencia a insulina seguido de un incremento compensador en la masa de célula beta y secreción de insulina y amilina (IAPP) para mantener niveles de glucosa en sangre normales. Las altas concentraciones resultantes de amilina favorecen la formación de oligómeros hIAPP tóxicos y la deposición de fibrillas hIAPP que se encuentran en más del 90% e pacientes T2D. La deposición de hIAPP se correlaciona con la reducción en las células beta que producen insulina y también se ha propuesto que desempeña un papel importante para la pérdida de células-β en islotes pancreáticos transplantados en individuos con T1D. La presente solicitud proporciona varios anticuerpos derivados de humano de conjuntos de donadores saludables o donadores obesos con alto riesgo de T2D pero en ausencia de la enfermedad, los cuales fueron clonados y producidos en forma recombinante tal como se describe en la presente invención más adelante con mayor detalle.

Sin embargo, en una realización de la presente invención, los anticuerpos de la presente invención, los polinucleótidos, los vectores o las células de la presente invención se utilizan para la preparación de una composición farmacéutica o de diagnóstico para el tratamiento profiláctico y terapéutico, control del progreso o una respuesta al tratamiento y/o diagnóstico de enfermedades del grupo de enfermedades *Diabetes mellitus*, que comprende diabetes tipo 1 (T1D), diabetes gestacional, pre-diabetes, diabetes autoinmune latente de adultos (LADA; diabetes tipo 1,5) y/o diabetes tipo 2 (T2D).

En una realización preferida los anticuerpos de la presente invención, los polinucleótidos, los vectores o las células de la presente invención se utilizan para la preparación de una composición farmacéutica o de diagnóstico para el tratamiento profiláctico y terapéutico, control del progreso o una respuesta al tratamiento y/o diagnóstico de un grupo de trastornos generalmente caracterizados por síntomas tal como cambios metabólicos que anteceden, originan y/o están conectados/asociados o enlazados a T2D, comprende enfermedades que originan daño al páncreas y por consiguiente pueden conducir a diabetes, que comprende pancreatitis crónica, fibrosis quística, cáncer pancreático, en enfermedades que incrementan el riesgo de T2D que comprende enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington; y/o en enfermedades cardiovasculares enlazadas o no con obesidad y T2D. En una realización preferida, los síntomas que generalmente caracterizan las enfermedades antes mencionadas, comprenden sensibilidad a insulina perturbada y secreción incrementada de insulina y/o hIAPP en un sujeto.

En una realización, el grupo de trastornos asociados con síntomas específicos antes mencionados asociados

comprenden diabetes gestacional, prediabetes (cuando la glicemia de alto nivel en la sangre no alcanza el valor de umbral de T2D o resistencia a insulina); síndrome metabólico en general como un factor de riesgo para desarrollar diabetes o como una condición que puede existir antes de la diabetes; amiloidosis de Islole en general como un factor de riesgo para desarrollar diabetes o como una condición que puede existir antes de la diabetes; obesidad en general como un factor de riesgo para desarrollar diabetes o como una condición que puede existir antes de la diabetes y/o deficiencia de célula beta después de trasplante clínico de islote pancreático.

Además, los anticuerpos de la presente invención, los polinucleótidos, los vectores o células de la presente invención, se utilizan para la preparación de una composición para la detección de una secreción de amilina cambiada, es decir incrementada o disminuida, en comparación con una secreción de amilina en un sujeto saludable en un diagnóstico diferencial de diabetes tipo 1, diabetes autoinmune latente de adultos (LAD A, diabetes Tipo 1,5) en comparación con formas T2D o en trastornos que anteceden una T2D evidente, tal como diabetes gestacional o prediabetes; en enfermedades que originan daños al páncreas y por consiguiente pueden conducir a diabetes tal como pancreatitis crónica, fibrosis quística, cáncer pancreático; en enfermedades que incrementan el riesgo de T2D tal como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington; y/o en enfermedades cardiovasculares enlazadas o no con obesidad y T2D.

Los trastornos tales como obesidad y resistencia a insulina/hiperinsulinemia se observan con frecuencia como una predisposición y/o como un síntoma de T2D que puede conducir a niveles elevados en la circulación del polipéptido amiloide de islote (IAPP) ya como una forma evidente de T2D. Se ha descubierto que los oligómeros, fibrillas y placas de amilina (hIAPP) se acumulan no únicamente dentro del páncreas y riñones, sino también dentro del corazón en pacientes con obesidad y resistencia a insulina. Esta acumulación ha sido observada en relación con una homeostasis Ca^{2+} celular alterada que a su vez, puede contribuir a disfunción cardíaca en dichos pacientes.

Por consiguiente, en una realización, los anticuerpos de la presente invención, los polinucleótidos, los vectores o las células de la presente invención se utilizan para la preparación de una composición farmacéutica o de diagnóstico para el tratamiento profiláctico y terapéutico, disminución, control del progreso o una respuesta al tratamiento y/o para el diagnóstico de un grupo de trastornos que siguen a T2D, o que resultan de cambios metabólicos que preceden y/o originan T2D, es decir, cambios metabólicos que ocurren en un estado prediabético, en donde el grupo de trastornos comprende enfermedad cardíaca, ataques, retinopatía diabética, deficiencia de riñón, deficiencia renal, cetoacidosis y, hiperosmolar no cetótico.

Más de 20 trastornos neurodegenerativos (ver tabla 1 en la página 511 en la Publicación de M. Ristow, J. Mol. Med 82 (2004), 510-529) son conocidos por estar asociados con diabetes mellitus, resistencia a insulina y obesidad incrementada, sensibilidad de insulina perturbada y secreción de insulina excesiva o dañada. Por consiguiente, en una realización de la presente invención, los anticuerpos de la presente invención, los polinucleótidos, los vectores o las células de la presente invención se utilizan para la preparación de una composición farmacéutica o de diagnóstico para tratamiento profiláctico y terapéutico, control del progreso o una respuesta al tratamiento y/o diagnóstico de trastornos neurodegenerativos que comprenden enfermedad de Alzheimer (AD), ataxia-telangiectasia (AT), síndrome de Bardet-Biedl (BBS), ataxia de Friedreich (FRDA), enfermedad de Huntington, distrofia miotónica, narcolepsia, enfermedad de Parkinson, síndrome de Prader-Willi y síndrome de Werner.

La tolerancia a la glucosa dañada induce pocas complicaciones que son características de diabetes mellitus, pero tiene un mayor riesgo de la generación de diabetes mellitus que el tipo normal, lo cual puede ser una causa de enfermedades macrovasculares. La "resistencia a insulina" significa condiciones de sensibilidad reducida a insulina. La insulina ha sido conocida por exhibir un mayor rango de efectos tal como, además de un efecto en el metabolismo de glucosa, un efecto en el metabolismo de lípidos o efectos en los vasos sanguíneos y riñón. Una vez que se reduce la sensibilidad a insulina, no únicamente se puede inducir anormalidad metabólica de glucosa, sino también la anormalidad metabólica de lípidos, tal como hipertriglicemia, nivel de HDL en plasma disminuido o hipertensión como una anormalidad de efectos de insulina en el vaso sanguíneo o el riñón.

Tal como se utiliza en la presente invención, el término "diabético" en un humano significa de manera general y actual una concentración de glucosa en plasma o sangre aleatoria de ≥ 200 mg/dL (≥ 11.1 mmol/L) o glucosa en plasma en ayuno de ≥ 126 mg/dL (≥ 7.0 mmol/L) o glucosa postcarga de 2 horas ≥ 200 mg/dL (≥ 11.1 mmol/L) durante una prueba de tolerancia de glucosa oral. Además o en forma alternativa, el término "diabético" se utiliza para sujetos que muestran uno o más de los síntomas clínicos de diabetes que incluyen sed incrementada (polidipsia), orina frecuente (poliuria), hambre extrema, pérdida de peso no explicada, fatiga y visión borrosa, vulnerabilidad a llagas de curación lenta e infección frecuente, incluyendo la de la vejiga, vagina y gomas y/o áreas de piel oscurecida (acanthosis nigricans).

Tal como se utiliza en la presente invención, el término "no diabético" en un humano significa de manera general y actual

un nivel de glucosa en plasma en ayuno de <100 mg/dL (5.6 mmol/dL) o un nivel de glucosa postcarga de 2 horas <140 mg/dL (<7.8 mmol/dL) durante una prueba de tolerancia de glucosa oral.

Tal como se utiliza en la presente invención, el término "prediabético" en humano significa de manera general y actual un nivel de glucosa en plasma en ayuno de 100 a 125 mg/dL (5.6 a 6.9 mmol/L) o un nivel de glucosa postcarga de 2 horas de 140 a 199 mg/L (7.8 a 11.1 mmol/L) durante una prueba de tolerancia a glucosa oral. A menos que se manifieste lo contrario, los términos "prediabético", "prodrómico" y "presintomático" se utilizan de manera intercambiable en la presente invención y describen la fase preclínica de T2D.

Además o en forma alternativa, los niveles de hemoglobina glicosilada (HbA1c) pueden utilizarse en el diagnóstico de diabetes en un sujeto. En niveles de HbA1c elevados en o más allá del valor de umbral de 6.5%, se realiza un diagnóstico de diabetes, es decir, el término "diabético" se utiliza de manera general y actual en un humano, aunque los niveles de 5.7% a 6.4% señalan un alto riesgo de desarrollo tanto de diabetes como de enfermedad cardiovascular, y son un marcador de "prediabetes," o un estado "prediabético/presintomático" en un humano. El término "no diabético" en un humano significa de manera general y actual niveles HbA1c debajo del valor umbral de 5.7%.

Modelos de Roedor de Diabetes Mellitus Tipo II en Descubrimiento de Fármacos

Los ejemplos de animales modelo reportados convencionalmente que desarrollan espontáneamente diabetes Tipo II incluyen ratones KK-Ay (Nishimura M., Exp. Anim. 18, 147-157, 1969), ratones NSY (Ueda H., *et al.*, Diabetologia 38, 503-508, 1995), ratones db/db (Hummel K. P., *et al.*, Science 153, 1127-1128, 1966), ratones ob/ob (Herberg L. & Kley H K, Horm. Metab. Res. 7, 410-5, 1975), y ratones AKITA (Yoshioka M., *et al.*, Diabetes 46, 887-894, 1997).

De estos animales, los ratones KK-Ay y ratones NSY son modelos con obesidad y los ratones db/db y ratones ob/ob son modelos con obesidad debido a una anomalía en receptores de leptina o en la producción de leptina. Por otra parte, los ratones AKITA son un modelo para diabetes originada por una anomalía en las células β pancreáticas.

Como un modelo animal de diabetes Tipo II no obeso, por ejemplo, un modelo de ratón se reporta en la Solicitud de Patente Japonesa No. 2004-65181. Este ratón exhibe una secreción anormal de insulina.

Sin embargo, los anticuerpos de la presente invención se prueba preferentemente y caracterizan en animales transgénicos, por ejemplo, roedores que expresan hIAPP tal como ratas transgénicas para amilina humana en células β pancreáticas (ratas HIP) tal como se describe en la Publicación de Butler *et al.*, Diabetes 53 (2004), 1509-1516 y Matveyenko and Butler, Diabetes 55 (2006), 2106-2114. Más preferentemente, los modelos de ratón de diabetes tipo 2 que sobreexpresan IAPP, se utilizan tal como se describe en la Publicación de Matveyenko and Butler (2006), ILAR J. 47(3): 225-233, y se resume en la tabla 2 en la página 228 de dicho documento. Debido a la sobreexpresión de hIAPP de dichos modelos de animal, se muestra en forma válida síntomas de T2D tal como un estado hiperglicémico. En general, el término "hiperglicemia" o "estado hiperglicémico" se refiere a niveles de glucosa en plasma en ayuno significativamente incrementados en dos medidas consecutivas tomadas en diferentes intervalos de tiempo, y cuando se compara con crías de control no transgénicas. Los valores absolutos medidos en animales hiperglicémicos deben depender del modelo animal en particular utilizado, por ejemplo, en h-IAPP (ratones hemicigóticos)/ob/+, $\geq$ 15-20 mM glucosa; en ratones h-IAPP (homicigóticos)/FVB/N $\geq$ 11mM glucosa.

Los métodos para estudiar diabetes incluyen medida de cambios fisiológicos y análisis de sangre o plasma de animales diabéticos en comparación con animales no diabéticos, saludables. Estas medidas incluyen pero no se limitan a, dinámicas de crecimiento, índice de masa corporal (BMI), índice de masa magra (LMI), ingesta de alimentos y agua, diferencias de sexo, glucosa en sangre en ayuno y aleatoria, triglicéridos (TG), lipoproteínas, colesterol, peso de hígado y lípidos de hígado, tamaño de función de riñón, prueba de tolerancia a glucosa (GTT), prueba de tolerancia a insulina (ITT), concentración de insulina en sangre, morfología de célula de islote pancreático, dietas con alto contenido de grasa y restricción calórica.

Tal como se utiliza en la presente invención, los términos "aleatorio" y "sin ayuno" significan generalmente en cualquier tiempo durante el día o la noche sin importar que tiempo ha transcurrido desde el último alimento.

Tal como se utiliza en la presente invención, el término "ayuno" significa generalmente ninguna ingesta calórica durante al menos 12 horas.

Se podrá apreciar que estas definiciones son las directrices generalmente aceptadas por médicos que generalmente están según la American Diabetes Association (Asociación Americana de Diabetes) (ADA) y German Diabetes

Association (Asociación Alemana de Diabetes) (GDA). Las directrices pueden cambiar con el tiempo y variar por región o país y dependen del grupo o institución (por ejemplo, ADA, Organización Mundial de la Salud, NIDDK/NIH, CDC, GDA etc.) que proporciona las directrices conocidas para los expertos en la técnica. Los médicos también pueden utilizar su experiencia clínica, el historial médico del paciente y/o otra información cuando se decide un diagnóstico y tratamiento. Estas definiciones por consiguiente pueden cambiar con el tiempo según los avances en ciencia y medicina.

Tratamiento:

Tal como se utiliza en la presente invención, los términos “tratar” o “tratamiento” se refieren tanto a un tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas, en donde el objeto es prevenir o disminuir (alentar) un cambio o trastorno fisiológico no deseado, tal como el desarrollo de diabetes. Los resultados clínicos benéficos o deseados incluyen pero no se limitan a, alivio de síntomas, disminución de grado de enfermedad, estado de enfermedad estabilizado (es decir, que no empeora), retraso o disminución del progreso de la enfermedad, disminución o alivio del estado de enfermedad, y remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable. El término “tratamiento” también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento. Los que necesitan tratamiento incluyen los que ya tienen la condición o trastorno, así como los que son propensos a tener la condición o trastorno, o aquellos en donde se evitará la manifestación de la condición o trastorno.

Si no se indica de otra manera, el término “fármaco”, “medicina”, o “medicamento” se utilizan de manera intercambiable en la presente invención y deben incluir pero no limitarse a todos (A) artículos, medicinas y preparaciones para uso interno o externo, y cualquier sustancia o mezcla de sustancias proyectada para ser utilizada para el diagnóstico, curación, mitigación, tratamiento o prevención de la enfermedad ya sea de un hombre u otros animales; y (B) artículos, medicinas y preparaciones (además de alimento) proyectados para afectar la estructura o cualquier función del cuerpo de un hombre u otros animales; y (C) artículos proyectados para utilizarse como un componente de cualquier artículo especificado en cláusulas (A) y (B). El término “fármaco”, “medicina” o “medicamento” deben incluir la fórmula completa de la preparación proyectada para utilizarse en cualquier hombre u otros animales que, en donde la fórmula contiene uno o más “agentes”, “compuestos”, “sustancias” o “composiciones (químicas)”, y en algún otro contexto también otros excipientes farmacéuticamente inactivos como rellenos, desintegrantes, lubricantes, deslizadores, enlazadores o que aseguren un fácil transporte, desintegración, disgregación, disolución y disponibilidad biológica del “fármaco”, “medicina” o “medicamento” en una ubicación objetivo proyectada dentro del cuerpo del hombre u otros mamíferos, por ejemplo, en la piel, en el estómago o el intestino. Los términos “agente”, “compuesto” o “sustancia” se utilizan de manera intercambiable en la presente invención y deben incluir, en un contexto más particular, pero no se limitan a todos los agentes farmacológicamente activos, es decir, agentes que inducen un efecto biológico o farmacológico deseado o se investigan o prueba para la capacidad de inducir dicho efecto farmacológico posible a través de los métodos de la presente invención.

Por el término “sujeto” o “individuo” o “animal” o “paciente” o “mamífero”, se entiende cualquier sujeto, particularmente sujeto humano, por ejemplo, un paciente humano, para el cual se desea diagnóstico, pronóstico, prevención o terapia.

Portadores farmacéuticos:

Los portadores y las rutas de administración farmacéuticamente aceptables pueden tomarse de la literatura correspondiente conocida por los expertos en la técnica. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden formularse según métodos conocidos en la técnica; ver por ejemplo la Publicación de Remington: The Science and Practice of Pharmacy (Ciencia y Práctica de Farmacia) (2000) de la Universidad de Ciencias de Filadelfia, ISBN 0-683-306472, Protocolos de Vacuna 2ª Edición de Robinson *et al.*, Humana Press, Totowa, Nueva Jersey, USA, 2003; Banga, Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing, and Delivery Systems (Péptidos y Proteínas Terapéuticas: Formulación, Procesamiento y Sistema de Suministro) 2ª Edición de Taylor and Francis (2006), ISBN: 0-8493-1630-8. Los ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen soluciones salinas amortiguadas por fosfato, agua, emulsiones, tal como emulsiones de aceite/agua, varios tipos de agentes humectantes, soluciones estériles etc. Las composiciones que comprenden dichos portadores pueden formularse a través de métodos convencionales bien conocidos. Estas composiciones farmacéuticas se pueden administrar al sujeto en una dosis adecuada. La administración de composiciones adecuadas puede llevarse a cabo por diferentes formas. Los ejemplos incluyen administrar una composición que contiene un portador farmacéuticamente aceptable vía oral, intranasal, rectal, tópica, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, subdérmica, transdérmica, intratecal, y métodos intracraneales. Las formulaciones en aerosol tal como formulaciones de rocío nasal incluyen soluciones acuosas purificadas, u otras soluciones del agente activo con agentes conservadores y agentes isotónicos. Dichas formulaciones se ajustan preferentemente a un pH y estado isotónico compatible con las membranas mucosas nasales. Las composiciones farmacéuticas para administración oral, tal como moléculas de anticuerpo de

dominio simple (por ejemplo, "nanocuerposTM") etc., también están consideradas en la presente invención. Dichas formulaciones orales pueden estar en forma de tableta, cápsula, polvo, líquido o semisólido. Una tableta puede comprender un portador sólido tal como gelatina o un adyuvante. Las formulaciones para administración rectal o vaginal pueden presentarse como un supositorio con un portador adecuado, ver también la Publicación de O'Hagan *et al.*, Nature Reviews, Drug Discovery 2(9) (2003), 727-735. La guía adicional con respecto a formulaciones que son adecuadas para diversos tipos de administración se pueden encontrar en las Ciencias Farmacéuticas de Remington, Mace Publishing Company, Philadelphia, PA, 17^o edición (1985) y actualizaciones correspondientes. Para una revisión breve de los métodos para suministro de fármaco consultar la Publicación de Langer, Science 249 (1990), 1527-1533.

10 II. Anticuerpos de la presente invención

La presente invención se refiere generalmente a anticuerpos anti-IAPP humanos y a fragmentos de unión a antígeno de los mismos, tal como se caracteriza en las reivindicaciones, que demuestran preferentemente las características de unión inmunológicas y/o propiedades biológicas tal como se describe para los anticuerpos, cuyas secuencias se representan en las figuras 1A-E, H e I y se ilustran en los Ejemplos. Según la presente invención, los anticuerpos monoclonales humanos específicos para IAPP y/o proIAPP fueron clonados a partir de un conjunto de sujetos humanos saludables.

En el curso de los experimentos llevados a cabo según la presente invención, los anticuerpos en un medio acondicionado de cultivos de célula B de memoria humana fueron clasificados en paralelo para unión a proteína r IAPP y/o proIAPP oligomérica, fibrilar y/o no fibrilar agregada-albúmina de suero de bovino (BSA). Únicamente los cultivos de célula B positivos para proteína IAPP y/o proIAPP agregada pero no para BSA, fueron sometidos a clonación de anticuerpo.

Debido a esta medida, se pueden aislar varios anticuerpos. Los anticuerpos seleccionados fueron analizados en forma adicional para la determinación de clase y subclase de cadena ligera. Los mensajes de anticuerpos relevantes seleccionados de cultivos de célula B de memoria posteriormente son transcritos por RT-PCR, clonados y combinados en vectores de expresión para producción recombinante; ver los ejemplos adjuntos. La expresión recombinante de los anticuerpos humanos en células HEK293 o CHO y la caracterización subsecuente de sus especificidades de unión hacia la proteína IAPP y/o proIAPP humana (figuras 3 y 4; Ejemplo 1), y su unión distintivo a formas patológicamente agregadas de los mismos (figura 5, ejemplo 2) confirmaron que por primera vez los anticuerpos humanos han sido clonados de modo que son altamente específicos para proteína IAPP y/o proIAPP y reconocen en forma distinta las formas patológicamente agregadas de proteína IAPP y/o proIAPP, tal como fibrillas de IAPP. Una segunda vuelta de experimentos confirmó los descubrimientos anteriores tal como se muestra en las figuras 7 a 9 y en el Ejemplo 4. Además, los anticuerpos quiméricos de ratón generados según la presente invención y que comprende dominios CDR de los anticuerpos humanos de la presente invención, han mostrado una afinidad de unión igual a IAPP humano como los anticuerpos humanos tal como se muestra en las figuras 11 y 12 y en el Ejemplo 6.

Por lo tanto, la presente invención se refiere de manera general a un anticuerpo de polipéptido amiloide anti-islole monoclonal humano de origen natural, aislado y fragmentos de unión, derivados y variantes del mismo, tal como se caracteriza en las reivindicaciones. En una realización de la presente invención, el anticuerpo tiene la capacidad de enlazar IAPP y/o proIAPP.

En una realización, la presente invención se dirige a un anticuerpo anti-IAPP y/o anti-proIAPP o un fragmento de unión a antígeno, variantes o derivados del mismo, en donde el anticuerpo enlaza específicamente al mismo epítipo de IAPP como un anticuerpo de referencia seleccionado del grupo que consiste en NI-203.9A2, NI-203.19H8, NI-203.26C11, NI-203.8E3, NI-203.11B12, NI-203.19F2 y NI-203.15C7. El mapeo de epítipo identificó una secuencia dentro del IAPP humano que incluye aa 19-SSNNFGA-25 (SEQ ID NO: 4) como el epítipo lineal único reconocido por el anticuerpo NI-203.19H8 de la presente invención, una secuencia dentro del IAPP humano que incluye una aa 2-CNTATCA-8 (SEQ ID NO: 5) como el epítipo lineal único reconocido por el anticuerpo NI-203.26C11 de la presente invención, y una secuencia dentro del IAPP humano que incluye una aa 10-QRLANFLVHS-19 (SEQ ID NO: 71) el epítipo lineal único reconocido por el anticuerpo NI-203.15C7 de la presente invención (ver figuras 5 A y 5B y el Ejemplo 3). Por consiguiente, en una realización se proporciona el anticuerpo de la presente invención, en donde el anticuerpo enlaza específicamente un epítipo IAPP que comprende la secuencia de aminoácido SSNNFGA (SEQ ID NO: 4), CNTATCA (SEQ ID NO: 5) o QRLANFLVHS (SEQ ID NO: 71). Tal como se describe con detalle en el Ejemplo 3, los epítopos de los anticuerpos IAPP recombinantes, anticuerpos NI-203.9A2, NI-203.8E3 y NI-203.19F2 puede no ser identificado, lo que indica que estos anticuerpos probablemente enlazan epítopos no lineales.

Además, en una realización, la presente invención se dirige a un anticuerpo anti-IAPP y/o anti-proIAPP, un fragmento de

unión a antígeno, variante o derivados del mismo, en donde el anticuerpo enlaza específicamente al mismo epítipo de prolAPP como el anticuerpo de referencia NI-203.26C11.

Además, sin pretender limitarse por las observaciones experimentales iniciales tal como se muestra en el Ejemplo 4 y se muestra en la figura 7, los anticuerpos NI-203.9A2, NI-203.19H8, NI-203.26C11 y NI-203.8E3 anti-IAPP monoclonales humanos de la presente invención están caracterizados preferentemente en una unión específico a los agregados IAPP patológicos (fibrillas en este Ejemplo), y no reconocen sustancialmente IAPP en la forma fisiológica en el páncreas. Lo mismo se espera que aplique para los anticuerpos NI-203.19F2 y NI-203.15C7 anti-IAla prPP monoclonales humanos. Por lo tanto, la presente invención proporciona un conjunto de anticuerpos anti-IAPP y/o anti-prolAPP humanos con especificidades de unión, que por lo tanto son particularmente útiles para propósitos de diagnóstico y terapéuticos. Por lo tanto, en una realización la presente invención proporciona anticuerpos, que tiene la capacidad de enlazar específicamente a formas patológicamente agregadas de IAPP y/o prolAPP (ver figura 5 y figuras 7 a 9, y los Ejemplos 2 y 4). Para detalles adicionales y una revisión resumida con respecto a las especificidades de unión de la presente invención ver también las figuras 7 y 8 y la descripción que se encuentra más adelante.

El anticuerpo de la presente invención exhibe las propiedades de unión de los anticuerpos NI-203.9A2, NI-203.19H8, NI-203.26C11, NI-203.8E3, NI-203.19F2 y NI-203.15C7 de ejemplo tal como se describe en los Ejemplos. Además o en forma alternativa, el anticuerpo anti-IAPP y/o anti-prolAPP de la presente invención reconoce preferentemente anti-IAPP y/o anti-prolAPP patológicamente agregado, tal como fibrillas de IAPP en lugar de monómeros IAPP y/o prolAPP fisiológicos, en particular cuando se analizan según los Ejemplos 2 a 4. En una realización, por lo tanto, el anticuerpo de la presente invención no reconoce sustancialmente IAPP fisiológico. El término "no reconoce sustancialmente" cuando se utiliza en la presente solicitud, describe una afinidad de unión de una molécula de un grupo que comprende un anticuerpo, un fragmento del mismo o una molécula de unión para una molécula objetivo, antígeno y/o conformación específica de la molécula objetivo y/o antígeno, significa que la molécula del grupo antes mencionado enlaza a la molécula, antígeno y/o conformación con una afinidad de unión que es de al menos 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces o 9 veces menor que la constante de disociación (KD) de la molécula del grupo antes mencionado para enlazar a otra molécula, antígeno y/o conformación. Preferentemente el término "no reconoce sustancialmente" cuando se utiliza en la presente solicitud significa que la molécula del grupo antes mencionado enlaza la molécula, antígeno y/o conformación con una afinidad de unión que es de al menos o de 10 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces, 1000 veces o 10000 veces menor que la constante de disociación (KD) de la molécula del grupo antes mencionado para enlazar a otra molécula, antígeno y/o conformación. Además, o en forma alternativa, el anticuerpo anti-IAPP y/o anti-prolAPP de la presente invención enlaza a la enfermedad originando formas agregadas de anti-IAPP y/o anti-prolAPP humano, en particular las descritas en el Ejemplo 4. En este contexto, las especificidades de unión pueden estar en el rango tal como se muestra en los anticuerpos NI-203.9A2, NI-203.19H8, NI-203.26C11 y NI-203.8E3 de ejemplo en la figura 4, respectivamente figura 5, es decir, teniendo la mitad de las concentraciones efectivas máximas (EC50) de aproximadamente 1 pM a 500 nM, preferentemente una EC50 de aproximadamente 10 pM a 100 nM, más preferentemente una EC50 de aproximadamente 100 pM a 50 nM para IAPP humano tal como se muestra para NI-203.19H8 o una EC50 de aproximadamente 100 pM a 10 nM para IAPP humano tal como se muestra para NI-203.9A2, NI-203.26C11 y NI-203.8E3. En este contexto, los resultados experimentales tal como se proporcionan en el Ejemplo 4 y se muestran en la figura 4, la figura 5 respectiva, también indica que además o en forma alternativa, algunos de los anticuerpos anti-IAPP de la presente invención no reconocen sustancialmente prolAPP tal como se muestra para los anticuerpos de ejemplo NI-203.9A2, NI-203.19H8 y NI-203.8E3. Por lo tanto, en una realización, el anticuerpo de la presente invención no reconoce sustancialmente prolAPP.

Además, o en forma alternativa, el anticuerpo anti-IAPP de la presente invención enlaza específicamente además para madurar IAPP para la forma precursora de IAPP, es decir prolAPP también en particular como se describe en el Ejemplo 1. En este contexto, las especificidades de unión pueden estar dentro del rango tal como se muestra en el anticuerpo NI-203.26C11 de ejemplo en la figura 3, la figura 4 respectiva, es decir, que tiene la mitad de las concentraciones efectivas máximas (EC50) de aproximadamente 1 pM a 500 nM, preferentemente una EC50 de aproximadamente 10 pM a 400nM, más preferentemente una EC50 de aproximadamente 100 pM a 400nM o una EC50 de aproximadamente 100 pM a 300 nM, más preferentemente una EC50 de aproximadamente 1nM a 300nM para el pro-IAPP agregado tal como muestra para NI-203.26C11.

Además o en forma alternativa, el anticuerpo anti-IAPP de la presente invención enlaza específicamente a IAPP madura y no enlaza sustancialmente la forma precursora de IAPP, es decir prolAPP, en particular tal como se describe en el Ejemplo 1. En este contexto, las especificidades de unión pueden estar dentro del rango tal como se muestra en los anticuerpos NI-203.9A2, NI-203.19H8 y NI-203.8E3 de ejemplo en la figura 4, la figura 5 respectiva tal como se indicó anteriormente.

Algunos anticuerpos purificados se enlazan a una amplia formación de biomoléculas, por ejemplo, proteínas. Tal como lo apreciarán los expertos en la técnica, el término específico se utiliza en la presente invención para indicar que otras biomoléculas además de las proteínas IAPP y/o proIAPP o fragmentos de las mismas, no enlazan significativamente a la molécula de unión a antígeno, por ejemplo, uno de los anticuerpos de la presente invención. Preferentemente, el nivel de unión a una biomolécula además de IAPP y/o proIAPP, da como resultado una afinidad de unión que es cuando mucho únicamente el 20% o menos, 10% o menos, únicamente 5% o menos, únicamente 2% o menos o únicamente 1% o menos (es decir al menos 5, 10, 20, 50 o 100 veces menor) de la afinidad a IAPP y/o proIAPP, respectivamente; ver por Ejemplo 1 y figura 3. Además, los anticuerpos anti-IAPP y/o anti-proIAPP de la presente invención enlazan específicamente a los agregados IAPP y/o proIAPP tal como se valida mediante los experimentos que muestran que los anticuerpos de la presente invención no reconocen el amiloide A β patológico en enfermedad Alzheimer de cerebro humano y tiene únicamente calidades de unión de reacción cruzada mínimas para diversos candidatos de proteína con una propensión de mal pliegue/agregación, tal como se muestra con los anticuerpos de ejemplo NI-203.9A2, NI-203.19H8 y NI-203.26C11 en las secciones de cerebro incrustadas con parafina de un paciente diagnosticado con enfermedad de Alzheimer y mediante experimentos de ELISA directo; ver el Ejemplo 5 y figura 10.

Por consiguiente, en una realización se proporciona el anticuerpo de la presente invención, el cual no reconoce sustancialmente el amiloide- β péptido (A β ₁₋₄₂).

El anticuerpo anti-IAPP y/o anti-proIAPP de la presente invención se enlaza preferentemente a las formas agregadas de IAPP y/o proIAPP, las fibrillas y/o oligómeros IAPP y/o proIAPP; ver los resultados experimentales mediante ELISA directa en el Ejemplo 2 y en páncreas de pacientes diagnosticados con T2D y en páncreas de gato diabético mediante manchado inmunohistoquímico descrito en el Ejemplo 4 y tal como se muestra en las figuras 7 y 9 respectivamente. En una realización, el anticuerpo de la presente invención enlaza preferentemente las formas agregadas de IAPP y/o proIAPP, en donde los agregados comprenden, consisten esencialmente o consisten de formas fibrilares y/o oligómeros fibrilares de IAPP. En otra realización, el anticuerpo de la presente invención enlaza preferentemente a las formas agregadas de IAPP y/o proIAPP, en donde los agregados comprenden, consisten esencialmente o consisten en formas no fibrilares y/o oligómeros no fibrilares de IAPP. Aún en otra realización, el anticuerpo de la presente invención enlaza preferentemente a las formas agregadas de IAPP y/o proIAPP, en donde los agregados comprenden, consisten esencialmente en, o consisten ya sea de formas fibrilares o no fibrilares de IAPP y/o proIAPP y/o oligómeros fibrilares y no fibrilares de IAPP y/o proIAPP. Aún en otra realización, el anticuerpo anti-IAPP y/o anti-proIAPP de la presente invención enlaza preferentemente tanto a IAPP y/o proIAPP nativo y a las formas patológicamente agregadas de IAPP y/o proIAPP; ver los resultados experimentales tal como se ejemplifica en el Ejemplo 2 y Ejemplo 3 mediante ELISA directo.

Tal como se mencionó anteriormente, los agregados que comprenden IAPP y/o proIAPP también se pueden encontrar asociados con depósitos amiloides en islotes pancreáticos de pacientes T2D. Por consiguiente, en una realización, el anticuerpo de la presente invención puede ser útil en el tratamiento de T2D.

La presente invención también se muestra como un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivados del mismo, en donde el anticuerpo comprende un dominio de unión a antígeno idéntico al de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en NI-203.9A2, NI-203.19H8, NI-203.26C11, NI-203.8E3, NI-203.11B12, NI-203.19F2, NI-203.15C7.

La presente invención ejemplifica además varias de dichas moléculas de unión, por ejemplo, anticuerpos y fragmentos de unión del mismo, que pueden caracterizarse por comprender en su región variable, es decir, el dominio de unión las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de la región variable V_H y V_L que comprende cualquiera de las secuencias de aminoácido ilustradas en la figura 1A-E, H e I. Las secuencias de nucleótido correspondientes que codifican las regiones variables antes identificadas tal como se establecen en la tabla II más adelante. Los conjuntos de CDRs de ejemplo de las secuencias de aminoácido anteriores de la región V_H y V_L se ilustran en la figura 1A-E, H e I. Sin embargo, tal como se describe a continuación, los expertos en la técnica están atentos del hecho de que en forma adicional o alternativa se pueden utilizar las CDRs, las cuales difieren en la secuencia de aminoácido de las establecidas en la figura 1A-E, H e I por uno, dos, tres, o incluso más aminoácidos en caso de CDR2 y CDR3. Por consiguiente, en una realización, se proporciona el anticuerpo de la presente invención o un fragmento de unión a IAPP y/o proIAPP del mismo, que comprende en su región variable las regiones determinantes de complementariedad (CDR) tal como se ilustra en la figura 1A-E, H e I y/o una o más CDRs de la misma, que comprenden una o dos sustituciones de aminoácido.

En una realización, el anticuerpo de la presente invención es cualquiera de los anticuerpos que comprenden una secuencia de aminoácido de la región V_H y V_L tal como se ilustra en la figura 1A-E, H e I. Preferentemente, el anticuerpo

de la presente invención se caracteriza por la conservación del emparejamiento cognato de la cadena pesada y ligera, tal como estuvo presente en la célula B humana.

5 Alternativamente, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, derivado o variante del mismo, que compite para enlazar a IAPP y/o proIAPP con al menos uno de los anticuerpos que tienen la región V_H y/o V_L tal como se ilustra en la figura 1A-E, H e I.

10 Los resultados experimentales proporcionados en el Ejemplo 4 sugieren que algunos de los anticuerpos anti-IAPP y/o anti-proIAPP de la presente invención se enlazan preferentemente a la enfermedad originando formas agregadas de anti-IAPP y/o anti-proIAPP humano con respecto a las formas fisiológicas de las proteínas. Por lo tanto, el anticuerpo de la presente invención, reconoce preferentemente los agregados IAPP y/o proIAPP con respecto a IAPP y/o proIAPP fisiológico. Además, el anticuerpo de la presente invención reconoce preferentemente los agregados IAPP que comprenden oligómeros IAPP y/o fibrillas con respecto a IAPP fisiológicos. En otra realización, el anticuerpo de la presente invención reconoce preferentemente los agregados IAPP que comprenden oligómeros IAPP no fibrilares y/o IAPP no fibrilares con respecto a IAPP fisiológico.

15 Tal como ya se indicó anteriormente, algunos de los anticuerpos de la presente invención han mostrado tener la capacidad de enlazar tanto a IAPP como a su forma precursora proIAPP. Además, algunos de los anticuerpos de la presente invención han sido aislados de pacientes humanos debido a su capacidad de enlazar a proIAPP. Por consiguiente, en una realización, el anticuerpo de la presente invención tiene la capacidad de enlazar proIAPP.

20 El anticuerpo de la presente invención puede ser humano, en particular, para aplicaciones terapéuticas. En forma alternativa, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo de roedor, anticuerpo roedorizado o de roedor-humano quimérico, preferentemente, un anticuerpo de murino, murinizado o de murino-humano quimérico o un anticuerpo de rata, ratinizado o de rata-humano quimérico que es particularmente útil para métodos de diagnóstico y estudios en animales. En una realización, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo de roedor-humano quimérico o roedorizado.

25 Además, en una realización, el anticuerpo quimérico de la presente invención, exhibe las propiedades de unión de los anticuerpos quiméricos de murino NI-203.9A2, NI-203.19H8 y NI-203.26C11 de ejemplo tal como se describe en los Ejemplos. Además, los anticuerpos quiméricos de ratón de la presente invención enlazan con alta afinidad a las fibrillas de IAPP humanas, tal como se describe en el Ejemplo 6. Preferentemente, la afinidad de unión de los anticuerpos quiméricos es similar a la de las contrapartes humanas. En este contexto, las especificidades de unión pueden estar dentro del rango tal como se muestra para los anticuerpos quiméricos de murino NI-203.9A2, NI-203.19H8 y NI-203.26C11 de ejemplo con una EC_{50} de 18.6 nM, 23.9 nM y 11.5 nM, respectivamente, tal como se describe en el Ejemplo 6 y como se muestra en la figura 11 y en la tabla C que se encuentra más adelante. No se observó unión en BSA.

30 En una realización, se proporciona el anticuerpo de la presente invención mediante cultivos de células B simples u oligoclonales que son cultivadas y el sobrenadante del cultivo, que contiene anticuerpos producidos por dichas células B, se clasifica para la presencia y afinidad de anticuerpos anti-IAPP y/o proIAPP en el mismo. El proceso de clasificación comprende clasificar para la unión a agregados monoméricos, fibrilares o no fibrilares nativos tipo oligómeros de hIAPP derivados de un péptido hIAPP de longitud total sintético de la secuencia de aminoácido representada por la SEQ ID NO: 1; y/o la clasificación separada e independiente para la unión a un péptido sintético derivado del proIAPP humano (fragmento N-terminal) de la secuencia de aminoácido TPIESHQVEKRCNTATCATQR representada por SEQ ID NO: 7.

35 En forma adicional o alternativa el proceso de clasificación para la presencia de afinidad de anticuerpos anti-IAPP y/o proIAPP comprende los pasos de ensayo de inmunorreactividad de placa amiloide de tejido sensible (TAPIR), tal como se describe en la solicitud internacional WO2004/095031, se lleva a cabo en la presente invención en analogía para depósitos amiloides en islotes pancreáticos. Además o en forma alternativa, se pueden llevar a cabo clasificaciones en secciones de páncreas para unión a anti-IAPP y/o proIAPP, tal como se describe en analogía a la Solicitud Internacional WO2008/081008 para secciones de cerebro y/o de médula espinal.

40 Tal como se mencionó anteriormente, debido a su generación al momento de la respuesta inmune humana, el anticuerpo monoclonal humano de la presente invención reconocerá epítomos que son de relevancia patológica particular y que no deben ser accesibles o menos inmunogénicos en caso de procesos de inmunización para la generación, por ejemplo, de anticuerpos monoclonales de ratón y la clasificación *in vitro* de bibliotecas de despliegue de fago, respectivamente. Por consiguiente, es prudente estipular que el epítomo del anticuerpo anti-IAPP y/o proIAPP humano de la presente invención es único y que no hay otro anticuerpo que tienen la capacidad de enlazar al epítomo reconocido por el anticuerpo

monoclonal humano de la presente invención; ver también la figura 5A y la cual muestra el epítipo único del anticuerpo NI-203.19H8, el anticuerpo NI-203.26C11 respectivo de la presente invención. Una indicación adicional para la exclusividad de los anticuerpos de la presente invención es el hecho de que, tal como se indica en el Ejemplo 3, los anticuerpos NI-203.9A2 y NI-203.8E3 de la presente invención enlazan a epítopos conformacionales asumibles de agregados IAPP, lo cual es tal como se indicó anteriormente, es de una relevancia patológica particular y tampoco debe ser obtenible mediante procesos usuales para generación de anticuerpo, tal como inmunización o clasificación de biblioteca *in vitro*.

Por consiguiente, en una realización, la presente invención también se extiende generalmente a los anticuerpos anti-IAPP y a las moléculas de unión a IAPP, que compiten con el anticuerpo monoclonal humano de la presente invención para la unión específico a IAPP. La presente invención se dirige en forma más específica a un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivados del mismo, en donde el anticuerpo enlaza específicamente al mismo epítipo de IAPP como un anticuerpo de referencia seleccionado del grupo que consiste en NI-203.9A2, NI-203.19H8, NI-203.26C11, NI-203.8E3, NI-203.19F2 y NI-203.15C7.

Además, en una realización la presente invención también se extiende generalmente a anticuerpos anti-IAPP y/o anti-proIAPP y a moléculas de unión a IAPP y/o anti-proIAPP que compiten con el anticuerpo monoclonal humano de la presente invención para la unión específico a proIAPP. La presente invención, por consiguiente, se dirige también en forma más específica a un anticuerpo, o a un fragmento de unión a antígeno, variante o derivados del mismo, en donde el anticuerpo enlaza específicamente al mismo epítipo de proIAPP, como el anticuerpo de referencia NI-203.26C11.

En forma adicional o alternativa, la presente invención también se extiende generalmente a anticuerpos anti-IAPP y/o anti-proIAPP y a moléculas de unión a IAPP y/o anti-proIAPP que compiten con el anticuerpo monoclonal humano de la presente invención para la unión específico tanto a IAPP como a proIAPP. La presente invención por consiguiente, también se dirige en forma más específica a un anticuerpo, fragmento de unión a antígeno, variante o derivados del mismo, en donde el anticuerpo enlaza específicamente al mismo epítipo de IAPP y proIAPP como el anticuerpo NI-203.26C11 de ejemplo. En virtud de lo anterior, en una realización la presente invención también se relaciona con un anticuerpo o molécula de unión a antígeno que compite con un anticuerpo de la presente invención para la unión específico a IAPP y/o proIAPP.

La competición entre anticuerpos se determina a través de un ensayo en el cual la inmunoglobulina bajo prueba inhibe la unión específico de un anticuerpo de referencia a un antígeno común, tal como IAPP y/o proIAPP. Se conocen numerosos tipos de ensayos de unión competitivo, por ejemplo: inmunoensayo directo o indirecto de fase sólida (RIA), inmunoensayo de enzimas directo o indirecto de fase sólida (EIA), ensayo de competición de intercalado; ver las Publicación de Stahli *et al.*, *Methods in Enzymology* 9 (1983), 242-253; EIA biotina-avidina directa de fase sólida; ver las Publicaciones de Kirkland *et al.*, *J. Immunol.* 137 (1986), 3614-3619 y Cheung *et al.*, *Virology* 176 (1990), 546-552; ensayo etiquetado directo de fase sólida, ensayo de intercalado de etiquetado directo de fase sólida; ver la Publicación de Harlow and Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1988); RIA de etiqueta directa de fase sólida utilizando etiqueta I^{125} ; ver las Publicaciones de Morel *et al.*, *Molec. Immunol.* 25 (1988), 7-15 and Moldenhauer *et al.*, *Scand. J. Immunol.* 32 (1990), 77-82. Normalmente, dicho ensayo implica el uso de agregados IAPP y/o proIAPP purificados, tal como oligómeros y/o fibrillas de los mismos enlazados a una superficie sólida o células que contienen cualquiera de éstos, una inmunoglobulina de prueba no etiquetada y una inmunoglobulina de referencia etiquetada, es decir, el anticuerpo monoclonal humano de la presente invención. La inhibición competitiva se mide determinando la cantidad de etiqueta enlazada a la superficie sólida o células en la presencia de la inmunoglobulina de prueba. Normalmente la inmunoglobulina de prueba está presente en exceso. Preferentemente, el ensayo de unión competitivo se lleva a cabo bajo condiciones tal como se describe para el ensayo ELISA en los Ejemplos adjuntos. Los anticuerpos identificados mediante el ensayo de competición (anticuerpos de competición) incluyen anticuerpos que enlazan al mismo epítipo que el anticuerpo de referencia, y los anticuerpos que enlazan a un epítipo adyacente en forma lo suficientemente próxima al epítipo enlazado al anticuerpo de referencia para que ocurra el impedimento estérico. Normalmente, cuando está presente en exceso un anticuerpo de competición, inhibirá la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común en al menos 50% o 75%. De ahí, la presente invención creado en forma adicional para un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo, en donde el anticuerpo inhibe que un anticuerpo de referencia seleccionado del grupo que consiste en NI-203.9A2, NI-203.19H8, NI-203.26C11, NI-203.8E3, NI-203.19F2 y NI-203.15C7 unión a IAPP.

Además, la presente invención se crea en forma adicional para un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo, en donde el anticuerpo inhibe competitivamente que el anticuerpo de referencia NI-203.26C11 se una a proIAPP.

Además en forma adicional o alternativa, la presente invención es creada en forma adicional para un anticuerpo biespecífico, un fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo, en donde el anticuerpo inhibe en forma competitiva que un anticuerpo de referencia, tal como el anticuerpo NI-203.26C11 de ejemplo unión ya sea a IAPP y proIAPP.

Una inmunoglobulina o su cADN de codificación pueden ser modificadas en forma adicional. Por lo tanto, el método descrito en la presente solicitud comprende cualquiera del paso(s) para producir un anticuerpo quimérico, anticuerpo murinizado, anticuerpo de cadena simple, fragmento de Fab, anticuerpo biespecífico, anticuerpo de fusión, anticuerpo etiquetado o un análogo de cualquiera de éstos. Los métodos correspondientes son conocidos para los expertos en la técnica y se describen, por ejemplo, en la Publicación de Harlow and Lane "Antibodies, A Laboratory Manual" (Anticuerpos, Manual de Laboratorio), CSH Press, Cold Spring Harbor (1988). Cuando los derivados de dichos anticuerpos se obtienen mediante la técnica de despliegue de fago, se puede utilizar la resonancia de plasmón de superficie tal como se emplea en el sistema BIAcore para incrementar la eficiencia de los anticuerpos de fago que enlazan al mismo epítopo como el de cualquiera de los anticuerpos aquí descritos (Schier, Human Antibodies Hybridomas 7 (1996), 97-105; Malmberg, J. Immunol. Methods 183 (1995), 7-13). La producción de anticuerpos quiméricos se describe, por ejemplo, en la Solicitud Internacional WO89/09622. Los métodos para la producción de anticuerpos humanizados se describen, por ejemplo, en la Solicitud Europea EP-A1 0 239 400, y en la Solicitud Internacional WO90/07861. Las fuentes adicionales de anticuerpos que serán utilizadas según la presente invención son los llamados anticuerpos xenogéneos. El principio general para la producción de anticuerpos xenogéneos, tal como anticuerpos tipo humano en ratones se describe, por ejemplo, en las solicitudes internacionales WO91/10741, WO94/02602, WO96/34096 y WO96/33735. Tal como se describió anteriormente, el anticuerpo de la presente invención puede existir en una variedad de formas además de anticuerpos completos, incluyendo por ejemplo Fv, Fab y F(ab)₂, así como en cadenas simples; ver por ejemplo la Solicitud Internacional WO88/09344. En una realización, por consiguiente se proporciona el anticuerpo de la presente invención, el cual es seleccionado del grupo que consiste en un fragmento Fv de cadena simple (scFv), un fragmento F(ab'), un fragmento F(ab) y un fragmento F(ab')₂.

Los anticuerpos de la presente invención o su cadena(s) de inmunoglobulina correspondiente pueden ser modificados en forma adicional utilizando técnicas convencionales conocidas en el arte, por ejemplo, utilizando eliminación(s), inserción(s), sustitución(s), adición(s) y/o recombinación(s) y/o otra modificación(s) de aminoácido conocida en la técnica, ya sea solas o en combinación. Los métodos para introducir dichas modificaciones en la secuencia de ADN que pasan por la secuencia de aminoácido de una cadena de inmunoglobulina son bien conocidos para los expertos en la técnica, ver por ejemplo la Publicación de Sambrook, *Molecular Cloning A Laboratory Manual* (Clonación Molecular, Manual de Laboratorio), Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y. y en la de Ausubel, *Current Protocols in Molecular Biology* (Protocolos Actuales en Biología Molecular), Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1994). Las modificaciones del anticuerpo de la presente invención incluyen derivaciones químicas y/o enzimáticas en uno o más aminoácidos constituyentes, incluyendo las modificaciones de cadena natural, modificaciones de esqueleto, y modificaciones de N- y C-terminal que incluyen acilación, hidroxilación, metilación, amidación, y la adhesión de porciones de carbohidrato o lípido, cofactores y similares. Además, la presente invención comprende la producción de proteínas quiméricas que comprenden el anticuerpo descrito o algún fragmento del mismo en el término amino fusionado a la molécula heteróloga, tal como el ligando inmunoestimulador en el término carboxilo; ver por ejemplo la Solicitud Internacional WO00/30680 para los detalles técnicos correspondientes.

Los resultados preliminares de los experimentos subsecuentes llevados a cabo según la presente invención revelaron que el anticuerpo anti-IAPP y/o anti-proIAPP humano de la presente invención, en particular los anticuerpos NI-203.9A2, NI-203.19H8, NI-203.26C11 y NI-203.8E3 tuvieron la capacidad de enlazar en forma diferencial a las fibrillas de IAPP en pruebas ELISA. Además, los anticuerpos 203.9A2, NI-203.19H8 y NI-203.26C11 de la presente invención han mostrado enlazar preferentemente a patologías en humanos, tal como depósitos amiloides grandes en islotes pancreáticos que corresponden a las fibrillas de IAPP patológicas, tal como se visualiza mediante manchado ThioS y de rojo Congo (ver figura 7A). Se espera que apliquen las mismas propiedades a los anticuerpos NI-203.19F2 y NI-203.15C7.

Los anticuerpos humanos NI-203.9A2, NI-203.19H8 y NI-203.26C11 mostraron un manchado de islote pancreático prominente y secreciones positivas de amiloide, pero no mostraron algún manchado en los islotes pancreáticos de un paciente T2D que carece de depósitos amiloides y de un paciente de control no diagnosticado con T2D (ver Ejemplo 4 y figura 7). Los anticuerpos de la presente invención también proporcionaron resultados positivos en páncreas de gato diabético mostrando depósitos amiloides de islote; ver la figura 9. Esta especificidad de unión hacia las formas patológicas de IAPP y/o proIAPP en tejido humano y de animal, se enfatiza ya que los experimentos bioquímicos aquí mostrados (ver Ejemplos 2 y figura 5) mostraron la capacidad de uso de los anticuerpos de la presente invención en el tratamiento y diagnóstico de enfermedades asociadas con el surgimiento de IAPP y/o proIAPP agregado en el páncreas.

Como una alternativa para obtener inmunoglobulinas directamente del cultivo de células B o células de memoria B, las células se pueden utilizar como una fuente de sitios de cadena pesada y cadena ligera reajustados para la expresión y/o manipulación genética subsecuente. Los genes de anticuerpo reajustados pueden ser transcritos en forma inversa a partir de mARNs adecuados para producir cADN. Si se desea, la región constante de cadena pesada puede ser intercambiada por la de un isotipo diferente o eliminado en conjunto. Las regiones variables pueden ser enlazadas para codificar las regiones Fv de cadena simple. Las múltiples regiones Fv pueden enlazarse para conferir capacidad de unión a más de un objetivo o se pueden emplear combinaciones de cadena pesada y ligera objetivo o quimérica. Una vez que está disponible el material genético, es sencillo el diseño de análogos como se describió anteriormente, los cuales retienen su capacidad de enlazar al objetivo deseado. Los métodos para clonar regiones variantes de anticuerpo y la generación de anticuerpos recombinantes son conocidos por los expertos en la técnica y se describen por ejemplo en las Publicaciones de Gilliland *et al.*, Tissue Antigens 47 (1996), 1-20; Doenecke *et al.*, Leukemia 11 (1997), 1787-1792.

Una vez que se obtiene el material genético adecuado, y si se desea, se modifica para codificar un análogo, las secuencias de codificación, incluyendo las que codifican, como un mínimo, las regiones variables de la cadena pesada y ligera, pueden ser insertadas en sistemas de expresión contenidos en vectores que pueden ser transfectados en células huésped recombinantes estándar. Se puede utilizar una variedad de dichas células huésped; sin embargo, para un procesamiento eficiente, se prefieren células de mamífero. Las líneas celulares de mamífero típicas para este propósito incluyen pero no se limitan a células CHO, células HEK 293 o células NSO.

La producción del anticuerpo o análogo posteriormente se lleva a cabo cultivando el huésped recombinante modificado bajo condiciones de cultivo adecuadas para el crecimiento de células huésped y la expresión de secuencias de codificación. Los anticuerpos posteriormente se recuperan aislando del cultivo. Los sistemas de expresión están diseñados preferentemente para incluir péptidos de señal de modo que los anticuerpos resultantes sean secretados en el medio; sin embargo, también es posible la producción intracelular.

Según lo anterior, la presente invención también se refiere a un polinucleótido que codifica el anticuerpo o una molécula de unión equivalente de la presente invención, en el caso del anticuerpo, preferentemente al menos una región variable de una cadena de inmunoglobulina del anticuerpo descrito anteriormente. Normalmente, la región variable codificada por el polinucleótido comprende las regiones determinantes de complementariedad (CDR) del VH y VL de la región variable del anticuerpo.

Los expertos en la técnica apreciarán fácilmente que el dominio variable del anticuerpo que tiene el dominio variable antes descrito puede ser utilizado para la construcción de otros polipéptidos o anticuerpos de especificidad y función biológica deseada. Los expertos en la técnica conocen que la afinidad de unión puede ser incrementada elaborando sustituciones de aminoácido dentro de las CDRs o dentro de los bucles hipervariables (Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196 (1987), 901-917) que traslapan parcialmente con las CDRs tal como lo define Kabat; ver la Publicación de Riechmann, *et al.*, Nature 332 (1988), 323-327. Por lo tanto la presente invención también se refiere a anticuerpos en donde una o más de las CDRs mencionadas comprenden una o más, preferentemente no más de dos sustituciones de aminoácido. Preferentemente, el anticuerpo de la presente invención comprende en una o ambas de sus cadenas de inmunoglobulina las tres CDRs de las regiones variables tal como se establece en la figura 1A-E, H e I.

Las moléculas de unión, por ejemplo, anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes, o derivados de los mismos de la presente invención, tal como lo sabrán los expertos en la técnica, pueden comprender una región constante que transmite una o más funciones efectoras. Por ejemplo, la unión del componente C1 del complemento para una región constante de anticuerpo puede activar el sistema de complemento. La activación del complemento es importante en la opsonización y lisis de los patógenos celulares. La activación de complemento también estimula la respuesta inflamatoria y puede estar implicada en hipersensibilidad autoinmune. Además, los anticuerpos enlazan a receptores en diversas células a través de la región Fc, con un sitio de unión de receptor Fc en la región Fv de anticuerpo que enlaza a un receptor Fc (FcR) en la célula. Existe un número de receptores Fc que son específicos para diferentes clases de anticuerpo, incluyendo IgG (receptores gamma), IgE (receptores épsilon), IgA (receptores alfa) y IgM (receptores mu). La unión del anticuerpo a los receptores Fc en las superficies celulares activa un número de respuestas biológicas diversas importantes que incluyen hundimiento y destrucción de las partículas recubiertas con anticuerpo, despeje de complejos inmune, lisis de las células objetivo recubiertas con anticuerpo mediante células exterminadas (llamado citotoxicidad transmitida por célula dependiente de anticuerpo, o ADCC), liberación de transmisores inflamatorios, transferencia de placenta y control de producción de inmunoglobulina.

Por consiguiente, ciertas realizaciones de la presente invención incluyen un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo, en donde al menos una fracción del uno o más dominios de región constante han sido

eliminados o alterados de otra forma para proporcionar características bioquímicas deseadas, tal como funciones efectoras reducidas, la capacidad de dimerización en forma no covalente, una capacidad incrementada de posicionamiento en el sitio de agregación IAPP y/o proIAPP y deposición, vida media en suero reducida o vida media en suero incrementada cuando se compara con un anticuerpo no alterado, completo, de aproximadamente la misma inmunogenicidad. Por ejemplo, ciertos anticuerpos para utilizarse en los métodos de diagnóstico y tratamiento aquí descritos son anticuerpos eliminados por dominio que comprenden una cadena de polipéptido similar a una cadena pesada de inmunoglobulina, pero que carecen al menos de una parte de uno o más dominios de cadena pesada. Por ejemplo, en ciertos anticuerpos, todo un dominio de la región constante del anticuerpo modificado será eliminada, por ejemplo, todo o parte del dominio CH2 será eliminado. En otras realizaciones, ciertos anticuerpos para utilizarse en los métodos de diagnóstico y tratamiento aquí descritos tienen una región constante, por ejemplo, una región constante de cadena pesada IgG, que se altera para eliminar la glicosilación, referida en cualquier parte como anticuerpos aglicosilados o "agli". Dichos anticuerpos "agli" pueden ser preparados en forma enzimática también, mediante el diseño de sitios de glicosilación de consenso en la región constante. Sin pretender limitarse a la teoría, se considera que los anticuerpos "agli" pueden tener un perfil de seguridad y estabilidad mejorado *in vivo*. Los métodos para producir anticuerpos aglicosilados, que tienen una función efectora deseada se encuentran por ejemplo en la Solicitud Internacional WO2005/018572.

En ciertos anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variante o derivado del mismo aquí descritos, la parte Fc puede ser mutada para disminuir la función efectora utilizando técnicas conocidas en el arte. Por ejemplo, la eliminación o inactivación (a través de las mutaciones de punta u otros medios) de un dominio de región constante pueden reducir la unión de receptor Fc del anticuerpo modificado en la circulación, incrementando de esta forma el posicionamiento de IAPP y/o proIAPP. En otros casos, puede ser que las modificaciones de región constante consistentes con la presente invención, moderen la unión de complemento y por lo tanto reduzcan la vida media en suero y la asociación no específica de una citotoxina conjugada. Aún otras modificaciones de la región constante puede ser utilizadas para modificar las ligaduras de disulfuro o porciones de oligosacárido que permiten el posicionamiento incrementado debido a la especificidad de antígeno o flexibilidad de anticuerpo incrementado. El perfil fisiológico, biodisponibilidad y otros efectos bioquímicos resultantes de las modificaciones, tal como el posicionamiento IAPP y/o proIAPP, biodistribución y vida media en suero, pueden ser medidos y cuantificados fácilmente utilizando técnicas inmunológicas bien conocidas sin experimentación indebida.

En ciertos anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variante o derivado del mismo aquí descritos, la parte Fc puede ser mutada o intercambiada por secuencias de proteína alternativa para incrementar la captación celular de los anticuerpos, a manera de ejemplo, incrementando la endocitosis transmitida por receptor de los anticuerpos mediante receptores Fcγ, LRP o receptores Thy1 o mediante "Tecnología de SuperAnticuerpo", la cual se dice que habilita a los anticuerpos a que sean revueltos en células vivas sin dañarlos (Expert Opin. Biol. Ther. (2005), 237-241). Por ejemplo, la generación de proteínas de fusión de la región de unión de proteína y los ligandos de anticuerpo de cognato de los receptores de superficie celular o anticuerpos bi o multiespecíficos con una secuencia específica que enlaza IAPP y/o proIAPP, así como un receptor de superficie celular, pueden diseñarse utilizando técnicas conocidas en la técnica.

En ciertos anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variante o derivado del mismo, aquí descritos, la parte Fc puede ser mutada o intercambiada por secuencias de proteína alternativas o el anticuerpo puede ser modificado en forma química para incrementar su penetración de la barrera de sangre-cerebro.

Las formas modificadas de anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variante o derivado del mismo de la presente invención pueden elaborarse de anticuerpos precursores o de origen completos utilizando técnicas conocidas en el arte. Las técnicas de ejemplo se describen con mayor detalle en la presente invención. Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno, variante o derivado de los mismos de la presente invención pueden elaborarse o fabricarse utilizando técnicas que son conocidas en el arte. En ciertas realizaciones, las moléculas de anticuerpo o fragmentos de los mismos se "producido en forma recombinante", es decir, se producen utilizando tecnología de ADN recombinante. Las técnicas de ejemplo para elaborar moléculas o fragmentos de anticuerpo de las mismas se describen con mayor detalle en otras partes de presente documento.

Los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variante o derivado del mismo de la presente invención también incluyen derivados que serán modificados, es decir, mediante adhesión covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo, de modo que la adhesión covalente no evite que el anticuerpo unión en forma específica a su epítipo cognato. Por ejemplo, pero no a manera de limitación, los derivados de anticuerpo incluyen anticuerpos que han sido modificados, por ejemplo, mediante glucosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivación mediante grupos de protección/bloqueo conocidos, disociación proteolítica, ligadura a un ligando celular u otra proteína, etc. Se pueden llevar a cabo cualquiera modificaciones químicas a través de técnicas conocidas, incluyendo pero sin limitarse a

disociación química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Además, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

En realizaciones preferidas particulares, los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variante o derivado del mismo de la presente invención no generarán una respuesta inmune perjudicial en el animal que será tratado, es decir, en un humano. En ciertas realizaciones, las moléculas de unión, por ejemplo, anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno del mismo de la presente invención se derivan de un paciente, por ejemplo, un paciente humano, y se utilizan subsecuentemente en la misma especie de la cual se derivaron, por ejemplo, un humano, aliviando o minimizando el surgimiento de respuestas inmune perjudiciales.

La desinmunización también se puede utilizar para disminuir la inmunogenicidad de un anticuerpo. Tal como se utiliza en la presente invención, el término "desinmunización" incluye la alteración de un anticuerpo para modificar epítomos de célula T; ver por ejemplo las Solicitudes Internacionales Nos. W098/52976 y WO00/34317. Por ejemplo, las secuencias V_H y V_L del anticuerpo de partida son analizadas y el "mapa" de epítomo de célula T humana de cada región V que muestra el posicionamiento de epítomos en relación con las regiones de determinación de complementariedad (CDRs) y otros residuos clave dentro de la secuencia. Los epítomos de T individuales del mapa de epítomo de célula T, se analizan con el objeto de identificar sustituciones de aminoácido alternativas con bajo riesgo de alterar la actividad del anticuerpo final. Se diseña un rango de secuencias V_H y V_L alternativas, que comprenden combinaciones de sustituciones de aminoácido y estas secuencias se incorporan subsecuentemente en un rango de polipéptidos de unión, por ejemplo, anticuerpos específicos de IAPP y/o proIAPP o fragmentos inmuno-específicos de los mismos para utilizarse en métodos de diagnóstico y tratamiento aquí descritos, que posteriormente se prueban para función. Normalmente, se generan y prueban entre 12 y 24 anticuerpos variantes. Los genes de cadena pesada y ligera completos que comprenden regiones V modificadas y C humanas posteriormente se clonan en vectores de expresión y los plásmidos subsecuentes se introducen en las líneas celulares para la producción de un anticuerpo completo. Los anticuerpos posteriormente se comparan en ensayos bioquímicos y biológicos adecuados, y se identifica la variante óptima.

Los anticuerpos monoclonales pueden ser preparados utilizando una amplia variedad de técnicas conocidas en el arte que incluyen el uso de hibridoma, recombinante y tecnologías de despliegue de fago, o una combinación de los mismos. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden ser producidos utilizando técnicas de hibridoma que incluyen las conocidas en la técnica y que enseñan, por ejemplo, en la Publicación de Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual* (Anticuerpos: Manual de Laboratorio), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª edición (1988); Hammerling *et al.*, in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* (Anticuerpos Monoclonales e Hibridomas de Célula T) Elsevier, N.Y., 563-681 (1981). El término "anticuerpo monoclonal" tal como se utiliza en la presente invención, no se limita a anticuerpos producidos a través de tecnología de hibridoma. El término "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que se deriva de un solo clon, incluyendo cualquier clon eucariótico, procariótico o de fago, y no el método por el cual se produce. Por lo tanto, el término "anticuerpo monoclonal" no se limita a anticuerpos producidos a través de tecnología de hibridoma. En ciertas realizaciones, los anticuerpos de la presente invención se derivan de células B humanas que han sido immortalizadas mediante transformación con virus Epstein-Barr, tal como se describe en la presente invención.

En el proceso de hibridoma bien conocido (Kohler *et al.*, *Nature* 256 (1975), 495), los linfocitos de vida relativamente corta, o mortales de un mamífero, por ejemplo células B derivadas de un sujeto humano tal como se describe en la presente invención, se fusionan con una línea de célula de tumor inmortal (por ejemplo, una línea de célula de mieloma), produciendo de esta forma células híbridas o "hibridomas" que son tanto inmortales como con la capacidad de producir el anticuerpo genéticamente modificado de la célula B. Los híbridos resultantes se segregan en las cepas genéticas simples mediante selección, dilución y recrecimiento con cada cepa individual comprendiendo genes específicos para la formación de un anticuerpo simple. Producen anticuerpos, que son homogéneos contra un antígeno deseado, y en referencia a su parentesco genético puro, se denominan "monoclonal".

Las células de hibridoma preparadas de esta forma se siembran y crecen en un medio de cultivo adecuado que contiene preferentemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o supervivencia de las células de mieloma de origen, no fusionadas. Los expertos en la técnica apreciarán que los reactivos, líneas celulares y medios para la formación, selección y crecimiento de hibridomas están comercialmente disponibles en cualquier número de fuentes y están bien establecidos los protocolos estandarizados. Generalmente, el medio de cultivo en donde las células de hibridoma están creciendo se ensaya para la producción de anticuerpos monoclonales contra el antígeno deseado. La especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producida mediante células de hibridoma se determina mediante ensayos *in vitro*, tal como inmunoprecipitación, radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente enlazado por enzimas (ELISA) tal como aquí se describe. Después de que las células de hibridomas son identificadas por producir anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseada, los clones pueden ser subclonados mediante procedimientos de dilución limitante y crecidos mediante métodos estándar; ver por ejemplo la Publicación de Goding, *Monoclonal Antibodies*:

Principles and Practice (Anticuerpos Monoclonales: Principios y Práctica), Academic Press, pp. 59-103 (1986). Se puede apreciar en forma adicional que los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones pueden ser separados del medio de cultivo, fluido de ascitos o suero mediante procedimientos de purificación convencional tal como por ejemplo, proteína-A, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis de gel, diálisis o cromatografía por afinidad.

En otra realización, los linfocitos pueden ser seleccionados mediante micromanipulación y los genes aislados variables. Por ejemplo, se pueden aislar células mononucleares de sangre periférica de un mamífero inmunizado o naturalmente inmune, por ejemplo, un humano, y cultivarse durante aproximadamente 7 días *in vitro*. Los cultivos pueden ser clasificados para IgGs específicos que cumplen con los criterios de clasificación. Las células de depósitos positivos pueden ser aisladas. Las células Ig que producen B individuales pueden ser aisladas mediante FACS o identificándolos en un ensayo de placa hemolítica transmitido por complemento. Las células B que producen Ig pueden ser micromanipuladas en un tubo, y los genes V_H y V_L pueden ser amplificados utilizando por ejemplo, RT-PCR. Los genes V_H y V_L pueden ser clonados en un vector de expresión de anticuerpo y transfectados en células (por ejemplo, células eucarióticas o procarióticas) para expresión.

Alternativamente, las líneas celulares que producen anticuerpo pueden ser seleccionadas y cultivadas utilizando técnicas bien conocidas por los expertos en el arte. Dichas técnicas se describen en una variedad de manuales de laboratorio y publicaciones primarias. A este respecto, las técnicas adecuadas para utilizarse en la presente invención tal como se describe más adelante, se describen en la Publicación de *Current Protocols in Immunology* (Protocolos Actuales en Inmunología), Coligan *et al.*, Eds., Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, John Wiley and Sons, Nueva York (1991).

Los fragmentos de anticuerpo que reconocen epítomos específicos pueden ser generados mediante técnicas conocidas. Por ejemplo, los fragmentos Fab y $F(ab')_2$ pueden ser producidos en forma recombinante o mediante disociación proteolítica de moléculas de inmunoglobulina, utilizando enzimas tal como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos $F(ab')_2$). Los fragmentos $F(ab')_2$ contienen la región variable, la región constante de cadena ligera y el dominio CH1 de la cadena pesada. Dichos fragmentos son suficientes para uso, por ejemplo, en procedimientos de inmunodiagnóstico que implican acoplamiento de las partes inmuno-específicas de inmunoglobulinas para detectar reactivos, tales como radioisótopos.

Los anticuerpos humanos, tal como aquí se describe, son particularmente deseables para uso terapéutico en pacientes humanos. Los anticuerpos humanos de la presente invención se aíslan, por ejemplo, de sujetos humanos saludables quienes debido a su sobrepeso u obesidad se puede sospechar que estén en riesgo de desarrollar un trastorno metabólico, por ejemplo, T2D, o un paciente con el trastorno pero con una enfermedad inusualmente estable en curso o una forma inusualmente leve de la enfermedad. Sin embargo, el sujeto humano saludable que se sospecha está en riesgo de desarrollar un trastorno metabólico, por ejemplo, T2D, del cual los anticuerpos, tal como aquí se describe, pueden ser aislados, puede ser seleccionado sobre las bases de la presencia de otros riesgos conocidos por incrementar la oportunidad de que una persona desarrolle un trastorno metabólico, por ejemplo, T2D. Dichos riesgos pueden ser deducidos de la revisión de una persona con respecto a factores de riesgo asociados con el desarrollo de un trastorno metabólico, por ejemplo, T2D, tal como una edad de 45 o más; sobrepeso u obesidad; familiares cercanos con diabetes; antecedentes familiares de Afro Americano, Nativo de Alaska, Indio Americano, Asiático Americano, Hispano/Latino, Americano de Islas del Pacífico, Asiático o Árabe; historial de diabetes gestacional; tener un parto de un bebé que pesa más de 4,5 kg, presión sanguínea de 140/90 o más; niveles de colesterol más elevados que lo normal, por ejemplo, con un nivel de lipoproteína de Alta densidad (HDL) debajo de 40 mg/dL (equivalente a 1 mmol/L), o nivel de triglicéridos arriba de 200-499 mg/dL (equivalente arriba de 2,3 a 5,6 mmol/L); estilo de vida sedentario; diagnóstico de síndrome de ovario poliquístico (PCOS); diagnóstico de prediabetes en pruebas previas – un nivel de A1C (también llamada HbA1c o glucohemoglobina) de 5,7 a 6,4%, glucosa en ayuno dañada (IFG), o tolerancia a glucosa dañada (IGT); diagnóstico de otras funciones clínicas asociadas con resistencia a insulina, tal como acantosis nigricans; historia de enfermedad cardiovascular.

En caso de obesidad o sobrepeso de una persona, se utiliza como un indicador para que una persona desarrolle un trastorno metabólico, por ejemplo, T2D, aunque es prudente esperar que los sujetos obesos saludables y libres de síntomas, respectivamente, desarrollarán en forma más regular anticuerpos anti-IAPP y/o anti-proIAPP protectores que los sujetos que están diagnosticados con menor riesgo, por ejemplo, ya que no están clasificados como obesos sino sobrepeso, e incluso como personas con un peso normal, sujetos que pertenecen a las últimas dos clasificaciones pueden ser utilizados también como una fuente para obtener un anticuerpo humano de la presente invención.

Un sujeto puede ser clasificado como teniendo peso normal, teniendo sobrepeso o siendo obeso con base en las medidas de la altura y peso del sujeto, y calculando el Índice de Masa Corporal de los sujetos a través de los siguientes

cálculos: $BMI = \text{peso [kg]} / (\text{altura [m]})^2$. Con base en el resultado, los sujetos se clasifican como de peso normal (BMI 18.5 a 24.9 kg/m^2), sobrepeso (25.0 a 29.9 kg/m^2), u obesos ($\geq 30 \text{ kg/m}^2$) con base en el criterio actual de la Organización Mundial de la Salud (World Health Organization (2000) "Obesidad; prevención y manejo de epidemia global. Reporte de una consulta de WHO". World Health Organ Tech Rep Ser 894: 1.253). Alternativamente o en forma adicional, se puede medir la circunferencia de la cintura (WC) de un sujeto, y utilizarse con base en los cortes específicos del sexo para definir la WC como normal ($<94 \text{ cm}$ [<34.6 pulgadas] en hombres y $<80 \text{ cm}$ [31.5 pulgadas] en mujeres), tijera moderadamente incrementada (94 a 102 cm [34.6 a 40 pulgadas] en hombres y 80 a 88 cm [31.5 a 35 pulgadas] en mujeres), o grande ($>102 \text{ cm}$ [>40 pulgadas] en hombres y $>88 \text{ cm}$ [>35 pulgadas] en mujeres) tal como se describe en InterAct Consortium, Langenberg *et al.*, PLoS Med. 2012 Jun;9(6): e1001230, en donde el sujeto saludable con una circunferencia en la cintura grande (WC grande) desarrollará más regularmente anticuerpos anti-IAPP y/o anti-proIAPP protectores en comparación con la clasificación como obeso con el mayor riesgo de desarrollar T2D, y se pueden utilizar preferentemente para el aislamiento de estos anticuerpos, aunque las personas con una WC moderadamente incrementada o normal se pueden utilizar para el aislamiento de anticuerpos anti-IAPP y/o anti-proIAPP también.

Los anticuerpos de la presente invención pueden ser producidos a través de cualquier método conocido en la técnica para la síntesis de anticuerpos, en particular, mediante síntesis química o preferentemente mediante técnicas de expresión recombinante tal como aquí se describe.

En una realización, un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante, o derivado del mismo de la presente invención, comprende una región constante sintética en donde uno o más dominios están parcial o totalmente eliminados ("anticuerpos eliminados por dominio"). En ciertas realizaciones, los anticuerpos modificados compatibles comprenderán construcciones eliminadas por dominio o variantes, en donde todo el dominio CH2 ha sido eliminado (construcciones ΔCH2). Para otras realizaciones, se puede utilizar un péptido de conexión corta para el dominio eliminado para proporcionar flexibilidad y libertad de movimiento de la región variable. Los expertos en la técnica apreciarán que dichas construcciones son particularmente preferidas debido a las propiedades reguladoras del dominio CH2 en el rango catabólico del anticuerpo. Las construcciones eliminadas por dominio pueden ser derivadas utilizando un vector que codifica un dominio constante humano IgG_1 , ver por ejemplo las Solicitudes Internacionales WO02/060955 y WO02/096948A2. Este vector está diseñado para eliminar el dominio CH2 y proporcionar un vector sintético que expresa una región constante IgG_1 de dominio eliminada.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variante o derivado del mismo de la presente invención son minicuerpos. Los minicuerpos pueden elaborarse utilizando métodos descritos en la técnica, ver por ejemplo la Patente de Estados Unidos No. 5,837,821 o la Solicitud Internacional No. WO94/09817.

En una realización, un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante, o derivado del mismo, de la presente invención comprende una cadena pesada de inmunoglobulina que tiene una eliminación o sustitución de pocos o incluso un solo aminoácido, siempre que permita la asociación entre las subunidades monoméricas. Por ejemplo, la mutación de un solo aminoácido en áreas seleccionadas del dominio CH2, puede ser suficiente para reducir sustancialmente la unión de Fc y de esta forma incrementar el posicionamiento de IAPP y/o proIAPP. Similarmente, puede ser deseable simplemente eliminar dicha parte de uno o más dominios de región constante que controlan la función efectora (por ejemplo, unión de complemento) para ser modulada. Dichas eliminaciones parciales de las regiones constantes pueden mejorar las características seleccionadas del anticuerpo (vida media en suero) dejando aun intactas otras funciones deseables asociadas con el dominio de región constante del sujeto. Además, tal como se mencionó anteriormente, las regiones constantes de los anticuerpos descritos pueden ser sintéticas a través de mutación o sustitución de uno o más aminoácidos que aumentan el perfil de la construcción resultante. A este respecto, puede ser posible interrumpir la actividad proporcionada por un sitio de unión conservado (por ejemplo, unión Fc), mientras se mantiene sustancialmente la configuración y perfil inmunogenético del anticuerpo modificado. Aun otras realizaciones comprenden la adición de uno o más aminoácidos a la región constante para incrementar las características deseables, tal como una función efectora o proporcionar más adhesión de citotoxina o carbohidrato. En dichas realizaciones, puede ser deseable insertar o replicar secuencias específicas derivadas de dominios de región constante seleccionados.

La presente solicitud también describe anticuerpos que comprenden, consisten esencialmente en o consisten en variantes (incluyendo derivados) de moléculas de anticuerpo (por ejemplo, las regiones V_H y/o V_L) aquí descritas, en donde los anticuerpos o fragmentos de los mismos, enlazan en forma inmuno-específica a IAPP y/o proIAPP. Las técnicas estándar conocidas para los expertos en el arte pueden ser utilizadas para introducir mutaciones en la secuencia de nucleótido que codifica un anticuerpo, incluyendo pero sin limitarse a, mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis transmitida por PCR, que da como resultado sustituciones de aminoácido. Preferentemente, las variantes (que incluyen derivados) codifican sustituciones menores a 50 aminoácidos, sustituciones menores a 40 aminoácidos, sustituciones menores a 30 aminoácidos, sustituciones menores a 25 aminoácidos, sustituciones menores a 20

aminoácidos, sustituciones menores a 15 aminoácidos, sustituciones menores a 10 aminoácidos, sustituciones menores a 5 aminoácidos, sustituciones menores a 4 aminoácidos, sustituciones menores a 3 aminoácidos o sustituciones menores a 2 aminoácidos en forma relativa a la región V_H, V_H-CDR1, V_H-CDR2, V_H-CDR3, región V_L, V_L-CDR1, V_L-CDR2 o V_L-CDR3 de referencia. Una "sustitución de aminoácido conservadora" es una en donde el residuo de aminoácido es reemplazado con un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral con carga similar. Las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con cargas similares han sido definidas en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofan), cadenas laterales ramificadas-beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptofan, histidina). Alternativamente, las mutaciones pueden ser introducidas en forma aleatoria a lo largo de toda o parte de la secuencia de codificación, tal como mediante mutagénesis de saturación, y los mutantes resultantes pueden ser clasificados para actividad biológica para identificar mutantes que retienen la actividad (por ejemplo, la capacidad de enlazar IAPP y/o proIAPP).

Por ejemplo, es posible introducir mutaciones únicamente en las regiones de estructura y únicamente en las regiones CDR de una molécula de anticuerpo. Las mutaciones introducidas pueden ser silentes o mutaciones de desacoplamiento neutral, por ejemplo, no tener, o tener poco efecto en la capacidad que tiene el anticuerpo de enlazar al antígeno, de hecho, algunas de dichas mutaciones no alteran en forma alguna la secuencia de aminoácido. Estos tipos de mutaciones pueden ser útiles para optimizar el uso de codón, o mejorar una producción de anticuerpo de hibridoma. Las regiones de codificación optimizadas por codón que codifican anticuerpos de la presente invención se describen en cualquier parte en la presente invención. Alternativamente, las mutaciones de desacoplamiento no neutral pueden alterar la capacidad que tiene un anticuerpo de enlazar un antígeno. El posicionamiento de la mayor parte de las mutaciones de desacoplamiento silentes y neutrales es probable que esté en las regiones de estructura, en tanto que el posicionamiento de la mayor parte de las mutaciones de desacoplamiento no neutrales es probable que esté en CDR, aunque esto no es un requerimiento absoluto. Un experto en la técnica puede tener la capacidad de diseñar y probar moléculas mutantes con propiedades deseadas, tal como no alteración en la actividad de unión a antígeno o alteración en la actividad de unión (por ejemplo, mejorías en la actividad de unión a antígeno o cambio en la especificidad de anticuerpo). Después de la mutagénesis, la proteína modificada puede ser expresada en forma rutinaria y la actividad funcional/biológica de la proteína codificada (por ejemplo, la capacidad de enlazar en forma inmuno-específica al menos a un epítipo de IAPP y/o proIAPP) puede determinarse utilizando técnicas aquí descritas o mediante técnicas de modificación rutinaria conocida en la técnica.

III. Polinucleótidos que Codifican Anticuerpos

Un polinucleótido que codifica un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante, o derivado del mismo puede estar compuesto de cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser ARN o ADN no modificado o ARN o ADN modificado. Por ejemplo, un polinucleótido que codifica un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante, o derivado del mismo puede estar compuesto de ADN de hebra simple o doble, ADN que es una mezcla de regiones de hebra simple o doble, ARN de hebra simple o doble, y ARN que es una mezcla de regiones de hebra simple o doble, moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que pueden ser de hebra simple, o más típicamente, de hebra doble o una mezcla de regiones de hebra simple y hebra doble. Además, un polinucleótido que codifica un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante, o derivado del mismo puede estar compuesto de regiones de hebra triple que comprenden ARN o ADN o tanto ARN como ADN. Un polinucleótido que codifica un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante, o derivado del mismo también puede contener una o más bases modificadas o esqueletos de ADN o ARN modificados para estabilidad o por otras razones. Las bases "modificadas" incluyen, por ejemplo, bases tritiladas y bases inusuales, tales como inosina. Una variedad de modificaciones pueden ser elaboradas para el ADN y ARN; por lo tanto, el término "polinucleótido" abarca formas química, enzimática o metabólicamente modificadas.

Un polinucleótido aislado que codifica una variante no natural de un polipéptido derivado de una inmunoglobulina (por ejemplo, una parte de cadena pesada o parte de cadena ligera de inmunoglobulina) puede crearse introduciendo una o más sustituciones, adiciones o eliminaciones de nucleótido en la secuencia de nucleótido de la inmunoglobulina, de modo que una o más sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácido sean introducidas sean introducidas en la proteína codificada. Las mutaciones pueden ser introducidas mediante técnicas estándar, tal como mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis transmitida por PCR. Preferentemente, las sustituciones de aminoácido conservadoras se elaboran en uno o más residuos de aminoácido no esenciales.

Tal como se sabe, el ARN puede ser aislado de las células B originales, células de hibridoma o de otras células transformadas a través de técnicas estándar, tal como extracción o precipitación de isotiocianato de guanidino seguido

de centrifugación o cromatografía. Cuando es deseable, el mRNA puede ser aislado de un ARN total mediante técnicas estándar tal como cromatografía en la oligocelulosa dT. Las técnicas adecuadas son familiares en la técnica. En una realización, los cADNs que codifican las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo pueden ser elaboradas, ya sea en forma simultánea o separada, utilizando transcriptasa inversa y polimerasa de ADN según métodos bien conocidos. PCR se puede iniciar mediante cebadores de región constante de consenso o mediante cebadores más específicos con base en el ADN de cadena pesada y ligera publicado, con base en las secuencias de aminoácido y ADN de cadena pesada y ligera publicada. Tal como se describió anteriormente, PCR también se puede utilizar para aislar clones de ADN que codifican las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo. En este caso, las bibliotecas pueden ser clasificadas mediante cebadores de consenso o sondas homólogas más grandes, tal como sondas de región constante humana.

El ADN, normalmente ADN de plásmido, puede ser aislado de células utilizando técnicas conocidas en el arte, restricción mapeada y secuenciada según el estándar, técnicas bien conocidas establecidas con detalle, por ejemplo, las referencias anteriores que se relacionan con técnicas de ADN recombinante. Por supuesto, el ADN puede ser sintético según la presente invención, en cualquier punto durante el proceso de aislamiento o análisis subsecuente.

Dentro de este contexto, la presente invención también se refiere a un polinucleótido que codifica al menos un dominio de unión o región variable de una cadena de inmunoglobulina del anticuerpo de la presente invención. En una realización, la presente invención proporciona un polinucleótido aislado que comprende, consiste esencialmente en o consiste en un ácido nucleico que codifica una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina (VH).

En otra realización, la presente invención proporciona un polinucleótido aislado que comprende, consiste esencialmente en o consiste en un ácido nucleico que codifica una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina (VL).

En otra realización, la presente invención proporciona un polinucleótido aislado que comprende, consiste esencialmente en o consiste en un ácido nucleico que codifica una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina (VH) en donde las regiones VH-CDR1, VH-CDR2 y VH-CDR3 tienen secuencias de polipéptido que son idénticas a los grupos VH-CDR1, VH-CDR2 y VH-CDR3 mostrados en la figura 1A-E, H e I.

En una realización preferida de la presente invención, el polinucleótido que comprende, consiste esencialmente en o consiste en un ácido nucleico que codifica una secuencia de polinucleótido de la región VH o VL de un anticuerpo anti-IAPP y/o anti-proIAPP tal como se ilustra en la tabla II o en la tabla III. A este respecto, el experto en la técnica apreciará fácilmente que los polinucleótidos que codifican al menos un dominio variable de la cadena ligera y/o pesada pueden codificar el dominio variable de ambas cadenas de inmunoglobulina, o únicamente una. Por consiguiente, en una realización, el polinucleótido que comprende, consiste esencialmente en o consiste en un ácido nucleico que tiene una secuencia de polinucleótido de la región VH y VL del anticuerpo anti-IAPP y/o anti-proIAPP tal como se ilustra en la tabla II.

Tabla II: Secuencias de nucleótido de la región V_H y V_L de anticuerpos IAPP

Anticuerpo	Secuencias de nucleótido de cadenas pesada variable (V _H) y ligera variable (V _L /V _K)
NI-203.9A2-V _H	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGG TCCCTGAGGCTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACGTTTAGCACCTTT GCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTC TCAACTATTAGTGGTAGTGGTGATAATACATACTATGCAGACTCCCTG AAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACTATAT CTGCAAGTGAACAGCCTGAGACCCGAGGACACGGCCGTTTATTACTGT GCGAAAAGTCCCTCGTCACTTCTGGCCACCTACTTTGACTACTGGGGC CAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCCTCG SEQ ID NO: 11
NI-203.9A2 -V _K	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGA GACAGAGTCACCATCACTTGGCCGGGCCAGTGAGAGTATTAATAGCTGG TTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGGCCCTAAGCTCCTGATC TATAAGGCGTCTAGTTTACAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGC AGTGGATCTGGGACAGAATTCACCTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCT GATGATTTTGCACCTTATTACTGCCAACAGCACAATAGTTATTGGACG TTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA SEQ ID NO: 13
NI-203.19H8-V _H	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGACG TCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGGTTACCTTCAGCAGTTAT GGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTG GCAATTATATGGTATGATGGAAGTAAGGAATATTATGCAGACTCCCTG AAGGGCCGAGTCACCATCTCCAGAGACAATTCCGAGAACACTCTCTAT CTGCAACTGCACACCCTGAGAGTCGAGGACACGGCTGTGTATTTCTGT GCGAGGACAATCGCATCGGCCACCGTGGACCACGGTATGGACGTCTGG GGCCAAGGCACCCTGGTCACCGTCTCCTCG SEQ ID NO: 15
NI-203.19H8-V _K	GATGTTGTGATGACTCAGTCTCCTTCGTCCGTGTCTGCATCTGTAGGA GACAGAGTCACCATCACTTGTGCGGGCGAGTCACGATATTAGCACCTGG TTAGCCTGGTATCAGCAGAGACCAGGGAAAGCCCTAACCTCCTGATC TTTGGAGCATCGAGGTTGCAAAGTGGGGTCTCACCAAGGTTTCAGCGGC AGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCT GAAGATTTTGCACCTTACTATTGTCAACAGACTAACAAATTTCCCTCCC ACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAA SEQ ID NO: 17
NI-203.26C11-V _H	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGGCCAGGATTGGTGAAGCCTTCTCAG ACCCTGTCCCTCACCTGCAGTCTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGT AATTACTACTGGACCTGGATCCGGCAGCCCGCCGGGAAGGGACTGGAG TGGATTGGGCATATCTATTCCAGTGGGACCACCAATTACAACCCCTCC CTCGAGAGTCGAGTCACCATTTTCAGTAGACACGTCCAAGAACCTTC TCCCTGAGCCTGAACCTCTGTGACCGCCGCAGACACGGCCGTTTATTAC TGTGCGAGACCACTGGCTACAGTTCCGGATGCTTTTAATATCTGGGGC CAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCG SEQ ID NO: 19
NI-203.26C11-V _K	GAAATTGTGATGACTCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGC GAGAGGGCCACCATCAAGTGCAAGTCCAGCCAGAGTGTTTTATACAGC
	AATAAGAACTTCTTAGCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCT
	AAATTACTCATTTACTGGGCATCTACTCGGGAATCCGGGGTCCCTGAC CGATTCACTGGCAGCGGGTCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGC AGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAGTATTAT AGTAATCCTAACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGGTGGAGATCAAA SEQ ID NO: 21
NI-203.8E3-V _H	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAAGTGAAGAAACCTGGGTCC TCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGTAGTCAC ACTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCCCTGGGCAAGGGCTTGAGTGGATG GGAGGGATCATCCCCATCTTTGGTACAGCAAACCTACGCACAGAAGTTT CAGGACAGAGTCACGGTTACCGCGGACAAATCCACGAATACAGCCTAC ATGGAGTTGAGTAGCCTCAGACCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGT GCGAAGGGGGAACCTGGAACCACGAATCCTCTACTACTACGGTATGGAC GTCTGGGGCCGAGGGACACGGTCACCGTCTCCTCG SEQ ID NO: 23

NI-203.8E3-V _K	GATGTTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCCGTACCCCTTGGA CAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAAAGCCTCGTATACAGT GATGGAAACACCTACTTGAATTGGTTTCACCAGAGGCCAGGCCAATCT CCAAGGCGGCTAATTTATAAGGTTTCTAATCGTGACTCTGGGGTCCCA GACAGATTGAGCGGCAGTGGGTCAGGCACTGATTTACACTGAAAATC AGCAGGGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGCAAGGT TCAAATTGGCCAGGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA SEQ ID NO: 25
NI-203.11B12-V _H	CAGGTGCAGCTGGTGCATCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCC TCAATGAAGGTTTCCTGCAAGGCATCTGGATACACCTTCACCAACTAC TATTTACACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGACTTGAGTGGATG GGAATAATCAACCCTAGTGCTGGTAGCACAAGCTACGCACAGAAGTTC CAGGGCAGAGTCACCATGACCAGGGACACGTCCACGAGCACAGTCTAC ATGGAAGTGAAGCAGCCTGAAATCTGAAGACACGGCCGTCTATTACTGT GCGAGAGATTCCGCTGGGATACAGATATGGTTTCAGGGATGCTTTTGAT ATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTTCACCGTCTCTTCG SEQ ID NO: 27
NI-203.11B12-V _L	CAGCCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCTGCCTCTGCTTCCCTGGGATCC TCGGTCAAGCTCACCTGCACTCTGAACAGTGGGCACAGTAGCTACACC ATCGCATGGCATCAGCAGCAGCCAGGGAAGGCCCTCGGTACTTGATG AAGGTTGAACATAATGGAACTACAACAAGGGGAGCGGACTTCCTGAT CGCTTCTCAGGCTCCAGCTCTGGGGCTGACCGCTACCTCGCCATCTCC AACCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGAGACCTGGGAC ACTAGCACTAGGGTCTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA SEQ ID NO: 29
NI-203.19F2-V _H	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAGGAAGCCTGGGTCC TCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCAACTTCTTGAGCTAT TCCATCAGTTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATG GGAGGGATCATCCCGATCTTTGGTACACCAAACCTACGCACAGAAGTTC CAAGGAAGAGTCACAATTACGGCGGACAAATCGACGAGGACAGCCTAC ATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATTTGATGACACGGCCGTCTATTATTGT GCGGATGCGACAAGACCGGGTACAGCAGCCTCTGGTTTCTATTACTAC GGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCG SEQ ID NO: 63
NI-203.19F2 -V _K	GAAATTGTGATGACACAGTCTCCAGACACCCTGTCTGTGTCTCCAGGT GAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAACAACAAC TTAGCCTGGTTCCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATC TATGGTGCATCCACCAGGGCCACTGGTATTCCAGCCAGATTGAGTGGC
	AGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTACAGTCT GAAGATTTTGCAGTTTATTTCTGTGAGCAGAGTCACAATTGGCCCACT TTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAA SEQ ID NO: 65

5 10	NI-203.15C7-V_H GAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGATG TCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTACCTAT ACTATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTG TCATTTATATCATATGATGGAAGGGATAAATACTACGCAGATTCCGTG AAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACATGTTGTAT CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGATGAGGACATGGCTGTGTATTACTGT GCGACTCTGCAAGTATGGCAACTCTACGATTACTACGGAATGGACGTC TGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCG SEQ ID NO:67
15 20 25	NI-203.15C7-V_L CAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGCGGCCCCAGGACAG AAGGTCACCATCTCCTGCTCTGGAAGCAGCTCCAACATTGGGAATAAT TATGTATCTTGGTATCAGCAACTCCCAGGAACAGCCCCCAAACCTCCTC ATTTATAACAGTGATAAGCGACCCCTCAGGGATTCTTGACCGATTCTCT GCCTCCAAGTCTGGCACGTCAGCCACCCTGGGCATCACCGGGCTCCAG ACTGGGGACGAGGCCGATTATTACTGCGCAACATGGGATAACCAGACTG AGTGCTGGGGTATTCTGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTT SEQ ID NO:69

La presente invención incluye también fragmentos de los polinucleótidos de la presente invención, tal como se describe en otras partes de la presente invención. Además, los polinucleótidos que codifican los polinucleótidos de fusión fragmentos Fab y otros derivados tal como se describe en la presente invención, también están contemplados en la presente invención.

Los polinucleótidos pueden producirse o fabricarse a través de cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, si la secuencia de polinucleótido del anticuerpo es conocida, un polinucleótido que codifica el anticuerpo puede ser ensamblado a partir de oligonucleótidos químicamente sintetizados, por ejemplo, tal como se describe en la Publicación de Kutmeier *et al.*, BioTechniques 17 (1994), 242, la cual, brevemente, implica la síntesis de oligonucleótidos de traslape que contienen partes de la secuencia que codifica el anticuerpo, endurecimiento y ligado de dichos oligonucleótidos, y posteriormente amplificación de los oligonucleótidos ligados mediante PCR.

Alternativamente, un polinucleótido que codifica un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante, o derivado del mismo puede generarse a partir de ácido nucleico de una fuente adecuada. Si no está disponible un clon que contiene un ácido nucleico que codifica un anticuerpo particular, pero la secuencia de la molécula de anticuerpo es conocida, el ácido nucleico que codifica el anticuerpo puede ser químicamente sintetizado u obtenido de una fuente adecuada (por ejemplo, una biblioteca de cADN de anticuerpo, o una biblioteca de cADN generada de, o un ácido nucleico, preferentemente poliA⁺ ARN, aislado de, o cualquier tejido o células que expresan el anticuerpo específico de IAPP y/o prolAPP, tal como células de hibridoma seleccionadas para expresar un anticuerpo) mediante amplificación PCR utilizando cebadores sintéticos hibridizables para los extremos 3' y 5' de la secuencia o mediante clonación utilizando una sonda de oligonucleótido específica para la secuencia de gen particular a identificar, por ejemplo, un clon de ADNc de una biblioteca de cADN que codifica el anticuerpo. Los ácidos nucleicos amplificados generados mediante PCR, posteriormente pueden ser clonados en vectores de clonación replicables utilizando cualquier método conocido en la técnica.

Una vez que la secuencia de nucleótido y la secuencia de aminoácido correspondiente del anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo se determina, se puede manipular su secuencia de nucleótido utilizando métodos conocidos en la técnica para la manipulación de secuencias de nucleótido, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante, mutagénesis dirigida a sitio, PCR, etc. (ver por ejemplo las técnicas descritas en la Publicación de Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (Clonación Molecular, Manual de Laboratorio), 2° Edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990) y Ausubel *et al.*, eds., *Current Protocols in Molecular Biology* (Protocolos Actuales en Biología Molecular), John Wiley & Sons, NY (1998), para generar anticuerpos que tienen diferente secuencia de aminoácido, por ejemplo para crear sustituciones, eliminaciones y/o inserciones de aminoácido.

IV. Expresión de Polipéptidos de Anticuerpo

Después de la manipulación del material genético aislado para proporcionar anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variante o derivado del mismo de la presente invención, los polinucleótidos que codifican los anticuerpos normalmente se insertan en un vector de expresión para introducción en células huésped que pueden ser utilizadas para producir la cantidad deseada de anticuerpo. Se describe la expresión recombinante de un anticuerpo, o fragmento, derivado o análogo del mismo, por ejemplo, cadena pesada o ligera de un polinucleótido que enlaza a una molécula objetivo. Una vez que se ha obtenido un polinucleótido que codifica una molécula de anticuerpo o una cadena pesada o ligera de un anticuerpo, o parte del mismo (que contiene preferentemente el dominio variable de cadena pesada o ligera) de la invención, el vector para la producción de la molécula de anticuerpo puede ser producido mediante tecnología de ADN recombinante utilizando técnicas bien conocidas en el arte. Por lo tanto, los métodos para preparar una proteína que expresa un polinucleótido que contiene un anticuerpo que codifica una secuencia de nucleótido se describe en la presente invención. Los métodos que son bien conocidos para los expertos en la técnica se pueden utilizar para construir vectores de expresión que contienen secuencias de codificación de anticuerpo y señales de control de transcripción y traducción adecuados. Estos métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*. La presente invención, proporciona por lo tanto vectores replicables que comprenden una secuencia de nucleótido que codifica una molécula de anticuerpo de la presente invención, o una cadena pesada ligera o ligera del mismo, o un dominio variable de cadena pesada o ligera, enlazada en forma operable a un promotor. Dichos vectores pueden incluir la secuencia de nucleótido que codifica la región constante de la molécula de anticuerpo (ver por ejemplo las Solicitudes Internacionales WO 86/05807 y WO 89/01036; y la Patente de Estados Unidos No. 5,122,464) y el dominio variable del anticuerpo puede ser clonado en dicho vector para la expresión de toda la cadena pesada o ligera.

El término "vector" o "vector de expresión" se utiliza en la presente invención para significar vectores utilizados según la misma, como un vehículo para introducir y expresar un gen deseado en una célula huésped. Tal como lo saben los expertos en la técnica, dichos vectores pueden ser fácilmente seleccionados del grupo que consiste en plásmidos, fagos, virus y retrovirus. En general, los vectores compatibles con la presente invención comprenderán un marcador de selección, sitios de restricción adecuados para facilitar la clonación del gen deseado y la capacidad de ingresar y/o replicar en células eucarióticas o procarióticas. Para los propósitos de la presente invención, se pueden emplear numerosos sistemas de vector de expresión. Por ejemplo, una clase de vector utiliza elementos de ADN que son derivados de virus animales tal como virus de papiloma de bovino, virus de polioma, adenovirus, virus de vacuna, baculovirus, retrovirus (RSV, MMTV o MOMLV) o virus SV40. Otros implican el uso de sistemas policistrónicos con sitios de unión de ribosoma interno. Además, las células que tienen integrado el ADN en sus cromosomas pueden ser seleccionadas introduciendo uno o más marcadores que permiten la selección de células huésped transfectadas. El marcador puede proporcionar fototrofia para un huésped auxotrófico, resistencia a biocida (por ejemplo, antibióticos) o resistencia a metales pesados tal como cobre. El gen de marcador seleccionable puede ser ya sea enlazado directamente a las secuencias de ADN que serán expresadas, o introducidas en la misma célula mediante cotransformación. También pueden ser necesarios elementos adicionales para una síntesis óptima del mRNA. Estos elementos pueden incluir secuencias de señal, señales de división, así como promotores, aumentadores y señales de terminación de transcripción.

En realizaciones particularmente preferidas, los genes de región variable clonados se insertan en un vector de expresión junto con los genes de región constante de cadena pesada y ligera (preferentemente humano) tal como se describió anteriormente. En una realización, esto se logra utilizando un vector de expresión propietario de Biogen IDEC, Inc., referido como NEOSPLA, y descrito en la Patente de Estados Unidos No. 6,159,730. Este vector contiene el promotor/incrementador de citomegalovirus, el promotor mayor de beta globina de ratón, el origen de réplica SV40, la secuencia de poliadenilación de hormona de crecimiento de bovino, el exón 1 y exón 2 de fosfotransferasa de neomicina, el gen de reductasa de dihidrofolato y la secuencia líder. Este vector se ha descubierto que da como resultado un nivel de expresión de anticuerpos muy alto al momento de la incorporación de los genes de región variable constante, transfección en células CHO, seguido de selección en un medio que contiene G418 y amplificación de metotrexato. Por supuesto, se puede utilizar en la presente invención cualquier vector de expresión que tenga la capacidad de generar la expresión en células eucarióticas. Los ejemplos de vectores adecuados incluyen pero no se limitan a los plásmidos pcDNA3, pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEF1/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His, pVAX1 y pZeoSV2 (disponibles en Invitrogen, San Diego, CA), y el plásmido pCI (disponible en Promega, Madison, WI). En general, la clasificación en grandes números de células transformadas para los que expresan niveles adecuadamente altos de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, es experimentación de rutina que puede llevarse a cabo por ejemplo, mediante sistemas robóticos. Los sistemas de vector también se enseñan en las Patentes de Estados Unidos Nos. 5,736, 137 y 5,658,570. Este sistema proporciona altos niveles de expresión, por ejemplo, > 30 pg/célula/día. Se

describen otros sistemas de vector de ejemplo por ejemplo en la Patente de Estados Unidos No. 6,413,777.

En otras realizaciones preferidas, los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variante o derivado de los mismos de la presente invención pueden expresarse utilizando construcciones policistrónicas, tal como las descritas en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos No. 2003-0157641 A1. En estos sistemas de expresión, los productos de gen múltiple de interés, tal como las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos pueden producirse a partir de una construcción policistrónica simple. Estos sistemas utilizan convenientemente un sitio de entrada de ribosoma interno (IRES) para proporcionar niveles relativamente altos de anticuerpos. Las secuencias IRES compatibles se describen en la Patente de Estados Unidos No. 6,193,980. Los expertos en la técnica apreciarán que dichos sistemas de expresión pueden ser utilizados para producir efectivamente el rango total de anticuerpos descritos en la presente solicitud. Por consiguiente, en una realización, la presente invención proporciona un vector que comprende el polinucleótido que codifica al menos un dominio de unión o región variable de una cadena de inmunoglobulina del anticuerpo, opcionalmente en combinación con un polinucleótido que codifica la región variable de la otra cadena de inmunoglobulina de la molécula de unión.

Más generalmente, una vez que el vector o secuencia de ADN que codifica una subunidad monomérica del anticuerpo ha sido preparado, el vector de expresión puede ser introducido en una célula huésped adecuada. La introducción del plásmido en la célula huésped puede lograrse a través de varias técnicas conocidas para los expertos en el arte. Éstas incluyen pero no se limitan a, transfección incluyendo lipotransfección, que utiliza, por ejemplo, Eugene® o lipofectamina, fusión de protoplasto, precipitación de fosfato de calcio, fusión celular con ADN envuelto, microinyección e infección con virus intacto. Normalmente, la introducción de plásmido en el huésped es a través de un método de coprecipitación de fosfato de calcio estándar. Las células huésped que albergan la construcción de expresión se crecen bajo condiciones adecuadas para la producción de las cadenas ligeras y cadenas pesadas, y se ensayan para la síntesis de proteína de cadena pesada y/o ligeras. Las técnicas de ensayo de ejemplo incluyen ensayo inmunoabsorbente enlazado por enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), o análisis de clasificación celular activado por fluorescencia (FACS), inmunohistoquímica y similares.

El vector de expresión se transfecta para una célula huésped mediante técnicas convencionales, y posteriormente las células transfectadas se cultivan mediante técnicas convencionales para producir un anticuerpo para utilizarse en los métodos aquí descritos. Por lo tanto, la presente invención incluye células huésped que comprenden un polinucleótido que codifica un anticuerpo de la presente invención, o una cadena pesada o ligera del mismo, o al menos el dominio de unión o región variable de una inmunoglobulina del mismo, que se preferentemente se enlaza en forma operable a un promotor heterólogo. Además o en forma alternativa, la presente invención también incluye células huésped que comprenden un vector, tal como se define anteriormente, que comprende un polinucleótido que codifica al menos un dominio de unión o región variable de una cadena de inmunoglobulina del anticuerpo, opcionalmente en combinación con un polinucleótido que codifica la región variable de la otra cadena de inmunoglobulina de la molécula de unión. En realizaciones preferidas para la expresión de los anticuerpos de cadena doble, se puede coexpresar en la célula huésped un solo vector o vectores que codifican tanto las cadenas pesadas y ligeras, para la expresión de toda la molécula de inmunoglobulina, tal como se describe más adelante.

La célula huésped puede ser co-transfectada con dos vectores de expresión de la presente invención, el primer vector codificando un polipéptido derivado de cadena pesada y el segundo vector codificando un polipéptido derivado de cadena ligera. Los dos vectores pueden contener marcadores seleccionables idénticos que permiten una expresión equitativa de los polipéptidos de cadena pesada y ligera. Alternativamente, se puede utilizar un solo vector que codifica los polipéptidos tanto de cadena pesada como de cadena ligera. En dichas situaciones, la cadena ligera se coloca convenientemente antes de que la cadena pesada evite un exceso de cadena pesada libre de toxinas; ver las Publicaciones de Proudfoot, Nature 322 (1986), 52; Kohler, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 77 (1980), 2197. Las secuencias de codificación para las cadenas pesadas y ligeras pueden comprender cADN o ADN genómico.

Tal como se utiliza en la presente invención, las "células huésped" se refieren a células que albergan vectores contruidos utilizando técnicas de ADN recombinante, y que codifican al menos un gen heterólogo. En descripciones de los procesos para aislamiento de los anticuerpos de huéspedes recombinantes, los términos "célula" y "cultivo celular" se utilizan de manera intercambiable para denotar la fuente de anticuerpo a menos que se especifique claramente lo contrario. En otras palabras, la recuperación del polipéptido de las "células" puede significar ya sea de células completas centrifugadas, o del cultivo celular que contiene tanto el medio como las células suspendidas.

Se puede utilizar una variedad de sistemas de vector de expresión de huésped para expresar moléculas de anticuerpo para utilizarse en los métodos aquí descritos. Dichos sistemas de expresión de huésped representan vehículos mediante los cuales se pueden producir las secuencias de codificación de interés y subsecuentemente purificarse, aunque también

representan células que, cuando se transforman o transfectan con las secuencias de codificación del nucleótido adecuadas, pueden expresar una molécula de la presente invención *in situ*. Estos incluyen pero no se limitan a microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli*, *B. subtilis*) transformados con ADN de bacteriófago recombinante, o ADN de plásmido o vectores de expresión de ADN de cósmido que contienen secuencias de codificación de anticuerpo; levadura (por ejemplo, *Saccharomyces*, *Pichia* transformada con vectores de expresión de levadura recombinante que contienen secuencias de codificación de anticuerpo; sistemas de célula de insectos infectados con vectores de expresión de virus recombinante (por ejemplo, baculo virus) que contienen secuencias de codificación de anticuerpo; sistemas de célula de plantas infectados con vectores de expresión de virus recombinante (por ejemplo, virus de mosaico de coliflor, CaMV; virus de mosaico de tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión de plásmido recombinante (por ejemplo, plásmido Ti) que contiene secuencias que codifican anticuerpo; o sistemas de célula de mamífero (por ejemplo, células COS, CHO, BHK, HEK 293, NSO, y 3T3) que albergan construcciones de expresión recombinante que contienen promotores derivados del genoma de células de mamífero (por ejemplo, un promotor de metalotioneína) o de virus de mamífero (por ejemplo, promotor tardío de adenovirus; promotor de virus de vacuna 7.5K). Preferentemente, se utilizan células bacterianas tal como *Escherichia coli*, y más preferentemente, células eucarióticas, especialmente para la expresión de una molécula de anticuerpo recombinante completa, para la expresión de una molécula de anticuerpo recombinante. Por ejemplo, las células de mamífero tal como células de Ovario de Hámster Chino (CHO), junto con un vector tal como el elemento de promotor de gen temprano de intermediario mayor de citomegalovirus humano, es un sistema de expresión efectivo para anticuerpos; ver las Publicaciones de Foecking et al, Gene 45 (1986), 101; Cockett et al, Bio/Technology 8 (1990), 2.

La línea de célula huésped utilizada para la expresión de proteína es con frecuencia de origen de mamífero; los expertos en la técnica están acreditados con la capacidad de terminar preferentemente las líneas de célula huésped particulares que serán las más adecuadas para que el producto de gen deseado se exprese en las mismas. Las líneas de células huésped de ejemplo incluyen pero no se limitan a, CHO (Ovario de Hámster Chino), DG44 y DUXB11 (líneas de Ovario de Hámster Chino, DHFR menos), HELA (carcinoma cervical humano), CVI (línea de riñón de mono), COS (un derivado de CVI con antígeno SV40 T), VERY, BHK (riñón de hámster de bebe), MDCK, WI38, R1610 (fibroblasto de hámster Chino) BALBC/3T3 (fibroblasto de ratón), HAK (línea de riñón de hámster), SP2/0 (mieloma de ratón), P3x63-Ag3.653 (mieloma de ratón), BFA-1cBPT (células endoteliales de bobino), RAJI (linfocito humano) y células 293 (riñón humano). Las células CHO y 293 son particularmente preferidas. Las líneas de célula huésped normalmente están disponibles en Servicios comerciales, la Recolección de Cultivo de Tejido Americano o de literatura publicada.

Además, se puede elegir una cepa de célula huésped que modula la expresión de las secuencias insertadas, o modifica y procesa el producto de gen en la forma específica deseada. Dichas modificaciones (por ejemplo, glicosilación) y procesamiento (por ejemplo, disociación) de los productos de proteína puede ser importante para la función de proteína. Las células huésped diferentes tienen mecanismos características y específicos para el procesamiento de post-traducción y modificación de proteínas y productos genéticos. Las líneas de células adecuadas o sistemas huésped pueden ser elegidos para asegurar la modificación correcta y el procesamiento de la proteína extraña expresada. Para este fin, las células huésped eucarióticas que poseen la maquinaria celular para el procesamiento adecuado de la transcripción primaria, glicosilación, y fosforilación del producto de gen, pueden ser utilizadas.

Para una producción de rendimiento, a largo plazo de proteínas recombinantes, se prefiere la expresión estable. Por ejemplo, se pueden diseñar las líneas celulares que expresan establemente la molécula de anticuerpo. En lugar de utilizar vectores de expresión que contienen orígenes virales de réplica, las células huésped pueden ser transformadas con ADN controlado mediante elementos de control de expresión adecuados (por ejemplo, promotor, aumentador, secuencias, terminadores de transcripción, sitios de poliadenilación, etc.), y un marcador seleccionable. Después de la introducción del AND extraño, las células diseñadas pueden dejarse crecer durante 1 a 2 días en un medio enriquecido, y posteriormente cambiarse a un medio selectivo. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección, y confiere que las células integren en forma estable el plásmido en sus cromosomas y crezcan para formar centros a su vez pueda formarse y expandirse en las líneas celulares. Este método puede ser utilizado convenientemente para diseñar las líneas celulares que expresen la molécula de anticuerpo.

Se puede utilizar un número de sistemas de selección, incluyendo pero sin limitarse a los genes de cinasa de timidina de virus de herpes simple (Wigler et al, Cell 11 (1977), 223), fosforibosiltransferasa de hipoxantina-guanina (Szybalska & Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 48 (1992), 202), y la fosforibosiltransferasa de adenina (Lowy et al, Cell 22 (1980), 817) se pueden emplear en células tk-, hprt- o aprt-, respectivamente. Asimismo, se puede utilizar resistencia a anti-metabolito como la base de selección para los siguientes genes: dhfr, que confiere Resistencia a metotrexati (Wigler et al, Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 77 (1980), 357; O'Hare et al, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 78 (1981), 1527); gpt, que confiere resistencia a ácido micofenólico (Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 78 (1981), 2072); neo, que confiere resistencia a aminoglucósido G-418 Goldspiel et al, Clinical

Pharmacy 12 (1993), 488-505; Wu y Wu, Bioterapia 3 (1991), 87-95; Tolstoshev, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32 (1993), 573-596; Mulligan, Science 260 (1993), 926-932; y Morgan y Anderson, Ann. Rev. Biochem. 62 (1993), 191-217; TIB TECH 1 1 (1993), 155-215; y higo, que confiere resistencia a higromicina (Santerre et al, Gene 30 (1984), 147. Los métodos comúnmente conocidos en la técnica de ADN recombinante el cual puede ser utilizado se describe en las Publicaciones de Ausubel et al. (eds.), Protocolos Actuales en Biología Molecular, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegl, Transferencia de Expresión y Gen, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990); y en el capítulo 12 y 13, Dracopoli et al. (eds), Protocolos Actuales en Genéticas Humanos, John Wiley & Sons, NY (1994); Colberre-Garapin et al, J. Mol. Biol. 150: 1 (1981).

Los niveles de expresión de una molécula de anticuerpo pueden incrementarse mediante amplificación de vector, mediante revisión, consultar la Publicación de Bebbington y Hentschel, *The use of vectors with base on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in ADN cloning* (El uso de vectores con base en amplificación genética para la expresión de genes clonados en células de mamífero en clonación de ADN), Academic Press, Nueva York, Vol. 3. (1987). Cuando un marcador en el sistema de vectores que expresa el anticuerpo es amplificable, el incremento en el nivel del inhibidor del cultivo en célula huésped incrementar el número de copias en el gen marcador. Ya que la región de amplificación está asociada con el gen de anticuerpo, la producción del anticuerpo también incrementará; ver la Publicación de Crouse et al, Mol. Cell. Biol. 3 (1983), 257. Las producciones *in vitro* permiten el escalado para proporcionar grandes cantidades de polipéptidos deseados. Las técnicas para cultivo de célula de mamífero bajo condiciones de tejido de cultivo son conocidas en la técnica en incluyen e incluyen cultivos de suspensión homogénea, por ejemplo, en un reactor de elevación de aire o en un reactor de agitador continuo, o en un cultivo celular inmovilizado o atrapado, por ejemplo, en fibras huecas, microcápsulas, en microcuentas de agarosa o cartuchos de cerámica. Si es necesario y/o deseado las soluciones de polipéptidos pueden ser purificadas mediante métodos de cromatografía acostumbrados, por ejemplo, filtración de gen, cromatografía de intercambio de iones, cromatografía en DEAE-celulosa o cromatografía de (inmuno-) afinidad, por ejemplo, después de la biosíntesis preferencial de un polipéptido de región de articulación sintética o antes o después del paso de cromatografía HIC aquí descrito.

Los genes que codifican anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno o variantes o derivados del mismo en la presente invención también se pueden expresar en células no mamíferas tal como células de bacterias o insectos o levaduras o plantas. Las bacterias que captan fácilmente los ácidos nucleicos, incluyen miembros de enterobacteriaceae, tal como las cepas de *Escherichia coli* o *Salmonella*; *Bacillaceae*, tal como *Bacillus subtilis*; *Pneumococcus*; *Streptococcus*, y *Haemophilus influenzae*. Se podrá apreciar en forma adicional que, cuando se expresan en bacterias, los polipéptidos heterólogos normalmente se vuelven partes de la inclusión. Los polipéptidos heterólogos deben ser aislados, purificados y posteriormente ensamblados por moléculas funcionales. Cuando se desean formas tetravalentes de los anticuerpos, las subunidades posteriormente se autoensamblaran en los anticuerpos tetravalentes; ver por ejemplo la Solicitud Internacional WO02/096948.

En sistemas bacterianos, se pueden seleccionar en forma conveniente un número de vectores de expresión dependiendo del uso proyectado para la molécula de anticuerpo que está siendo expresada. Por ejemplo, cuando se producirá una gran cantidad de dicha proteína, para la generación de composiciones farmacéuticas de una molécula de anticuerpo, pueden ser deseables vectores que dirigen la expresión de altos niveles de productos de proteína de fusión que son fácilmente purificados. Dichos vectores incluyen pero no se limitan al vector de expresión *E. coli* pUR278 (Ruter et al, EMBO J. 2 (1983), 1791), en donde la secuencia de codificación de anticuerpo que puede ser ligada individualmente en el vector en la estructura con la región de codificación lacZ de modo que se produzca la proteína de fusión; vectores pIN (Inouye & Inouye, Nucleic Acids Res. 13 (1985), 3101-3109; Van Heeke & Schuster, J. Biol. Chem. 24 (1989), 5503-5509); y similares. Los vectores pGEX también pueden ser utilizados para expresar polipéptidos extraños, proteínas de fusión con S-transferasa de glutatona (GST). En general, dichas proteínas de fusión son solubles y pueden ser fácilmente purificadas a partir de células lisadas mediante absorción y unión a una matriz de cuentas de glutatona-agarosa seguido de la elución en la presencia de glutatona libre. Los vectores pGEX están diseñados para incluir sitios de disociación de trombina o proteasa factor Xa de modo que el producto de gen objetivo clonado puede ser liberado de la porción GST.

Además de los procariotes, también se pueden utilizar microbios eucarióticos. *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura de harina común, es el más comúnmente utilizado entre los microorganismos eucarióticos, aunque están comúnmente disponibles un número de otras cepas, por ejemplo, *Pichia pastoris*. Para la expresión en *Saccharomyces*, el plásmido YRp7, por ejemplo, (Stpulgadacomb et al, Nature 282 (1979), 39; Kingsman et al, Gene 7 (1979), 141; Tschempor et al, Gene 10 (1980), 157) es comúnmente utilizado. Este plásmido ya contiene el gen TRP1 que proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que tiene la capacidad de crecer en triptofan, por ejemplo ATCC No. 44076 o PEP4-1 (Jones, Genetics 85 (1977), 12). La presencia de la lesión trp1 es como una característica del genoma

de célula huésped de levadura posteriormente proporciona un ambiente efectivo para detectar la transformación mediante el crecimiento en la ausencia del triptofan.

En un sistema de insectos, el virus de polihedrosis nuclear *Autographa californica* (AcNPV) es normalmente utilizado como un vector para expresar genes extraños. El virus crece en células *Spodoptera frugiperda*. El anticuerpo que codifica la secuencia puede ser clonado individualmente en regiones no esenciales (por ejemplo el gen de polihedrina) del virus y colocarse bajo el control del promotor AcNPV (por ejemplo el promotor de polihedrina).

Una vez que una molécula de anticuerpo de la presente invención ha sido expresada en forma recombinante, los anticuerpos completos, sus dímeros, cadenas pesadas o ligeras e individuales, u otras formas de inmunoglobulina de la presente invención pueden ser purificadas según procedimientos estándar en la técnica, incluyendo por ejemplo, mediante cromatografía (por ejemplo, intercambio de iones de afinidad particularmente mediante afinidad para el antígeno específico después de la Proteína A, y cromatografía de diseño de columna), centrifugación, solubilidad diferencial, por ejemplo, precipitación de sulfato de amonio, o mediante otras técnicas estándar para la purificación de proteínas; ver la Publicación de Scopes, "Purificación de Proteína", Springer Verlag, N.Y. (1982). Alternativamente, un método preferido para incrementar la afinidad de los anticuerpos de la presente invención, se describen en la Publicación de Patente de Estados Unidos No. 2002-0123057 A1. Por lo tanto, la presente invención también proporciona un método para preparar un anticuerpo anti-IAPP o anti-proIAPP, o una cadena(s) de inmunoglobulina del mismo, en donde el método comprende:

(a) cultivar la célula huésped tal como se definió anteriormente, en donde la célula comprende un polinucleótido o un vector tal como se definió anteriormente; y

(b) aislar el anticuerpo o cadena(s) de inmunoglobulina del mismo a partir del cultivo.

Además, en una realización, la presente invención también se refiere a un anticuerpo o cadena(s) de inmunoglobulina del mismo codificada por un polinucleótido tal como se definió anteriormente o que se puede obtener a través de un método para preparar un anticuerpo anti-IAPP o un anticuerpo anti-proIAPP o cadena(s) de inmunoglobulina del mismo.

V. Proteínas de Fusión y Conjugados

En ciertas realizaciones, el polipéptido de anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos o una o más porciones no normalmente asociadas con un anticuerpo. Las modificaciones de ejemplo se describen con mayor detalle más adelante. Por ejemplo, un fragmento de anticuerpo de cadena simple Fv de la presente invención puede comprender una secuencia enlazada flexible, o puede ser modificada para agregar una porción funcional (por ejemplo, PEG, un fármaco, una toxina, o una etiqueta tal como fluorescente, radioactiva, enzima, magnética nuclear, de metal pesado y similar).

Un polipéptido de anticuerpo de la presente invención puede comprender, consistir esencialmente de o consistir en una proteína de fusión. La proteína de fusión son moléculas quiméricas que comprende, por ejemplo, un dominio de unión a IAPP y/o proIAPP de inmunoglobulina con al menos un sitio de unión objetivo, y al menos una parte heteróloga, es decir, una parte con la cual no está enlazada naturalmente de origen. Las secuencias de aminoácidos pueden existir normalmente en proteínas separadas que se llevan juntas en el polipéptido de fusión o pueden existir normalmente en la misma proteína, pero se colocan en una nueva formación en el polipéptido de fusión. Las proteínas de fusión pueden ser creadas, por ejemplo, mediante síntesis química o creando y traduciendo un polinucleótido en donde las regiones de péptido se codifican en la relación deseada.

El término "heterólogo" tal como se aplica a un polinucleótido o polipéptido, significa que el polinucleótido o polipéptido se deriva de una entidad distinta a la del resto de la entidad con la cual ese está comparando. Por ejemplo, tal como aquí se utiliza, un "polipéptido heterólogo" que será fusionado a un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno, variante, o análogo del mismo se deriva de un polipéptido de no inmunoglobulina de la misma especie, o un polipéptido de no inmunoglobulina o no inmunoglobulina de una diferente especie.

Tal como se describió con mayor detalle en la presente invención, los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes, o derivados de los mismos de la presente invención pueden ser fusionados en forma recombinante a un polipéptido heterólogo en el N- o C-término o conjugados en forma química (incluyendo conjugaciones equivalentes y no covalentes) a polipéptidos u otras composiciones. Por ejemplo, los anticuerpos pueden ser fusionados o conjugados en forma recombinante a moléculas útiles como etiquetas en ensayos de detección y moléculas efectores tal como heterólogos polipéptido, fármacos, radionúclidos, o toxinas; ver, por ejemplo, las solicitudes internacionales WO92/08495; W091/14438; W089/12624; Patente de Estados Unidos No. 5,314,995; y solicitud de patente Europea EP 0 396 387.

Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno, variantes, o derivados de los mismos de la presente invención pueden estar compuestos de los aminoácidos unidos entre sí y mediante uniones de péptido o uniones de péptido modificados, es decir, isómeros de péptido, y pueden contener aminoácidos además de los 20 aminoácidos codificados por gen. Los anticuerpos pueden ser modificados mediante procesos naturales, tal como procesamiento postraduccion o mediante técnicas de modificación químicas son bien conocidas en el arte. Dichas modificaciones están bien descritas en textos básicos y en monografías más detalladas, así como en literatura de investigación voluminosa. Las modificaciones pueden surgir en cualquier parte en el anticuerpo, incluyendo el esqueleto de péptido, las cadenas laterales de aminoácidos y el término amino o carboxi o en porciones tales como carbohidratos. Se podrá apreciar que el mismo tipo de modificación puede estar presente en el mismo o diversos grados en diversos sitios en un anticuerpo determinado. Asimismo, el anticuerpo determinado puede contener muchos tipos de modificaciones. Los anticuerpos pueden ser ramificados, por ejemplo, como resultado de ubiquitinación que pueden ser cíclicos, con o sin ramificación. Los anticuerpos cíclicos, ramificados y cíclicos ramificados pueden resultar de procesos naturales postraduccion o pueden elaborarse a través de métodos sintéticos. Las modificaciones incluyen acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, adhesión covalente de flavina, adhesión covalente de la porción heme, adhesión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, adhesión covalente de un lípido o derivado de lípido, adhesión covalente de fosfatidilinositol, reticulación, ciclado, formación de unión de disulfuro, desmetilación, formación de reticulaciones covalentes, formación de cisteína, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, glucosilación, formación de ancla GPI, hidroxilación, yodinación, metilación, miristoilación, oxidación, pegilación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfatación, adición transmitida por transferencia de ARN de aminoácidos a proteínas tal como arginilación, y ubiquitinación; ver, por ejemplo, la Publicación de Proteins - Structure And Molecular Properties (Proteínas-Estructura y Propiedades Moleculares), T. E. Creighton, W. H. Freeman y Company, Nueva York 2° Ed., (1993); Posttranslational Covalent 5 Modificación Of Proteins (Modificación Covalente de Proteínas Postraduccion), B. C. Johnson, Ed., Academic Press, Nueva York, páginas. 1-12 (1983); Seifter et al, Met. Enzymol. 182 (1990), 626-646; Rattan et al, Ann. NY Acad. Sci. 663 (1992), 48-62).

La presente invención también proporciona proteínas de fusión que comprenden un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, y un polipéptido heterólogo. En otra realización, una proteína de fusión comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácido de al menos una región V_H de un anticuerpo de la presente invención, y la secuencia de aminoácido de al menos una región V_L de un anticuerpo de la presente invención o fragmentos, derivados o variantes del mismo, y una secuencia de polipéptido heteróloga. Preferentemente, las regiones V_H y V_L de la proteína de fusión corresponden a un anticuerpo de fuente simple (o fragmento scFv o Fab) que enlaza específicamente IAPP y/o proIAPP. Aún en otra realización, una proteína de fusión para utilizarse en los métodos de diagnóstico y tratamiento aquí descritos comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácido de cualquiera de una, dos o tres o más de V_H CDRs de un anticuerpo, y la secuencia de aminoácido de cualquiera de una, dos o tres o más de V_L CDRs de un anticuerpo, o fragmentos o variantes de los mismos, y una secuencia de polipéptido heteróloga. Preferentemente, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más de las V_H-CDR(S) o V_L-CDR(S) corresponden a un anticuerpo de una sola fuente (o fragmento scFv o Fab) de la presente invención. Las moléculas de ácido nucleico codifican las proteínas de fusión también están comprendidas por la presente invención.

Las proteínas de fusión de ejemplo reportadas en la literatura incluyen fusiones del receptor de célula T (Gascoigne et al, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 84 (1987), 2936-2940; CD4 (Capon et al, Nature 337 (1989), 525-531; Traunecker et al, Nature 339 (1989), 68-70; Zettmeissl et al, ADN Cell Biol. Estados Unidos 9 (1990), 347-353; y Byrn et al, Nature 344 (1990), 667-670); L-selectina (receptor local) (Watson et al, J. Cell. Biol. 1 10 (1990), 2221-2229; y Watson et al, Nature 349 (1991), 164-167); CD44 (Aruffo et al, Cell 61 (1990), 1303-1313); CD28 y B7 (Linsley et al, J. Exp. Med. 173 (1991), 721-730); CTLA-4 (Lisley et al, J. Exp. Med. 174 (1991), 561-569); CD22 (Stamenkovic et al, Cell 66 (1991), 1133-1144); receptor TNF (Ashkenazi et al, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 88 (1991), 10535-10539; Lesslauer et al, Eur. J. Immunol. 27 (1991), 2883-2886; y Peppel et al, J. Exp. Med. 174 (1991), 1483-1489 (1991); y receptor IgE (Ridgway y Gorman, J. Cell. Biol. 1 15 (1991), Extracto No. 1448).

Tal como se describe en cualquier parte en la presente invención, los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes, o derivados de los mismos de la presente invención se pueden fusionar a polipéptidos heterólogos para incrementar la vida media *in vivo* de los polipéptidos o para utilizarse en inmunoensayos utilizando métodos conocidos en el arte. Por ejemplo, en una realización, el PEG puede ser conjugado por los anticuerpos de la presente invención para incrementar su vida media *in vivo*; ver, por ejemplo, la Publicación de Leong et al, Cytokine 16 (2001), 106-119; Adv. in Drug Deliv. Rev. 54 (2002), 531; o Weir et al, Biochem. Soc. Transacciones 30 (2002), 512.

Además, los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes, o derivados de los mismos de la presente invención se pueden fusionar a secuencias marcadoras, tal como un péptido para facilitar su purificación o detección. En realizaciones preferidas, la secuencia de aminoácido marcadora es un péptido de hexa-histidina (HIS), tal como la tag

proporcionada en el vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, Calif, 91311), entre otros, muchos de los cuales están comercialmente disponibles. Tal como se describe en la Publicación de Gentz et al, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 86 (1989), 821-824, por ejemplo, la hexa-histidina proporciona purificación conveniente para la proteína de fusión. Otras etiquetas de péptido útiles para purificación incluyen, pero no se limitan a la etiqueta "HA", que corresponde a un epítipo derivado de la proteína de hemaglutinina de influenza (Wilson et al, Cell 37 (1984), 767), GST, c-mycand la etiqueta "flag"; ver la Publicación de Bill Brizzard, BioTechniques 44 (2008) 693-695 para una revisión de las técnicas de etiquetado de epítipo, y la tabla en la página 694 en dicho documento que describe las etiquetas de epítipos más comunes utilizables en la presente invención.

Las proteínas de fusión pueden prepararse utilizando métodos bien conocidos en la técnica; ver por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Nos. 5,116,964 y 5,225,538. El sitio preciso en el cual se realiza la fusión puede ser relacionado en forma empírica para optimizar la secreción o características de unión de la proteína de fusión. El ADN que codifica la proteína de fusión posteriormente se transfecta en una célula huésped para expresión, que se lleva a cabo tal como se describe anteriormente.

Los anticuerpos de la presente invención pueden ser utilizados en una forma no conjugada o pueden ser conjugados para al menos una de una variedad de moléculas, por ejemplo, para mejorar las propiedades terapéuticas de la molécula, para facilitar la detección objetivo, o para generar imágenes o terapia del paciente. Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno, variantes, o derivados de los mismos de la presente invención pueden ser etiquetados o conjugados ya sea antes o después de la purificación, cuando se lleva a cabo la purificación. En particular, los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes, o derivados de los mismos de la presente invención pueden conjugarse para agentes terapéuticos, profármacos, péptidos, proteínas, enzimas, virus, lípidos, modificadores de respuesta biológica, agentes farmacéuticos, o PEG.

Los conjugados que son inmunotoxinas que incluyen anticuerpos convencionales han sido ampliamente descritos en la técnica. Las toxinas pueden acoplarse a los anticuerpos a través de técnicas de acoplamiento convencionales o inmunotoxinas que contienen partes de toxina de proteína pueden producirse como proteínas de fusión. Los anticuerpos de la presente invención pueden ser utilizados en una forma correspondiente para obtener dichas inmunotoxinas. Ilustrativo de dichas inmunotoxinas son descritas por Byers, Seminars Cell. Biol. 2 (1991), 59-70 y por Fanger, Immunol. Today 12 (1991), 51-54.

Los expertos en la técnica apreciarán que los conjugados también pueden ser ensamblados utilizando una variedad de técnicas dependiendo del agente seleccionado que será conjugado. Por ejemplo, los conjugados con biotina se preparan, por ejemplo, haciendo reaccionar un polipéptido de unión a IAPP y/o proIAPP con un éster de biotina activado, tal como el éster de N-hidroxisuccinimida de biotina. Similarmente, los conjugados con un marcador fluorescente puede prepararse en la presencia de un agente de acoplamiento, por ejemplo, los aquí descritos, o mediante reacción con un isotiocianato, preferentemente fluoresceínas-isotiocianato. Los conjugados de los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la presente invención, se preparan en una forma análoga.

La presente invención comprende además anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes, o derivados de los mismos de la presente invención conjugados para un agente de diagnóstico o terapéutico. Los anticuerpos pueden ser utilizados para diagnóstico, por ejemplo, para demostrar la presencia de una enfermedad metabólica, por ejemplo, T2D para indicar el riesgo de obtener una enfermedad metabólica para monitorear el desarrollo o progreso de una enfermedad metabólica, es decir, una enfermedad que muestra el surgimiento de, o que se relacionada con IAPP y/o proIAPP agregado como parte de un procedimiento de pruebas clínicas para, por ejemplo, determinar la eficacia de un régimen de tratamiento y/o prevención determinado. En una realización por lo tanto, la presente invención se refiere a un anticuerpo, que se etiqueta en forma detectable. Además, en una realización, la presente invención se refiere a un anticuerpo, que se adhiere a un fármaco. La detección puede ser facilitada mediante el acoplamiento del anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante, o derivado del mismo a una sustancia detectable. Las sustancias detectables o etiquetas pueden ser en general una enzima; un metal pesado, preferentemente oro; una tinta; preferentemente una tinta fluorescente o luminiscente; o una etiqueta radioactiva. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen varias enzimas, grupos protésicos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, materiales radioactivos, metales de emisión de positrones utilizando diversas tomografías de emisión de epositrones y iones de metal paramagnéticos no radioactivos. Ver por ejemplo, la Patente de Estados Unidos No. 4,741,900 para iones de metal que pueden ser conjugados por anticuerpos para utilizarse como diagnósticos según la presente invención. los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, o acetilcolinesterasa; los ejemplos de complejos de grupos protésicos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; los ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, fluoresceína de diclorotriazinilamina, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; los ejemplos

de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina, y aequorina; y los ejemplos de material radioactivo adecuado incluyen ^{125}I , ^{131}T , ^{111}In o ^{99}Tc . Por consiguiente, en una realización la presente invención proporciona un anticuerpo etiquetado en forma detectable, en donde la etiqueta detectable se selecciona del grupo que consiste en una enzima, un radioisotopo, un fluoroforo y un metal pesado.

Un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante, o derivado del mismo también puede ser etiquetado en forma detectable acoplándolo a un compuesto quimioluminiscente. La presencia del anticuerpo etiquetado en forma quimioluminiscente posteriormente se determina detectando la presencia que surge durante el curso de una reacción química. Los ejemplos de compuestos de etiquetado quimioluminiscente particularmente útiles son luminol, isoluminol, éster de acridinio teromático, imidazol, sal de acridinio y éster de oxalato.

Una de las formas en las cuales un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo puede ser etiquetado en forma detectable enlazando al mismo en una enzima y utilizando el producto enlazado en un inmunoensayo de enzimas (EIA) (Voller, A., "The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)" (Emsayo Inmunoabsorbente Enlazado por Enzimas (ELISA)) Microbiological Associates Quarterly Publicación, Walkersville, Md., Diagnostic Horizons 2 (1978), 1-7; Voller et al, J. Clin. Patol. 31 (1978), 507-520; Butler, Met. Enzymol. 73 (1981), 482-523; Maggio, E. (ed.), Enzyme Immunoassay, CRC Press, Boca Raton, Fla., (1980); Ishikawa, E. et al, (eds.), Enzyme Immunoassay, Kaku Shoin, Tokyo (1981). La enzima, la cual se enlaza al anticuerpo, reaccionará con un sustrato adecuado, preferentemente un sustrato cromogénico, de tal forma que produzca una porción química que puede ser detectada, por ejemplo, mediante medios espectrofotométricos, fluorimétricos o visuales. Las enzimas que pueden ser utilizadas para etiquetar en forma detectable el anticuerpo incluyen pero no se limitan a, dehidrogenasa de malato, nucleasa estafilococal, isomerasa de delta-5-esteroide, dehidrogenasa de alcohol de levadura, alfa-glicerofosfato, dehidrogenasa, isomerasa de fosfato de triosa, peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalinas, asparaginasa, oxidasa de glucosa, beta-galactosidasa, ribonucleasa, ureasa, catalasa, dehidrogenasa de glucosa-6-fosfato, glucoamilasa y acetilcolinesterasa. Además, la detección puede lograrse a través de métodos colorimétricos que emplean un sustrato cromogénico para la enzima. La detección también puede lograrse a través de comparación visual del grado de reacción enzimática de un sustrato en comparación con estándares preparados similarmente.

La detección también se puede lograr utilizando una variedad de otros inmunoensayos. Por ejemplo, mediante etiquetado radioactivo del anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo, es posible detectar el anticuerpo a través del uso de radioinmunoensayo (RIA) (ver, por ejemplo, la Publicación de Weintraub, B., *Principles of Radioimmunoassays, Sevent Training Course on Radioligand Assay Techniques* (Principios de Radioinmunoensayos, Séptimo Curso de Capacitación en Técnicas de Ensayo de Radioligando), The Endocrine Society, (Marzo, 1986)). El isotopo radioactivo puede ser detectado por medios que incluyen pero no se limitan a, un contador gamma, un contador de centelleo, o autoradiografía.

Un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo también puede ser etiquetado en forma detectable utilizando metales que emiten fluorescencia tal como ^{152}Eu , u otras series de lantánida. Estos metales pueden ser adheridos al anticuerpo utilizando grupos de quelación de metal como ácido dietilenotriaminapentacético (DTP A) o ácido etilenodiaminatetraacético (EDTA).

Las técnicas para conjugación de varias porciones para un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo son bien conocidas. Ver por ejemplo, las Publicaciones de Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy" (Anticuerpos Monoclonales para Inmunodirección de Fármacos en Terapia de Cáncer), en *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy* (Anticuerpos Monoclonales y Terapia de Cáncer), Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. (1985); Hellstrom et al, "Antibodies For Drug Delivery" (Anticuerpos para Suministro de Fármacos), en *Controlled Drug Delivery* (Suministro de Fármaco Controlado) (2° Ed.), Robinson et al. (eds.), Marcel Dekker, Inc., pp. 623-53 (1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review (Portadores de Anticuerpo de Agente Citotóxicos en Terapia de Cáncer: Una revisión), en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications* (Anticuerpos Monoclonales '84: Aplicaciones Biológicas y Clínicas, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy" (Análisis, Resultados y Futuros Prospectos del Uso Terapéutico de un Anticuerpo Radioetiquetado en Terapia de Cáncer), en *Monoclonal Antibodies For Cancer Detección And Therapy* (Anticuerpos Monoclonales para la Detección y Terapia de Cáncer), Baldwin et al. (eds.), Academic Press pp. 303-16 (1985), y Thorpe et al, "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates" (Preparación y Propiedades Citotóxicas de Conjugados de Anticuerpo-Toxina), Immunol. Rev. 62 (1982), 119-158.

Tal como se mencionó, en ciertas realizaciones, una porción que incrementa la estabilidad o eficacia de una molécula de unión, por ejemplo, un polipéptido de unión, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento inmuno-específico del mismo pueden

ser conjugados. Por ejemplo, en una realización, el PEG puede ser conjugado para las moléculas de unión de la presente invención para incrementar su vida media *in vivo*. Leong et al., Cytokine 16 (2001), 106; Adv. in Drug Deliv. Rev. 54 (2002), 531; o Weir et al., Biochem. Soc. Transactions 30 (2002), 512.

5 VI. Composiciones y Métodos de Uso

La presente invención se refiere a composiciones que comprende la molécula de unión a IAPP y/o proIAPP antes mencionado, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de los mismos de la presente invención o un derivado o variante del mismo, o el polinucleótido, vector o célula de la presente invención tal como se definió anteriormente. En una realización, la composición de la presente invención es una composición farmacéutica y comprende además un portador farmacéuticamente aceptable. Además, la composición farmacéutica de la presente invención puede comprender agentes adicionales tal como interleucinas o interferones dependiendo del uso proyectado de la composición farmacéutica. Para utilizarse en el tratamiento de una enfermedad metabólica que muestra el surgimiento de, o se relaciona con IAPP y/o proIAPP agregado, por ejemplo, de T2D, se puede seleccionar un agente adicional del grupo que consiste en moléculas orgánicas pequeñas, anticuerpos anti-IAPP y/o anti-proIAPP, y combinaciones de los mismos. Por lo tanto, la presente invención se refiere al uso de la molécula de unión a IAPP y/o proIAPP, por ejemplo, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, el polinucleótido, el vector o la célula de la presente invención para la preparación de una composición farmacéutica o de diagnóstico para tratamiento profiláctico y terapéutico de una enfermedad metabólica, monitoreando el progreso de una enfermedad metabólica o de una respuesta a un tratamiento de una enfermedad metabólica en un sujeto o para determinar el riesgo que tiene el sujeto de desarrollar una enfermedad metabólica.

La presente solicitud describe un método para tratar una enfermedad metabólica caracterizada por la acumulación y/o deposición anormal de IAPP y/o proIAPP en islotes de Langerhans, en donde el método comprende administrar a un sujeto que necesita del mismo una cantidad terapéuticamente efectiva de cualquiera de las moléculas de unión, anticuerpos, polinucleótidos, vectores o células IAPP y/o proIAPP antes descritas de la presente invención. El término "trastorno metabólico" incluye pero no se limita al grupo de trastornos generalmente caracterizados por síntomas tal como cambios metabólicos que preceden, originan y/o están conectados/asociados con, o están ligados a enfermedades que comprenden T2D, que originan daño al páncreas y por consiguiente pueden conducir a diabetes comprendiendo pancreatitis crónica, fibrosis quística, cáncer pancreático; en enfermedades que incrementan el riesgo de T2D que comprende enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington; en enfermedades cardiovasculares enlazadas o no con obesidad de T2D; y/o a la propia T2D.

Una ventaja particular del método terapéutico se encuentra en el hecho de que los anticuerpos de la presente invención se derivan de células B o células de memoria B de sujetos humanos saludables sin signos de una enfermedad que muestran el surgimiento de o están relacionados con IAPP y/o proIAPP agregado, tal como tal como T2D y por lo tanto, con una cierta probabilidad, tiene la capacidad de prevenir una enfermedad de manifestación clínica relacionada con IAPP y/o proIAPP agregado, o de disminuir el riesgo de surgimiento de la enfermedad clínicamente manifestada o de retardar la generación o progreso de la enfermedad clínicamente manifestada. Normalmente, los anticuerpos de la presente invención también ya han pasado exitosamente a través de maduración somática, es decir, la optimización con respecto a la selectividad y efectividad en una unión de alta afinidad a la molécula IAPP y/o proIAPP objetivo por medio de una variación somática de las regiones variables del anticuerpo.

El conocimiento de que dichas células *in vivo*, por ejemplo, en un humano, no han sido activadas por medio de proteínas fisiológicas relacionadas u otras, o estructuras celulares en el sentido de una reacción autoinmunitaria o alérgica, también es de gran importancia médica, ya que esto significa una oportunidad considerablemente incrementada de vida exitosa a través de las fases de prueba clínica. Por decir algo, la eficiencia, capacidad, aceptación y tolerancia que han sido demostradas antes del desarrollo preclínico y clínico del anticuerpo profiláctico o terapéutico en al menos un sujeto humano. Por lo tanto, se puede esperar que los anticuerpos anti-IAPP y/o anti-proIAPP humanos de la presente invención, tanto su eficiencia específica de estructura objetivo como el agente terapéutico y su probabilidad disminuida de efectos secundarios, incrementen significativamente su probabilidad de éxito clínica.

La presente invención también proporciona un paquete o equipo farmacéutico o de diagnóstico, respectivamente que comprende uno o más contenedores llenos con uno o más de los ingredientes antes descritos, por ejemplo, el anticuerpo anti-IAPP y/o anti-proIAPP, fragmento de unión, derivado o variante del mismo, un polinucleótido, vector o célula de la presente invención. Asociado con dicho contenedor(s) puede ser un aviso en la forma descrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso y ventas de fármacos o productos biológicos, en donde el aviso refleja la aprobación por parte de la agencia en cuanto a la fabricación, uso o ventas para administración humana. En forma adicional o alternativa, el equipo comprende reactivos y/o instrucciones para utilizarse en ensayos de diagnóstico

adecuados. Por supuesto la composición, por ejemplo, el equipo de la presente invención es particularmente adecuado para la evaluación de riesgo diagnóstico, prevención y tratamiento de un trastorno que está acompañado con la presencia de IAPP y/o proIAPP agregado, y en particular puede aplicar al tratamiento de trastornos generalmente caracterizados por síntomas tal como cambios metabólicos que preceden, originan y/o están conectados/asociados con, o enlazados a T2D, que comprende enfermedades que originan daño al páncreas y por consiguiente pueden conducir a diabetes que comprende pancreatitis crónica, fibrosis quística, cáncer pancreático; en enfermedades que incrementan el riesgo de T2D comprende enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington; en enfermedades cardiovasculares enlazadas o no con obesidad y T2D; y/o la propia T2D, por ejemplo.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden ser formuladas según métodos bien conocidos en la técnica; ver por ejemplo la Publicación de Remington: The Science and Practice of Pharmacy (Ciencia y Práctica de Farmacia) (2000) de la Universidad de Ciencias en Filadelfia, ISBN 0-683-306472. Los ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen soluciones salinas amortiguadas por fosfato, agua, tal como emulsiones de aceite/agua, varios tipos de agentes de humectación, soluciones estériles, etc. Las composiciones que comprenden dichos portadores pueden ser formuladas a través de métodos convencionales bien conocidos. Estas composiciones farmacéuticas pueden administrarse al sujeto en cualquier dosis adecuada. La administración de composiciones adecuadas puede llevarse a cabo a través de diferentes formas, por ejemplo, mediante administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, intranasal, tópica o intradérmica o suministro espinal o al cerebro. Las formulaciones de aerosol, tal como formulaciones de rocío nasal incluyen soluciones acuosas purificadas u otras soluciones del agente activo con agentes conservadores y agentes isotónicos. Dichas formulaciones se ajustan preferentemente al pH y al estado isotónico compatible con las membranas mucosas nasales. Las formulaciones de administración rectal o vaginal pueden presentarse en forma de supositorio con un portador adecuado.

El régimen de dosificación será determinado por el médico tratante y por factores clínicos. Tal como se sabe en las artes médicas, las dosificaciones a cualquier paciente dependen de muchos factores, incluyendo el tamaño del paciente, el área de superficie corporal, la edad, el compuesto particular que será administrado, el sexo, el tiempo y la ruta de administración, la salud general y otros fármacos que están haciendo administrados en forma concurrente. Una dosis típica puede estar, por ejemplo, dentro del rango de 0.001 a 1000 µg (o de ácido nucleico para la expresión o para la inhibición de expresión en este rango); sin embargo, las dosis debajo o arriba de este rango de ejemplo se consideran, haciendo una consideración especial a los factores antes mencionados. Generalmente, la dosis puede fluctuar por ejemplo, de aproximadamente 0.0001 a 100 mg/kg, y más normalmente 0.01 a 5 mg/kg (por ejemplo, 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 receptor. Por ejemplo, las dosis pueden ser de 1 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal o dentro del rango de 1-10 mg/kg, preferentemente al menos 1 mg/kg. Las dosis intermedias en las dosis anteriores también están proyectadas para estar dentro del alcance de la presente invención. A los sujetos se les pueden administrar dichas dosis en forma diaria, o en días alternativos, en forma semanal o según cualquier otro programa determinado mediante análisis empírico. Un tratamiento de ejemplo comprende administración en múltiples dosis durante un período prolongado, de al menos seis meses. El régimen de tratamiento de ejemplo adicional comprende administración una vez cada 2 semanas o una vez al mes o cada 3-6 meses. Los programas de dosificación de ejemplo incluyen 1-10 mg/kg o 15 mg/kg en días consecutivos, 30 mg/kg en días alternos o 60 mg/kg en forma semanal. En algunos métodos, se administran en forma simultánea dos o más anticuerpos monoclonales con diferentes especificidades de unión, caso en el cual la dosificación de cada anticuerpo administrado deficiencia en los rangos indicados. El progreso puede ser monitoreado mediante evaluación periódica. Las preparaciones para administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones, soluciones acuosas o no acuosas estériles. Los ejemplos de solventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tal como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tal como oleato de etilo. Los portadores acuosos incluyen agua, soluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, incluyendo solución salina y medios amortiguados. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, Ringer lactada o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen rellenos fluidos y de nutrientes, rellenos de electrolito (tal como los que están basados en dextrosa de Ringer), y similares. También pueden estar presentes conservadores y otros aditivos tal como antimicrobianos, anti-oxidantes, agentes de quelación y gases inertes y similares. Además, la composición farmacéutica de la presente invención puede comprender agentes adicionales tal como dopamina o fármacos psicofarmacológicos, dependiendo del uso proyectado de la composición farmacéutica.

Además, en una realización preferida de la presente invención la composición farmacéutica puede ser formulada como una vacuna, por ejemplo, si la composición farmacéutica de la presente invención comprende un anticuerpo anti-IAPP y/o anti-proIAPP o fragmento de unión, derivado o variante del mismo para inmunización pasiva. Tal como se mencionó en la sección de antecedentes, las diversas líneas de evidencia han mostrado que las especies IAPP y/o proIAPP agregadas son activador importante para la patogénesis de T2D (Zraika et al. (2010), Diabetologia 53(6): 1046-1056; Westermark et al. (2011), Physiol. Rev. 91(3): 795-826; Jurgens et al. (2011), Am. J. Patol. 178(6): 2632-2640; Hoppener

et al. (2008), Exp. Diabetes Res. 697035) y el tratamiento que interfiere con una agregación hIAPP disminuyó el fenotipo diabético e incremento la duración de vida en el animal (Aitken et al. (2009), Diabetes 59(1): 161-171). Por consiguiente, es prudente esperar que la inmunización pasiva con anticuerpos anti-IAPP y/o anti-proIAPP humanos y moléculas de unión a IAPP y/o proIAPP equivalentes de la presente invención, ayudará a evitar diversos efectos secundarios en los conceptos de terapia de inmunización activa, tal como se describe en la sección de antecedentes. Por consiguiente, los anticuerpos anti-IAPP y/o anti-proIAPP de la presente invención y sus equivalentes en la presente invención serán particularmente útiles como una vacuna para la prevención o disminución de enfermedades que muestran la presencia de, o que son originadas por IAPP y/o proIAPP agregado, tal como cambios metabólicos que anteceden, originan y/o están conectados/asociados o enlazados con T2D que comprenden las enfermedades que originan daño al páncreas y por consiguiente pueden conducir a diabetes que comprende pancreatitis crónica, fibrosis quística, cáncer pancreático; en enfermedades que incrementan el riesgo de T2D comprende enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington; en enfermedades cardiovasculares enlazadas o no con obesidad y T2D; y/o la propia T2D, por ejemplo.

En una realización, puede ser benéfico utilizar construcciones biespecíficas o multiespecíficas recombinantes del anticuerpo de la presente invención. Para ver la referencia consultar la Publicación de Fischer y Leger, Patobiology 74 (2007), 3-14. Dicha molécula biespecífica puede ser diseñada para dirigir IAPP con un brazo de unión y otra entidad conocida en patogénesis de diabetes con el segundo brazo, por ejemplo, proIAPP (además anticuerpos de la presente invención que son biespecíficos contra IAPP y proIAPP tal como se indicó anteriormente para el anticuerpo NI-203.26C11 de ejemplo). O dicha molécula biespecífica debe ser diseñada para enlazar el segundo brazo de unión otras entidades conocidas en patogénesis de diabetes tal como o IL-1 β y IL-6, o mediante el bloqueo del coportador-2 de sodio-glucosa (SGLT2) o CD33, cuya intervención se considera que revierte la diabetes en ratones NOD mediante inducción de células T reguladoras de adaptación (Ablamunits et al, Diabetes 61 (2012), 145-154; Belghit et al, Nat Med 9 (2003), 1202-1208).

En una realización, puede ser benéfico utilizar fragmentos Fab (rFab) recombinantes y de cadena simple (scFvs) del anticuerpo de la presente invención, que deben penetrar más fácilmente una membrana celular. Por ejemplo, la Publicación de Robert et al, Protein Eng. Des. Sel. (2008) Oct 16; SI 741-0134, publicada en línea, describe el uso de fragmentos Fab recombinantes (rFab) y de cadena simple (scFvs) del anticuerpo monoclonal WO-2 que reconoce un epítipo en la región A β N-terminal. Los fragmentos diseñados tienen la capacidad de (i) para prevenir la fibrilación amiloide, (ii) desagregar las fibrillas A β 1-42 preformadas y (iii) inhibir t A β 1-42 la neurotoxicidad *in vitro* transmitida por oligómero en forma tan eficiente como la molécula IgG completa. Las ventajas percibidas de utilizar formatos de anticuerpo diseñados Fab y scFv pequeños que carecen de la función efectora, incluyen el pasaje más eficiente a través de la barrera de sangre-cerebro y la minimización del riesgo de disparar reacciones secundarias inflamatorias. Además, además de scFv y los anticuerpos de dominio simple retienen la especificidad de unión de los anticuerpos de longitud total, se pueden expresar como genes simples y en forma intracelular en células de mamíferos como intracuerpos, con el potencial de alteración del doblaje, interacciones, modificaciones o posicionamiento subcelular de sus objetivos; ver para revisión por ejemplo la Publicación de Miller y Messer, Molecular Therapy 12 (2005), 394-401.

En un método diferente Muller et al., Expert Opin. Biol. Ther. (2005), 237-241, describe una plataforma de tecnología, llamada "Tecnología SuperAnticuerpo", que se dice que permite que los anticuerpos sean revueltos en células vivas sin ponerlas en peligro. Dichos anticuerpos de penetración celular abren nuevas ventanas de diagnóstico y terapéuticas. El término "TransMabs" ha sido acuñado para estos anticuerpos.

En una realización adicional, puede ser deseable la co-administración o administración en secuencias de otros anticuerpos útiles para tratar una enfermedad relacionada con el surgimiento de IAPP y/o proIAPP agregado pueden ser deseables. En una realización, el anticuerpo adicional está comprendido en la composición farmacéutica de la presente invención. Los ejemplos de anticuerpos que pueden ser utilizados para tratar a un sujeto, incluyen pero no se limitan a anticuerpos que dirigen CD33, SGLT2, IL-6 y IL-1.

En una realización adicional, puede ser deseable la co-administración o administración en secuencias de otros agentes útiles para tratar una enfermedad relacionada a IAPP agregado y/o proIAPP, y/o a diabetes. En una realización, el agente adicional está comprendido en la composición farmacéutica de la presente invención. Los ejemplos de agentes que pueden ser utilizados para tratar a un sujeto incluyen pero no se limitan a: Insulina y análogos de insulina; moduladores de la trayectoria de señalización de insulina, tal como inhibidores de las fosfatasa de tirosina de proteína (PTPases), compuestos miméticos de molécula no pequeña e inhibidores de la amidotransferasa de glutamina-fructosa-6-fosfato (GFAT), inhibidores DPP-IV, agentes que influyen una producción hepática desregulada, tipo inhibidores de glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa), inhibidores de fructosa-1,6-bisfosfatasa (F-1,6-BPase), inhibidores de fosforilasa de glicogen (GP), antagonistas de receptor de glucagón, inhibidores de carboxiquinasa de fosfoenolpiruvato (PEPCK), inhibidores de cinasa de deshidrogenasa de piruvato (PDHK), incrementadores de sensibilidad de insulina,

incrementadores de secreción de insulina, inhibidores de α -glucosidasa, inhibidores de vaciado gástrico; agonistas del receptor Péptido-1 tipo Glucagón (GLP-1); agentes de Sulfonilurea; agentes de Biguanida tal como Metformina; inhibidores de Alfa-glucosidasa; Agonistas del receptor activado por proliferador de peroxisoma (PPAR); agentes de Meglitinida; inhibidores de Dipeptidil-peptidasa (DPP) IV; inhibidores de PDE1, PDE5, PDE9, PDE10 o PDE11 (PDE=Fosfodiesterasa); agonistas de Amilina (por ejemplo, pramlintida y otros análogos de amidina); Canela; antagonistas de receptor de Glucagón; inhibidores de Glicogen-Fosforilasa; inhibidores de Fructosa-1,6-Bisfosfato; antagonistas de receptor de Canabinoide (CB1); fármacos anti-obesidad tal como supresores de apetito, sustancias que incrementan la saciedad y fármacos que incrementan el gasto de energía; agentes antiinflamatorios o cualquiera combinación de los mismos. Los ejemplos de agentes que pueden ser utilizados para tratar o prevenir el rechazo de islote después de trasplante de islote pancreático clínico, incluyen pero no se limitan a los agentes del grupo que comprende sirolimus (rapamicina), inhibidores de Calcineurina (por ejemplo, tacrolimus), ciclosporina, mofetil de micofenolato, FTY 720, ciclosporina, corticoesteroides y anticuerpos monoclonal de receptor anti-IL2 (por ejemplo, daclizumab), agonistas del receptor de péptido-1 tipo glucagón (GLP-1) (ver, por ejemplo, la Publicación de Noguchi et al, Acta Med. Okayama, 60 (2006), y la Solicitud Internacional WO2012088157). Por consiguiente, en una realización, se proporciona una composición que comprende además un agente adicional útil para tratar diabetes mellitus tipo 2 (T2D) y/o para tratar o prevenir rechazo de islote después de trasplante clínico de islote pancreático. Los ejemplos de otros agentes que pueden ser utilizados en forma concomitante con una composición farmacéutica de la presente invención se describen en la técnica; ver por ejemplo, las Publicaciones Internacionales WO2009005672, WO2010128092, WO2012088157 o la Solicitud Europea EP11158212.8.

Una dosis o cantidad terapéuticamente efectiva se refiere a la cantidad de un ingrediente activo suficiente para disminuir los síntomas o condición. La eficacia terapéutica y toxicidad de dichos compuestos se puede determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, ED_{50} (la dosis terapéuticamente efectiva en el 50% de la población) y LD_{50} (la dosis letal para el 50% de la población). La proporción de dosis entre los efectos terapéuticos y tóxicos es el índice terapéutico, y se puede expresar como la proporción LD_{50}/ED_{50} . Preferentemente, el agente terapéutico en la composición está presente en una cantidad suficiente para restaurar o conservar el control de azúcar normal en la sangre y/o la respuesta a insulina en el caso de trastornos metabólicos tal como T2D.

A partir de los anterior, es evidente que la presente invención comprende cualquier uso de una molécula de unión a IAPP y/o proIAPP, es decir un anticuerpo de la presente invención o una cadena de inmunoglobulina del mismo, en particular para el diagnóstico y/o tratamiento de una enfermedad que será relacionada con IAPP y/o proIAPP agregado, tal como se mencionó anteriormente, tal como T2D. Por lo tanto, la presente invención proporciona un anticuerpo tal como se definió anteriormente y más adelante, el polinucleótido, el vector o la célula tal como aquí se define o una composición farmacéutica o de diagnóstico que comprende cualquiera de las mismas para utilizarse en tratamiento profiláctico, tratamiento terapéutico, y/o monitorear del progreso o una respuesta al tratamiento o un trastorno relacionado con IAPP y/o proIAPP, en donde preferentemente el trastorno se selecciona del grupo que comprende todos los tipos de diabetes, tal como diabetes tipo 1, diabetes gestacional, prediabetes (cuando la glicemia de alto contenido en la sangre no está alcanzando el valor de umbral de T2D o la resistencia a insulina) y diabetes autoinmune latente de adultos (LADA); cualquiera enfermedad que origina daño al páncreas y por consiguiente puede conducir a diabetes tal como pancreatitis crónica, fibrosis quística y cáncer pancreático; cualquiera enfermedad que incrementa el riesgo de T2D tal como enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Huntington u otras enfermedades neurodegenerativas que han sido definidas en la presente invención, asociadas con diabetes; síndrome metabólico en general como un factor de riesgo para desarrollar diabetes o como una condición que puede existir antes de la diabetes; amiloidosis de islote en general como un factor de riesgo para desarrollar diabetes o una condición que puede existir antes de diabetes; obesidad en general como un factor de riesgo para desarrollar diabetes o como una condición que puede existir antes de la diabetes; cualquiera enfermedad cardiovascular enlazada con la obesidad y T2D; todas las consecuencias de T2D que puedan incrementar el riesgo de desarrollar diabetes tal como enfermedad cardíaca, ataque, retinopatía diabética, deficiencia de riñón, deficiencia renal, cetoacidosis y, hiperosmolar no cetótico. El grupo de enfermedades anteriores será referido como el grupo de enfermedades relacionadas con IAPP y/o proIAPP.

En otra realización la presente invención se refiere a una composición de diagnóstico que comprende cualquiera de las moléculas de unión a IAPP y/o proIAPP antes descritas, moléculas de unión, anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno, polinucleótidos, vectores o células de la presente invención y opcionalmente un medio adecuado para la detección de dichos agentes convencionalmente utilizado en métodos de diagnóstico a base de inmunología o ácido nucleico. Los anticuerpos de la presente invención son, por ejemplo, adecuados para utilizarse en inmunoensayos en donde pueden ser utilizados en fase líquida o enlazados a un portador de fase sólido. Los ejemplos de inmunoensayo que pueden utilizar el anticuerpo de la presente invención son ensayos competitivos y no competitivos ya sea en un formato directo o indirecto. Los ejemplos de dichos inmunoensayos son radioinmunoensayos (RIA), el intercalado

(ensayo inmunométrico), citometría de flujo y el ensayo de manchado Western. Los antígenos y anticuerpos de la presente invención pueden enlazarse a muchos diferentes portadores y utilizarse para aislar células enlazadas específicamente a los mismos. los ejemplos de portadores bien conocidos incluyen vidrio, poliestireno, cloruro de polivinilo, polipropileno, polietileno, policarbonato, dextrano, nylon, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, agarosas, y magnetitas. La naturaleza del portador puede ser ya sea soluble o insoluble para los propósitos de la presente invención. Puede haber diferentes etiquetas y métodos de etiquetado para los expertos en la técnica. Los ejemplos de tipos de etiquetas las cuales pueden ser utilizados en la presente invención incluyen enzimas, radioisotopos, metales coloidales, compuestos fluorescentes, compuestos quimioluminiscentes, y compuestos bioluminiscentes; también ver las realizaciones descritas anteriormente.

A través de una realización adicional, las moléculas de unión a IAPP y/o proIAPP, en particular los anticuerpos de la presente invención también pueden utilizarse en un método para el diagnóstico de un trastorno en un individuo, obteniendo una muestra de un fluido corporal del individuo probado, el cual puede ser una muestra de sangre, una muestra de plasma, muestra de suero, muestra de linfa o cualquier otra muestra de fluido corporal, tal como saliva o una muestra de orina, y contactar la muestra de fluido corporal con un anticuerpo de la presente invención bajo condiciones que permiten la condición de complejos de anticuerpo-antígeno. Posteriormente el nivel de complejos se determina a través de métodos conocidos en la técnica, en un nivel significativamente mayor al que se forma en una muestra de control, lo que indica la enfermedad en el individuo probado. En la misma forma, también se puede utilizar el antígeno específico enlazado por los anticuerpos de la presente invención. Por lo tanto, la presente invención se refiere a un inmunoensayo *in vitro* que comprende la molécula de unión, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención.

Dentro de este contexto, la presente invención también se refiere a medios diseñados específicamente para este propósito. Por ejemplo, se puede utilizar una formación a base de anticuerpo, que, por ejemplo puede cargarse con anticuerpos o moléculas de unión equivalentes de la presente invención que reconoce específicamente IAPP y/o proIAPP. El diseño de inmunoensayos de microformación se resume en la Publicación de Kusnezow et al, Mol. Cell Proteomics 5 (2006), 1681-1696. Por consiguiente, la presente invención también se refiere a microformaciones cargadas con moléculas de unión de IAPP y/o proIAPP identificadas según la presente invención.

En una realización, la presente invención se refiere a un método para diagnosticar una enfermedad relacionada con IAPP y/o proIAPP agregado a un sujeto, en donde el método comprende determinar la presencia de IAPP y/o proIAPP y/o IAPP y/o proIAPP agregados en una muestra del sujeto que será diagnosticado con al menos un anticuerpo de la presente invención, un fragmento de unión de IAPP y/o proIAPP del mismo, en el que la presencia de IAPP y/o proIAPP agregado patológicamente indica un trastorno metabólico, tal como T2D y un incremento del nivel de IAPP y/o proIAPP agregado patológicamente en comparación con el nivel de las formas monoméricas de IAPP y/o proIAPP fisiológicas, indica el progreso de un trastorno metabólico en el sujeto.

El sujeto que será diagnosticado puede ser asintomático o preclínico para la enfermedad. Preferentemente, el sujeto de control tiene la enfermedad relacionada con IAPP y/o proIAPP agregado, por ejemplo, cambios metabólicos que preceden, origina, y/o están conectados/asociados con o están ligados a enfermedades que comprenden T2D, que originan daño al páncreas y por consiguiente pueden conducir a diabetes comprendiendo pancreatitis crónica, fibrosis quística, cáncer pancreático; en enfermedades que incrementan el riesgo de T2D que comprende enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington; en enfermedades cardiovasculares enlazadas o no con obesidad de T2D; y/o a la propia T2D; en donde una similitud entre el nivel de IAPP y/o proIAPP agregado patológicamente y el estándar de referencia indican que el sujeto que será diagnosticado tiene una enfermedad metabólica o está en riesgo de desarrollar una enfermedad metabólica. Alternativamente, o en forma adicional como un segundo control, el sujeto de control no tiene una enfermedad metabólica, en donde una diferencia entre el nivel de los monómeros de IAPP y/o proIAPP fisiológicos y/o IAPP y/o proIAPP agregado y el estándar de referencia, indica que el sujeto que será diagnosticado tiene una enfermedad metabólica o está en riesgo de desarrollar una enfermedad metabólica. Preferentemente, el sujeto que será diagnosticado y el sujeto(s) de control corresponden en edad. La muestra que será analizada puede ser cualquier fluido corporal que se sospecha contiene IAPP y/o proIAPP agregado patológicamente, por ejemplo, sangre, plasma en sangre, suero en sangre, orina, fluido peritoneal, saliva o fluido cerebroespinal (CSF).

El nivel de monómeros IAPP y/o proIAPP fisiológicos y/o IAPP y/o proIAPP agregado fisiológicamente puede evaluarse a través de cualquier método conocido en la técnica que comprende, analizar IAPP y/o proIAPP mediante una o más técnicas elegidas de manchado Western, inmunoprecipitación, ensayo inmunoabsorbente enlazado por enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), clasificación celular activadas en forma fluorescente (FACS), electroforesis de gel bidimensional, espectrometría de masa (MS), tiempo de vuelo de desabsorción/ionización de láser existida por matriz de MS (MALDI-TOF), tiempo de vuelo de ionización por desabsorción láser incrementada por superficie (SELDI-TOF),

cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC), cromatografía líquida de proteína rápida (FPLC), cromatografía líquida multidimensional (LC) seguido de espectrometría de masa tándem (MS/MS), y densitometría láser. Preferentemente, la generación de imágenes *in vivo* de IAPP y/o prolAPP comprende tomografía de emisión de positrón (PET), tomografía de emisión de fotón simple (SPECT), generación de imágenes ópticas infrarrojas cercanas (NIR) o generación de imágenes de resonancia magnética (MRI).

Los métodos a base de anticuerpo para la detección de IAPP y/o prolAPP o para el diagnóstico o control del progreso de una enfermedad relacionado con IAPP y/o prolAPP agregado tal como T2D, y el control del tratamiento de dicha enfermedad utilizando anticuerpos y medios relacionados que pueden ser adaptados según la presente invención también se describen en la solicitud Internacional WO2003092619. Los métodos pueden ser aplicados tal como se describe pero con un anticuerpo específico de IAPP y/o prolAPP, fragmento de unión, derivado o variante de la presente invención.

En una realización, por lo tanto, un anticuerpo de la presente invención, el polinucleótido, el vector o la célula definida anteriormente o la composición farmacéutica o de diagnóstico que comprende cualquiera de los mismos, se proporciona para el uso en tratamiento profiláctico, tratamiento terapéutico, y/o control del progreso de una respuesta al tratamiento de una enfermedad relacionada con IAPP y/o prolAPP. Por lo tanto, en general, la presente invención también se refiere a un método de diagnosticar o monitorear el progreso de una enfermedad relacionada con IAPP y/o prolAPP (tal como amiloidosis de islote y T2D que normalmente está precedida por la amiloidosis de islote) en un sujeto, en donde el método comprende determinar la presencia de oligómeros, agregados o fibrillas de IAPP y/o prolAPP en una muestra del sujeto que será diagnosticado con al menos un anticuerpo de la presente invención, en el que la presencia de oligómeros, agregados o fibrillas de IAPP y/o prolAPP indica el trastorno. En una realización se proporciona el método de diagnóstico o control del progreso de amiloidosis de islote en un sujeto, en donde el método comprende determinar la presencia de oligómeros, agregados o fibrillas de IAPP y/o prolAPP en una muestra del sujeto que será diagnosticado con al menos un anticuerpo de la presente invención, en el que la presencia de oligómeros, agregados o fibrillas de IAPP y/o prolAPP indica la presencia de diabetes mellitus tipo 2 (T2D) presintomática, prodrómica o clínica y/o la deficiencia de célula beta después de trasplante clínico de islote pancreático y un incremento en el nivel de oligómeros, agregados o fibrillas de IAPP y/o prolAPP en comparación con el nivel de IAPP fisiológico en comparación con una muestra de referencia derivada de un sujeto cuando es saludable o una muestra de control del mismo sujeto indica el progreso de diabetes mellitus tipo 2 (T2D) presintomática prodrómica o establecida y/o de deficiencia de islote después de trasplante clínico de islote pancreático en el sujeto. Un experto en la técnica podrá apreciar que en una realización en donde el método se utiliza tanto para el diagnóstico como el control del progreso de cualquier otra enfermedad del grupo relacionados con IAPP y/o prolAPP tal como se definió anteriormente.

Tal como se indicó anteriormente, los anticuerpos de la presente invención, fragmentos de los mismos y moléculas de la misma especificidad de unión como los anticuerpos y fragmentos de los mismos, se pueden utilizar no únicamente *in vitro* si no también *in vivo*, en donde además también se pueden perseguir aplicaciones de diagnóstico, y terapéuticas. En una realización, por lo tanto, la presente invención también se refiere al anticuerpo de la presente invención para la preparación de una composición para detección *in vivo* o la dirección de un agente terapéutico y/o de diagnóstico para IAPP y/o prolAPP en el cuerpo humano o de un animal. Los agentes terapéuticos y/o de diagnóstico potenciales pueden ser elegidos de enumeraciones no exhaustivas de los agentes terapéuticos útiles en el tratamiento de enfermedades metabólicas, tal como T2D y etiquetas potenciales tal como se indicó anteriormente. Con respecto a las imágenes *in vivo*, en una realización preferida de la presente invención dicha generación de imágenes *in vivo* comprende tomografía de emisión de positrones (PET), tomografía de emisión de fotón simple (SPECT), imágenes ópticas casi infrarrojas (NIR) o imágenes de resonancia magnética (MRI). En una realización adicional, la presente invención también proporciona dicho anticuerpo de la presente invención, o la molécula para la preparación de una composición para los métodos de imágenes *in vivo* antes especificados, para el uso del método de diagnóstico o control del progreso de un trastorno relacionado con IAPP y/o prolAPP en un sujeto, tal como se definió anteriormente.

VII. Péptidos con Epítomos IAPP específicos de agregación

En un aspecto adicional de la presente invención se refiere a péptidos que tienen un epítipo de IAPP y/o prolAPP reconocido en forma específica por cualquier anticuerpo de la presente invención. Dicho péptido comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos tal como se indica en la SEQ ID NO: 4, en la SEQ ID NO: 5, o en la SEQ ID NO: 71 como el único epítipo lineal conocido por el anticuerpo, en donde el péptido es reconocido por cualquier anticuerpo de la presente invención, preferentemente mediante el anticuerpo NI-203.19H8 respectivo por el anticuerpo NI-203.26C11 o por el anticuerpo NI-203.15C7.

En una realización de la presente invención, dicho péptido puede ser utilizado para el diagnóstico o control de una

enfermedad relacionada con IAPP y/o proIAPP agregado en un sujeto, tal como T2D, que comprende el paso de determinar la presencia de un anticuerpo que enlaza a un péptido en una muestra biológica del sujeto, y que es utilizado para diagnóstico de dicha enfermedad en dicho sujeto, midiendo los niveles de anticuerpos que reconocen el péptido antes descrito de la presente invención y que compara las medidas con los niveles que se encontraron en sujetos saludables de edad y género comparables. Por lo tanto, en una realización la presente invención se refiere a un método para diagnosticar amiloidosis de islote que indica diabetes mellitus tipo 2 (T2D) presintomática o clínica y/o deficiencia de célula beta después de trasplante clínico de islote con un sujeto, que comprende el paso de determinar la presencia de un anticuerpo que enlaza a un péptido tal como se definió anteriormente en una muestra biológica del sujeto. Según este método, un nivel elevado de anticuerpos medidos específicos para dicho péptido de la presente invención, indica el diagnóstico en el sujeto con diabetes mellitus tipo 2 (T2D) presintomática o clínica y/o deficiencia de célula beta después de trasplante de islote pancreático o para el diagnóstico en un sujeto de cualquiera otra enfermedad de grupo de trastorno relacionados con IAPP y/o proIAPP tal como se definió anteriormente. El péptido de la presente invención puede ser formulado en una formación, un equipo y composición, respectivamente, tal como se describió anteriormente. Dentro de este contexto, la presente invención también se refiere a un equipo útil en el diagnóstico o control del progreso de amiloidosis de islote, en donde el comprende al menos un anticuerpo de la presente invención, el polinucleótido, el vector o la célula y/o el péptido tal como se definió anteriormente, opcionalmente con reactivos y/o instrucciones para uso.

Estas y otras realizaciones se describen y están comprendidas en la presente descripción y los ejemplos de la misma. La literatura adicional referente a cualquiera de los materiales, métodos y usos y compuestos que serán empleados según la presente invención, puede ser recuperada de bibliotecas y bases de datos públicas, utilizando por ejemplo dispositivos electrónicos. Por ejemplo, se puede utilizar la base de datos pública "Medline", la cual es alojada por el National Center for Biotechnology Information y/o the National Library of Medicine at the National Institutes of Health (Centro Nacional de Información de Biotecnología y/o la Biblioteca Nacional de Medicina en el Instituto Nacional de Salud). Las bases de datos y direcciones de web adicionales, tal como las del European Bioinformatics Institute (Instituto de Bioinformáticas Europea) (EBI), la cual es parte del European Molecular Biology Laboratory (Laboratorio Europeo de Biología Molecular) (EMBL) son conocidos por los expertos en la técnica y también se pueden obtener utilizando motores de búsqueda de internet. Se proporciona una revisión de la información de patente en biotecnología y un estudio de las fuentes relevantes de información de patentes útil de retrospectiva y para atención actual, en la Publicación de Berks, TIBTECH 12 (1994), 352-364.

La descripción anterior describe generalmente la presente invención. A menos que se especifique de otra manera, un término tal como aquí se utiliza, se proporciona para la definición tal como lo proporciona el Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology (Diccionario de Oxford de Biología Bioquímica y Molecular), Oxford University Press, 1997, revisión del 2000 y reimpreso en 2003, ISBN 0 198506732. Se mencionan varios documentos a lo largo del texto de la presente memoria; sin embargo, no hay admisión de que cualquier documento mencionado sea una técnica anterior a la presente invención.

Se puede obtener una comprensión más completa mediante la referencia a los siguientes ejemplos específicos, los cuales se proporcionan en la presente invención únicamente con el propósito de ilustración y no están proyectados para limitar el alcance de la presente invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Validación de objetivo y especificidad de unión de anticuerpos IAPP humanos

Para validar IAPP como un objetivo reconocido de anticuerpos aislados, se llevaron a cabo ensayos ELISA directos. Para los anticuerpos NI-203.9A2, NI-203.19H8, NI-203.26C11 y NI-203.8E3 humanos recombinantes de ejemplo, se recubrieron placas de 96 depósitos (Costar, Corning, Estados Unidos) con una solución IAPP humana o con BSA (Sigma-Aldrich, Buchs, Suiza) diluida a una concentración de 10 µg/ml en amortiguador de recubrimiento ELISA de carbonato (15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, pH 9.42) y la eficiencia de unión del anticuerpo fue probada. De manera importante, la solución IAPP humana utilizada para el ensayo ELISA contenía fibrillas de IAPP, tal como se muestra mediante microscopio de electrones; ver la figura 3A. Los anticuerpos NI-203.9A2, NI-203.19H8, NI-203.26C11 y NI-203.8E3 de ejemplo enlazan específicamente a fibrillas humanas IAPP mediante ELISA. No se observa unión a BSA; ver la figura 3B. Las mismas características parecen aplicar los anticuerpos NI-203.19F2 y NI-203.15C7.

Para una determinación de la concentración efectiva máxima media (EC₅₀), NI-203.9A2, NI-203.19H8, NI-203.26C11 y NI-203.8E3, se llevaron a cabo experimentos ELISA directos adicionales con diversas concentraciones de anticuerpo. Se recubrieron microplacas de 96 depósitos (Costar, Corning, Estados Unidos) con soluciones IAPP humana y proIAPP

humana diluida en una concentraciones de 10 µg/ml en amortiguador de recubrimiento ELISA de carbonato (15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, pH 9.42) y se probó la eficiencia de unión del anticuerpo. Aunque la solución IAPP humana utilizada para el ensayo ELISA contiene fibrillas de IAPP, el proIAPP humano formó agregados en la solución, tal como se revela mediante microscopio de electrones; ver la figura 4A. Se determinó la unión utilizando anticuerpos IgGy humano de burro (Jackson ImmunoResearch, Newmarket, RU) conjugado con HRP, seguido de la medida de actividad HRP en un ensayo colorimétrico estándar.

Los valores EC₅₀ fueron estimados mediante regresión no lineal utilizando el software GraffPad Prism (San Diego, Estados Unidos). Los anticuerpos derivados de humano recombinante NI-203.9A2, NI-203.19H8, NI-203.26C11 y NI-203.8E3 enlazan con alta afinidad a las fibrillas de IAPP humanas con una EC₅₀ de 9 nM, 22 nM, 6 nM y 4 nM, respectivamente. El anticuerpo NI-203.26C11 también enlaza a proIAPP humano agregado con una EC₅₀ en el rango nanomolar (260 nM); ver figura 4B.

Ejemplo 2: Especificidad de anticuerpo para fibrillas de IAPP humanas y no para IAPP humano no fibrilar, que enlaza preferentemente a epítomos conformación

Para determinar la actividad de unión de los anticuerpos NI-203.9A2, NI-203.19H8, NI-203.26C11 y NI-203.8E3 de ejemplo para epítomos conformacionales, se llevaron a cabo experimentos ELISA directos con soluciones IAPP humanas y IAPP no fibrilares diluidas a una concentración de 10 µg/ml en amortiguador de recubrimiento ELISA de carbonato (15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, pH 9.42) y se probó la capacidad de unión del anticuerpo. Aunque la solución IAPP humana utilizada para el ensayo ELISA contiene fibrillas de IAPP, la solución IAPP no fibrilar humana careció de fibrillas de IAPP y mostró únicamente agregados amorfos pequeños, tal como lo revela el microscopio de electrón; ver la figura 5A. Se determinó en forma adicional la unión utilizando anticuerpos IgGy antihumano de burro (Jackson immunoResearch, Newmarket, RU) conjugado con HRP, seguido de la medida de la actividad de HRP en un ensayo colorimétrico estándar.

Los anticuerpos NI-203.9A2, NI-203.19H8, NI-203.26C11 y NI-203.8E3 recombinantes mostraron alta afinidad de unión a las fibrillas de IAPP al momento del recubrimiento con la solución IAPP (figura 5B), tal como se observó previamente (figura 4). Se observó una pérdida de afinidad en IAPP no fibrilar cuando se comparó con fibrillas de IAPP (figura 5B), demostrando de esta forma una unión preferencia de anticuerpos NI-203.9A2, NI-203.19H8, NI-203.26C11 y NI-203.8E3 a fibrillas de IAPP. Los resultados preliminares muestran los mismos efectos a los descritos anteriormente, para los anticuerpos NI-203.19F2 y NI-203.15C7.

Estos descubrimientos señalan fuertemente a los epítomos de unión de anticuerpo NI-203.9A2, NI-203.19H8, NI-203.26C11, NI-203.8E3, NI-203.19F2 y NI-203.15C7 que están expuestos predominantemente y accesibles en la formación de fibrila IAPP en cambio con epítomos lineales que están presentes en la conformación de proteína IAPP humana fisiológica. Se observaron fibrillas de IAPP patológicas en islotes pancreáticos de pacientes T2D. Ya que los anticuerpos NI-203.9A2, NI-203.19H8, NI-203.26C11, NI-203.8E3, NI-203.19F2 y NI-203.15C7 muestran unión prominente a las fibrillas de IAPP humanas patológicas, terapéuticamente relevantes, estos anticuerpos derivados de humanos son de potencial terapéutico en T2D.

Ejemplo 3: Evaluación de epítipo de unión en anticuerpos NI-203.9A2, NI-203.19H8, NI-203.26C11, NI-203.8E3, NI-203.19F2, y NI-203.15C7

Para determinar el epítipo de unión de los anticuerpos NI-203.9A2, NI-203.19H8, NI-203.26C11, NI-203.8E3, NI-203.19F2, y NI-203.15C7 de ejemplo, se llevó a cabo análisis de exploración pepscan y de alanina con péptidos de traslape que mapean toda la secuencia de aminoácido IAPP humana y con una sustitución de alanina de los primeros 22 aminoácidos de proIAPP. La capacidad de unión del anticuerpo se probó en estos péptidos moteados sobre una membrana de nitrocelulosa (JPT Peptide Technologies, Berlin, Alemania) y utilizando anticuerpo secundario IgGy antihumano de burro conjugado por HRP (Jackson immunoResearch, Newmarket, RU) seguido de detección de la actividad HRP (figura 6A).

Los anticuerpos NI-203.19H8, NI-203.26C11, y NI-203.15C7 recombinantes (1 µg/ml) mostraron unión a la secuencia 19-SSNNFGA-25 (SEQ ID NO: 4), 2-CNTATCA-8 (SEQ ID NO: 5), y 10-QRLANFLVHS-19 (SEQ ID NO: 71) en IAPP humano (figura 6A y 6B), que corresponden por lo tanto a las secuencias de unión putativo de estos anticuerpos. El epítipo de los anticuerpos NI-203.9A2, NI-203.8E3, y NI-203.19F2 recombinantes (1 y 10 µg/ml) no han sido identificados.

Ejemplo 4: Unión de anticuerpos NI-203.9A2, NI-203.19H8 y NI-203.26C11 a fibrillas de IAPP patológicos en el

páncreas de pacientes diagnosticados con diabetes mellitus tipo 2 pero no en pacientes de control

Se seleccionaron secciones de páncreas incrustadas con parafina de dos pacientes diagnosticados con diabetes mellitus tipo 2 (T2D) con base en la carga amiloide en islotes pancreáticos elevados en manchado ThioS y con rojo Congo, y utilizado subsecuentemente para la caracterización de unión de anticuerpo NI-203.9A2, NI-203.19H8 y NI-203.26C11 de ejemplo. Las secciones de páncreas incrustadas con parafina de un paciente no diagnosticado con diabetes mellitus tipo 2 se utilizó como un control. Después del pretratamiento de ácido fórmico, las secciones fueron incubadas con anticuerpos NI-203.9A2, NI-203.19H8 y NI-203.26C11 humanos (5 y 50 nM) o anticuerpo anti-IAPP monoclonal de ratón (1:100; Abeam, Cambridge, RU), seguido de incubación con anticuerpo secundario antihumano de burro biotinilado (1:500; Jackson ImmunoResearch, Newmarket, RU) o anticuerpo secundario anti-ratón de cabra biotinilado (1:500; Jackson ImmunoResearch, Newmarket, RU). Se amplificó la señal de anticuerpo con el equipo Vectastain ABC-AP kit (Vector Laboratories, Estados Unidos) y se detectó con sustrato de diaminobencidina (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos). Al momento del bloqueo de avidina/biotina (equipo de bloqueo Avidin/Biotin, Vector Laboratories, Estados Unidos), se visualizaron células-β de islote pancreático utilizando un anticuerpo de anti-insulina de codo de guinea policlonal (1:5; Dako, Estados Unidos) acoplado a un anticuerpo secundario anti-cerdo de guinea de burro biotinilado (1:500; Jackson ImmunoResearch Laboratories, Estados Unidos) y la señal de anticuerpo fue amplificada con el equipo Vectastain ABC-AP (Vector Laboratories, Estados Unidos) y detectado con sustrato de fosfatasa alcalina (Vector Laboratories, Estados Unidos).

El primer paciente T2D mostró grandes depósitos amiloides en islotes pancreáticos que corresponden a fibrillas de IAPP patológicas, tal como se visualiza mediante manchado ThioS y rojo Congo (Figura 7A). Los anticuerpos humanos NI-203.9A2, NI-203.19H8 y NI-203.26C11 mostraron manchado de islote pancreático prominente en estas secciones positivas amiloides (figura 7B). El manchado de anticuerpo se observó en 5 nM y se incrementó en 50 nM, sin manchado observado únicamente con el anticuerpo secundario, lo que sugiere la unión específica de los anticuerpos IAPP humanos. Estos descubrimientos fueron confirmados en un segundo paciente T2D que muestra depósitos amiloides en lotes pancreáticos (datos no mostrados). En cambio, los anticuerpos humanos NI-203.9A2, NI-203.19H8 y NI-203.26C11 no mostraron islotes pancreáticos de un tercer paciente T2D que carece de depósitos amiloides (figura 7C y D) y de un paciente de control no diagnosticado con T2D (figura 8). El anticuerpo anti-IAPP monoclonal de ratón comercialmente disponible mancho IAPP fisiológico en islotes pancreáticos del paciente de control no diabético; ver figura 8. Los anticuerpos de la presente invención también dan resultados positivos que dan como resultado pancreasas de gato diabético que muestran depósitos de amiloides de islote; ver figura 9. Las mismas propiedades de unión parecen aplicar a los anticuerpos NI-203.19F2 y NI-203.15C7. Estos demuestran que los anticuerpos NI-203.9A2, NI-203.19H8, NI-203.26C11, NI-203.19F2 y NI-203.15C7 reconocen específicamente las fibrillas de IAPP patológicas y están según las propiedades de unión de bioquímica de estos anticuerpos, que muestran fuerte especificidad de unión para fibrillas de IAPP *in vitro* (Figura 5).

Ejemplo 5: Los anticuerpos NI-203.9A2, NI-203.19H8 y NI-203.26C11 no reaccionan en forma cruzada con el amiloide Aβ patológico en el cerebro de un paciente diagnosticado con la enfermedad de Alzheimer

Las secciones de cerebro encontradas en parafina de un paciente diagnosticado con la enfermedad de Alzheimer fueron utilizadas para evaluar la reactividad cruzada de los anticuerpos NI-203.9A2, NI-203.19H8 y NI-203.26C11 de ejemplo. Después del pretratamiento con ácido fórmico, las secciones fueron incubadas con anticuerpos NI-203.9A2, NI-203.19H8 y NI-203.26C11 humanos (50 nM) o anticuerpo amiloide anti-β de ratón monoclonal 6E10 (1:2000; Covance, Allschwill, Suiza), seguido de incubación con anticuerpo secundario humano de burro biotinilado (1:500; Jackson ImmunoResearch, 10 Newmarket, RU) o anticuerpo secundario anti-ratón de cabra biotinilado (1:500; Jackson ImmunoResearch, Newmarket, RU). La señal de anticuerpo fue amplificada con el equipo Vectastain ABC-AP kit (Vector Laboratories, Estados Unidos) y detectado con sustrato de diaminobencidina (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos).

Los anticuerpos NI-203.9A2, NI-203.19H8 y NI-203.26C11 no reconocieron el amiloide patológico Aβ en cerebro humano con enfermedad de Alzheimer, en cambio el anticuerpo específico amiloide anti-β 6E10 (figura 10). Lo mismo parece aplicar para los anticuerpos NI-203.19F2 y NI-203.15C7.

Estos datos demuestran que los anticuerpos NI-203.9A2, NI-203.19H8 y NI-203.26C11 no reaccionan en forma cruzada con amiloide Aβ patológico. Por consiguiente, también se ha demostrado la unión reactivo cruzado mínimo de los anticuerpos NI-203.9A2, NI-203.19H8 y NI-203.26C11 a varios candidatos de proteína con propensión a mal pliegue/agregación mediante ELISA directo, incluyendo las proteínas de formación amiloides más prominentes que incluyen pero no se restringen a alfa-sinucleína, dismutasa de superóxido 1 (SOD1), Tau y TAR proteína de unión 43 (TDP-43).

Ejemplo 6: Control de calidad de anticuerpos NI-203.9A2, NI-203.19H8 y NI-203.26C 11 quiméricos de ratón

Para validar los anticuerpos NI-203.9A2, NI-203.19H8 y NI-203.26C1130 quiméricos de ratón de ejemplo, se llevaron a cabo ensayos ELISA directos tal como se describió anteriormente. Los anticuerpos quiméricos fueron comparados con anticuerpos humanos correspondientes. Para los anticuerpos NT-203.9A2, NT-203.19H8 y NT-203.26C11 quiméricos recombinantes de ejemplo, y sus anticuerpos humanos correspondientes, se recubrieron microplacas de 96 depósitos (Costar, Corning, Estados Unidos) con solución IAPP humana o con BSA (Sigma-Aldrich, Buchs, Suiza) diluida a una concentración de 10 ug/ml en amortiguador de recubrimiento ELISA de carbonato (15 mM Na₂CO₃; 35 mM NaHCO₃, pH 9.42) y se probó la eficiencia de unión de los anticuerpos quiméricos y humanos. Se determinó la unión utilizando anticuerpo IgG anti-humano de burro (Jackson ImmunoResearch, Newmarket, RU) conjugado con HRP, seguido de medida de actividad HRP en un ensayo colorimétrico estándar. De manera importante, la solución IAPP humana utilizada para ensayo ELISA que contenía fibrillas de IAPP, tal como se muestra mediante microscopio de electrones; ver la figura 3A. Los valores EC₅₀ mediante una regresión no lineal utilizando el software GraphPad Prism (San Diego, Estados Unidos).

Los anticuerpos quiméricos de ratón NI-203.9A2, NI-203.19H8 y NI-203.26C11 se enlazan con alta afinidad a fibrillas de IAPP humanas con una EC₅₀ de 18.6 nM, 23.9 nM y 11.5 nM, respectivamente. No se observó unión en BSA. La afinidad de unión de los anticuerpos quiméricos fue similar a sus contrapartes humanas, con una EC₅₀ de 9.4 nM, 22.9 nM y 6.8 nM para los anticuerpos NI-203.9A2, NI-203.19H8 y NI-203.26C11 humanos, respectivamente; ver figura 11.

Los anticuerpos NI-203.9A2, NI-203.19H8 y NI-203.26C11 quiméricos de ratón de ejemplo, fueron validados en forma adicional en secciones de páncreas incrustadas en parafina de dos pacientes seleccionados diagnosticados con diabetes mellitus tipo 2 (T2D), y mostraron depósitos de amiloide de islote. Después del pretratamiento con ácido fórmico, las secciones fueron incubadas con anticuerpos NI-203.9A2, NI-203.19H8 y NI-203.26C11 quiméricos (50 nM), seguido de incubación con anticuerpo secundario anti-humano de burro biotinilado (1:500; Jackson ImmunoResearch, Newmarket, RU). La señal de anticuerpo se amplificó con el equipo Vectastain ABC-AP kit (Vector Laboratories, Estados Unidos) y se detectó con sustrato de diaminobencidina (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos). Al momento de bloqueo de avidina/biotina (el equipo de bloqueo Avidina/Biotina, Vector Laboratories, Estados Unidos), se visualizaron células-β de islote pancreático utilizando un anticuerpo anti-insulina de cerdo de guinea policlonal (1:5; Dako, Estados Unidos) acoplado a anticuerpo secundario anti-cerdo de guinea de burro biotinilado (1:500; Jackson ImmunoResearch, Newmarket, RU) y se amplificó la señal de Vectastain ABC-AP con el equipo (Vector Laboratories, Estados Unidos) y detectó con sustrato de fosfatasa alcalina (Vector Laboratories, Estados Unidos).

Los anticuerpos quiméricos NI-203.9A2, NI-203.19H8 y NI-203.26C11 mostraron manchado de islote pancreático prominente en secciones positivas-amiloide de dos pacientes T2D (figura 12).

Estos datos demuestran que los anticuerpos NI-203.9A2, NI-203.19H8 y NI-203.26C11 quiméricos reconocen específicamente las fibrillas de IAPP patológicas con una eficiencia comparable con sus contrapartes humanas (figura 12).

Ejemplo 7: Validación *in vivo* del efecto terapéutico de los anticuerpos IAPP y/o proIAPP en modelos animales T2D

Se validaron candidatos de anticuerpos principales en dos modelos de ratones transgénicos y en un modelo de rata que expresan hIAPP: 1) ratones h-IAPP (hemicigoso)/C57BL/6/DBA expuestos a una dieta de alto contenido de grasa (Hull *et al.* (2003), Diabetes 52: 372-379); 2) ratones h-IAPP (hemicigoso)/A^{vy}/A expuestos a dieta estándar (Butler *et al.* (2003), Diabetes 52: 2304-2314); 3) ratas h-IAPP (homocigotas)/CD expuestas a dieta estándar (Butler *et al.* (2004), Diabetes 53: 1509-1516). Se evaluó la eficacia terapéutica determinando la masa de célula beta y la carga amiloide hIAPP en el páncreas, así como los niveles en plasma de hIAPP, y las pruebas funcionales de metabolismo de glucosa y secreción de insulina.

1) Características Fisiológicas

Se probaron las siguientes características fisiológicas de la (i) a la (vii) de los modelos animales de diabetes tipo II para ver si la aplicación de los anticuerpos de la presente invención en solicitud muestra un efecto preventivo y/o terapéutico.

(i) Glucosa en Sangre

El nivel de glucosa en sangre de los modelos animales T2D se probó y comparó con animales no tratados y en animales de cepa normal (no modelo T2D).

5 El "ratón de cepa normal" en la presente invención, no está limitada particularmente y puede ser cualquier ratón, siempre que no muestre normalidad en el nivel de glucosa en sangre, azúcar en urea, secreción de insulina y similares. Los ejemplos preferidos de "ratón de cepa normal" incluyen un ratón KOR, un ratón NC, y un ratón de laboratorio que se utilizó como un progenitor recurrente para generar un ratón congénito (por ejemplo, ratón C3H/He, ratón BALB/c, y ratón C57BL/6).

10 La "rata de cepa normal" en la presente invención no está limitada particularmente y puede ser cualquier rata siempre que no muestra normalidad en el nivel de glucosa en sangre, azúcar de urea, secreción de insulina y similares.

15 Dado que la diabetes en modelos de ratón y rata es inducida preferentemente mediante expresión transgénica de hIAPP, se utilizan preferentemente las mismas cepas con controles a las que fueron originalmente utilizadas para la generación de animales transgénicos.

20 La expresión "que tiene un mayor nivel de glucosa en la sangre en comparación con un ratón/rata de cepa normal" significa que el nivel de glucosa en sangre (concentración de glucosa en la sangre) en ayuno es mayor que el de un ratón/rata de cepa normal en ayuno. Los niveles de glucosa en sangre de los animales diabéticos de 130 mg/dl o más, más preferentemente 140 mg/dl o más, además, preferentemente 200 mg/dl y más preferentemente 300 mg/dl o más, se clasifica como una glucosa en sangre superior. Además, el término "en ayuno" tal como se utiliza en la presente invención significa una condición de aproximadamente 12 horas después del inicio del ayuno de un ratón o rata.

25 En la presente invención, el "nivel de glucosa en sangre" puede medirse a través de un método convencional conocidos para los expertos en la técnica, por ejemplo, utilizando un aparato de medición comercial (por ejemplo, Medisafe Reader; Terumo Co., Ltd.) según el método descrito en el Ejemplo que se encuentra a continuación.

Método de ejemplo de medida de nivel de glucosa en sangre

30 El nivel de glucosa en sangre (concentración de glucosa en sangre) de un sujeto animal, se mide utilizando un aparato de medición comercial (Medisafe Reader, Terumo Co., Ltd.). El principio de medición de este aparato será explicado a continuación. La medición se basa en el análisis colorimétrico. Se prepara un chip de medición, y sobre el chip se coloca la oxidasa de glucosa y la peroxidasa como catalizadores y la 4-aminoantipirina y N-etil-N(2-hidroxi-3-sulfopropil)-m-toluidina como agentes cromogénicos. Cuando una muestra en sangre absorbida a través del fenómeno capilar se
35 coloca sobre este chip, y posteriormente la glucosa en sangre se oxida mediante oxidasa de glucosa. Posteriormente, los agentes cromogénicos en el chip se oxidan mediante peroxidasa de hidrógeno generada en este momento, y peroxidasa que produce un color rojo-púrpura. La cantidad de glucosa en la sangre se calcula midiendo el grado de este tono de color.

40 Aquí, se obtienen 4 µl de sangre completa de un sujeto animal, como una muestra de sangre y se mide utilizando un tiempo de medida de 18 segundos.

(ii) Concentración de Hemoglobina Glicosilada (HbA1c):

45 Los modelos animales de diabetes tipo II se prueban para concentración de hemoglobina glicosilada en sangre incrementada y se comparan con modelos animales T2D no tratados y modelos animales no T2D normales. Las concentraciones de 2.5% o mayor, 2.6% o mayor, además 2.8% o mayor, y además 3.0% o mayor se clasifican como incrementadas.

50 La "concentración de hemoglobina glicosilada" tal como se utiliza en la presente invención significa la proporción de moléculas de hemoglobina con glucosa adherida a las mismas en un glóbulo rojo. La concentración de hemoglobina glicosilada puede ser utilizada como un índice para juzgar lo apropiado del control terapéutico para pacientes con diabetes si es conocido por correlacionarse mejor con el nivel de azúcar en la sangre en los meses 1 a 2 antes, que con las actuales.

55 La "concentración de hemoglobina glicosilada" puede medirse a través de un método convencional conocido por los expertos en la técnica, por ejemplo, utilizando un aparato de medición comercial (por ejemplo DCA 2000 System; Bayer Medical Ltd.) según el método descrito en el Ejemplo anterior. Más específicamente, por ejemplo, cuando se utiliza el sistema DCA 2000 antes mencionado como un aparato de medición, se mide la cantidad de hemoglobina total a través

de un método de tiocian-metemoglobina, y se mide la cantidad de hemoglobina glucosilada mediante la reacción de inhibición de coagulación látex.

(iii) Azúcar en Orina:

En la presente invención se muestra el azúcar en orina de los animales de control y los animales del modelo T2D.

El término "positivo en prueba para azúcar en orina" tal como se utiliza en la presente invención significa que la concentración de glucosa en orina excretada por los animales es de 100 mg/dl o mayor. La concentración de glucosa en orina puede medirse a través de un método convencional, por ejemplo, a través de un método descrito en el Ejemplo que se encuentra más adelante utilizando un equipo comercial (por ejemplo Pretest; Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). Específicamente, por ejemplo, cuando se utiliza Pretest como un equipo de medición, una muestra de orina de un animal se coloca primero en un papel de prueba del Pretest, y después de 30 segundos, se hace una evaluación según la tabla de color específica en este equipo para clasificación en cinco grados que fluctúan de - a +4. Las concentraciones de glucosa en orina estimadas del resultado de la evaluación son del 100-250 mg/dl para +1, 250-500 mg/dl para +2, 500-2000 mg/dl para +3, y 2000 mg/dl o mayor para +4. Los resultados de la evaluación de +1 y mayores se evalúan como "positivo en la prueba para azúcar en orina".

Método de medida de ejemplo de azúcar en orina

La glucosa en orina (azúcar en orina) de un sujeto animal se mide a través de métodos conocidos para los expertos en la técnica, por ejemplo, utilizando un equipo comercial (Pretest; Wako Puré Chemical Industries, Ltd.). Primero, se mancha una muestra de orina en un animal en un papel de prueba de Pretest antes mencionado y después de 30 segundos, se hace una evaluación según una tabla de color especificada para clasificación en cinco grados fluctúan de - a +4. Las concentraciones de glucosa en orina estimadas a partir de los resultados de la evaluación son de 100-250 mg/dl para +1, 250-500 mg/dl para +2, 500-2000 mg/dl para +3, y 2000 mg/dl o más para +4. Los resultados para la evaluación de +1 y mayores son evaluados como "positivo en la prueba para azúcar en la orina".

(iv) Concentración de Insulina en la Sangre:

Se prueba si la concentración de insulina en sangre de los modelos animales de diabetes Tipo II que se compara con los niveles, es equivalente o mayor a la de animales de control no tratados y a la de animales de control no diabéticos (animales de cepa normal).

La expresión de que la concentración de insulina a sangre es "equivalente o mayor a la de un animal de cepa normal" significa que la concentración de insulina en sangre en ayuno es equivalente a, o mayor a la de un animal de cepa normal en ayuno, por ejemplo 90 pg/ml o más, o 110 pg/ml o más.

En la presente invención, la "concentración de insulina en sangre" puede medirse a través de un método convencional, por ejemplo, utilizando un equipo de ensayo de insulina de Levis tipo U (Shibayagi Co.) según el método descrito en el Ejemplo que se encuentra más adelante. Más específicamente, por ejemplo, se inmoviliza un anticuerpo monoclonal anti-insulina (ratón) en una placa, la insulina en una muestra se enlaza a la misma, después de lo cual un anticuerpo monoclonal anti-insulina etiquetado con biotina que reconoce otro sitio de insulina se hace reaccionar con, se agrega en forma adicional al mismo un conjugado de peroxidasa de avidina para que unión a biotina, y finalmente se agregue una sustancia cromogénica para medir la insulina mediante desarrollo de color.

Método de medición de ejemplo de concentración de insulina en sangre

La concentración de insulina en sangre de un ratón en cuestión, se mide utilizando un método conocido para los expertos en la técnica, por ejemplo, se incorpora en un equipo comercial (equipo de ensayo de insulina Levis tipo U; Shibayagi Co.). La concentración de insulina se mide de la siguiente forma. Se moviliza un anticuerpo monoclonal anti-insulina en una placa, la insulina en una muestra se enlaza a la misma, después de lo cual, se hace reaccionar un anticuerpo monoclonal anti-insulina etiquetado con biotina, que reconoce otra parte de insulina, se agrega en forma adicional a la misma un conjugado de peroxidasa-avidina para enlazar a la biotina, y finalmente, se agrega una sustancia cromogénica para medir la insulina mediante desarrollo de color. El rango de medición generalmente es de 39 a 2,500 pg/ml para un animal normal (ratón).

(v) Tolerancia a Glucosa:

Los modelos animales T2D tratados y no tratados y los animales normales se probaron para tolerancia a glucosa anormal.

Si la tolerancia a la glucosa de un animal es normal o anormal, se puede confirmar a través de una prueba de tolerancia a glucosa. La prueba de tolerancia a glucosa puede llevarse a cabo según un procedimiento convencional conocido para los expertos en la técnica mediante glucosa administrada en forma intraperitoneal a un animal en ayuno (al menos 12 horas) en 2 mg por gramo de peso corporal, y midiendo el nivel de glucosa en sangre del animal en ciertos tiempos durante la prueba de tolerancia a glucosa (por ejemplo, cada 15 minutos durante 240 minutos). Cuando el resultado muestra que el nivel de glucosa en sangre no muestra tendencia a disminuir con el tiempo, en comparación con el de un ratón normal, se evalúa como anormal la tolerancia a la glucosa. Cuando el resultado en los animales tratados muestra tendencia para disminuir con el tiempo en comparación con el de animales no tratados, el pretratamiento con el anticuerpo de la presente invención se clasifica como efectivo.

Método de ejemplo de evaluación de tolerancia a glucosa

La tolerancia a la glucosa de los animales en cuestión, se evalúa a través de la prueba de tolerancia a glucosa.

La prueba de tolerancia a la glucosa se lleva a cabo administrando primero en forma intraperitoneal glucosa a un animal en ayuno durante 12 hora por gramo de peso corporal, y posteriormente se mide el nivel de glucosa en la sangre (sangre periférica) del animal, cada 15 minutos durante 240 minutos. El nivel de glucosa en sangre se mide a través del método antes mencionado. Cuando el resultado muestra que el nivel de glucosa en sangre no exhibe tendencia a disminuir con el tiempo en comparación con la de un animal normal, se evalúa como anormal la tolerancia a la glucosa. Se evalúa una disminución más rápida con el tiempo en modelos animales de T2D tratados en comparación con no tratados como un signo de eficiencia del tratamiento de la presente invención.

(vi) Sensibilidad a Insulina

Los modelos animales de T2D tratados y no tratados y los animales se probaron para sensibilidad anormal a insulina.

Se puede confirmar si la sensibilidad a insulina en un animal es normal o anormal a través de una prueba de sensibilidad a insulina. La prueba de sensibilidad a insulina se puede llevar a cabo según un procedimiento convencional conocido para los expertos en la técnica, por ejemplo, administrando en forma intraperitoneal insulina a un animal en ayuno en 12 horas en 0.5-0.85 U por kg de peso corporal, y midiendo el nivel de glucosa en sangre del animal en ciertos tiempos durante la prueba de sensibilidad a insulina (por ejemplo cada 15 minutos durante cada 240 minutos. Cuando el resultado muestra que el nivel de glucosa en sangre no muestra tendencia a disminuir con el tiempo en comparación con el de un ratón normal, se evalúa como anormal la sensibilidad a insulina. Cuando el resultado en los animales tratados muestra tendencia a disminuir con el tiempo en comparación con el de animales son tratados, el tratamiento con los anticuerpos de la presente invención se clasifica como efectivo.

Método de Ejemplo de Evaluación de Sensibilidad a Insulina

La sensibilidad a insulina de los animales en cuestión se evalúan mediante la prueba de sensibilidad a insulina.

La prueba de sensibilidad a insulina se lleva a cabo administrando primero insulina en forma intraperitoneal a un animal en ayuno de 12 horas en 0.5-0.85 U por kg de peso corporal, y posteriormente midiendo el nivel de glucosa en la sangre (sangre periférica) del animal cada 15 minutos durante cada 240 minutos. El nivel de glucosa en sangre se mide a través del método antes mencionado. Cuando el resultado muestra que el nivel de glucosa en sangre no exhibe tendencia a disminuir con el tiempo en comparación con el de un animal normal, la sensibilidad a insulina se evalúa como anormal. Una disminución más rápida con el tiempo en los modelos animales de T2D tratados en comparación con no tratados, se evalúa como un signo de eficiencia de un tratamiento de la presente invención.

(vii) Otros

Evaluación de polidipsia y poliuria

Los modelos animales de diabetes tipo II se prueban para mostrar tendencias de beber agua en forma incrementada y de orinar en forma incrementada, después de la generación de diabetes y durante el tratamiento de anticuerpos de la presente invención. la tendencia incrementada de beber agua puede confirmarse, por ejemplo, monitoreando cuidadosamente el rango de disminución en el volumen de agua en una botella de agua colocada en una jaula de

crianza y comparándola con la de un animal de cepa normal y con la de animales no tratados. Además, la tendencia incrementada a orinar, se puede confirmar, por ejemplo, observando el grado de humedad de una lámina en el piso en la jaula de crianza y comparándola tal como se indicó anteriormente.

5 Evaluación de la Presencia o Ausencia de Tendencia a Obesidad a Ratones

Los pesos corporales de modelos animales de T2D tratados, no tratados y animales normales se miden y se comparan. El peso disminuido en animales tratados en comparación con animales no tratados y/o el peso comparable de animales tratados y normales, se evalúa con un signo de eficiencia para el tratamiento de la presente invención.

10 2) Revisión Histopatológica

Se fijó el tejido pancreático de animales con diabetes Tipo II de controles de modelo T2D no tratados y animales normales, se incrustó parafina y se manchó y analizó según un método del Ejemplo 4 para depósitos amiloides de amilina en células- β de islote pancreático (islote de Langerhans). En forma similar, se evaluó la apoptosis de célula- β y supervivencia de célula- β mediante inmunomanchado utilizando marcadores adecuados (por ejemplo, TÚNEL y manchado de caspasa-3 disociada para apoptosis y manchado de insulina para área de célula- β). Una disminución de los depósitos amiloides y/o apoptosis de célula- β y/o un incremento en la supervivencia de célula- β en islotes pancreáticos en animales tratados en comparación con animales no tratados o niveles comparables en animales tratados y animales normales, se evaluó como un signo de eficiencia de los métodos preventivos y/o terapéutico de la presente invención.

20 3) Alojamiento de animales

Los modelos animales de diabetes Tipo II se mantuvieron bajo condiciones SPF y según lo descrito previamente (Hull *et al.* (2003), Diabetes 52: 372-379; Butler *et al.* (2003), Diabetes 52: 2304-2314; Butler *et al.* (2004), Diabetes 53: 1509-1516). A las 6 semanas de edad, se asignaron ratones h-IAPP (hemocigotos)/C57BL/6/DBA a una dieta con alto contenido de grasa mostrada para promover la formación amiloide de islote (Hull *et al.* (2003), Diabetes 52: 372-379).

30 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Neurimmune Holding AG

<120> ANTICUERPOS ESPECÍFICOS DE POLIPÉPTIDO AMILOIDE DE ISLOTES HUMANOS (HIAPP) Y USOS DE LOS MISMOS

<130> NE30A40/P-WO

<150> EP12184134.0

<151> 2012-09-12

<160> 71

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 37

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(37)

<223> La secuencia de aminoácidos de 37 aminoácidos de IAPP humano con un puente disulfuro entre los residuos de cisteína 2 y 7 y un extremo c-terminal amidado

<220>

<221> DISULFURO

<222> (2)..(7)
 <223> Puente disulfuro entre los residuos de cisteína 2 y 7
 <400> 1
 5 Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu
 1 5 10 15
 10 Val His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Ala Ile Leu Ser Ser Thr Asn Val
 20 25 30
 15 Gly Ser Asn Thr Tyr
 35
 <210> 2
 <211> 89
 20 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 25 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(89)
 <223> Precursor de hIAPP de 89 aminoácidos producido en células beta
 pancreáticas
 30 <300>
 <308> UniProtID/P10997
 <309> 1989-07-01
 <313> (1)..(89)
 35 <400> 2
 Met Gly Ile Leu Lys Leu Gln Val Phe Leu Ile Val Leu Ser Val Ala
 1 5 10 15
 40 Leu Asn His Leu Lys Ala Thr Pro Ile Glu Ser His Gln Val Glu Lys
 20 25 30
 45 Arg Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe
 35 40 45
 50 Leu Val His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Ala Ile Leu Ser Ser Thr Asn
 50 55 60
 Val Gly Ser Asn Thr Tyr Gly Lys Arg Asn Ala Val Glu Val Leu Lys
 65 70 75 80
 55 Arg Glu Pro Leu Asn Tyr Leu Pro Leu
 85
 60 <210> 3

<211> 67
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(67)
 <223> PreproIAPP se escinde rápidamente después de la traducción en un pro-
 10 polipéptido amiloide de islotes (proIAPP)

<400> 3

15 Thr Pro Ile Glu Ser His Gln Val Glu Lys Arg Lys Cys Asn Thr Ala
 1 5 10 15

Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu Val His Ser Ser Asn
 20 25 30

Asn Phe Gly Ala Ile Leu Ser Ser Thr Asn Val Gly Ser Asn Thr Tyr
 35 40 45

25 Gly Lys Arg Asn Ala Val Glu Val Leu Lys Arg Glu Pro Leu Asn Tyr
 50 55 60

30 Leu Pro Leu
 65

35 <210> 4
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> epítipo lineal reconocido por el anticuerpo NI-203.19H8

45 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(7)
 <223> epítipo lineal único reconocido por el anticuerpo NI-203.19H8

<400> 4

50 Ser Ser Asn Asn Phe Gly Ala
 1 5

55 <210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> epítipo lineal único reconocido por el anticuerpo NI-203.26C11

<220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(7)
 5 <223> epítipo lineal único reconocido por el anticuerpo NI-203.26C11
 <400> 5
 Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala
 10 1 5
 <210> 6
 <211> 10
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> PÉPTIDO 6 del pepsan que cubre los aminoácidos 16-25 de IAPP
 20
 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(10)
 25 <223> PÉPTIDO 6 del pepsan que cubre los aminoácidos 16-25 de IAPP
 <400> 6
 Leu Val His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Ala
 30 1 5 10
 <210> 7
 <211> 22
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> péptido sintético derivado de proIAPP humano (fragmento N-terminal)
 40
 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(22)
 45 <223> péptido sintético derivado de proIAPP humano (fragmento N-terminal)
 <400> 7
 Thr Pro Ile Glu Ser His Gln Val Glu Lys Arg Lys Cys Asn Thr Ala
 50 1 5 10 15
 Thr Cys Ala Thr Gln Arg
 55 20
 <210> 8
 <211> 10
 <212> PRT
 60 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> PÉPTIDO 7 del pepscan que comprende los aminoácidos 19-28 de hIAPP

5 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(10)
 <223> PÉPTIDO 7 del pepscan que comprende los aminoácidos 19-28 de hIAPP

10 <400> 8
 Ser Ser Asn Asn Phe Gly Ala Ile Leu Ser
 1 5 10

15 <210> 9
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> PÉPTIDO 1 del pepscan que comprende los aminoácidos 1-10 de IAPP humano

25 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(10)
 <223> PÉPTIDO 1 del pepscan que comprende los aminoácidos 1-10 de IAPP humano

30 <400> 9
 Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln
 1 5 10

35 <210> 10
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> PÉPTIDO 2 del pepscan que comprende los aminoácidos 4-13 of IAPP humano

45 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(10)
 <223> PÉPTIDO 2 del pepscan que comprende los aminoácidos 4-13 of IAPP humano

50 <400> 10
 Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala
 1 5 10

55 <210> 11
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

60

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(363)
 <223> secuencia de la cadena pesada variable (VH) de NI-203.9A2-VH, en la que
 5 la Val en la posición 5 también puede ser Leu

<220>
 <221> Región V
 <222> (76)..(93)
 10 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR1

<220>
 <221> Región V
 <222> (148)..(197)
 15 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR2

<220>
 <221> Región V
 <222> (295)..(330)
 20 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR3

<400> 11
 gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg 48
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 25 1 5 10 15

tcc ctg agg ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acg ttt agc acc ttt 96
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Phe
 30 20 25 30

gcc atg agc tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtc 144
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 35 40 45

tca act att agt ggt agt ggt gat aat aca tac tat gca gac tcc ctg 192
 Ser Thr Ile Ser Gly Ser Gly Asp Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Leu
 50 55 60

aag ggc cgg ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac aca cta tat 240
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 40 65 70 75 80

ctg caa gtg aac agc ctg aga ccc gag gac acg gcc gtt tat tac tgt 288
 Leu Gln Val Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 45 85 90 95

gcg aaa agt ccc tcg tca ctt ctg gcc acc tac ttt gac tac tgg ggc 336
 Ala Lys Ser Pro Ser Ser Leu Leu Ala Thr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 50 100 105 110

cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tcg 363
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 55 115 120

<210> 12
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 60

<400> 12

1 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 5 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Phe
 10 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 15 Ser Thr Ile Ser Gly Ser Gly Asp Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Leu
 20 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 25 Leu Gln Val Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 30 Ala Lys Ser Pro Ser Ser Leu Leu Ala Thr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 35 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 <210> 13
 <211> 318
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(318)
 <223> secuencia de la cadena ligera variable (VK) de NI-203.9A2-VL, en la que
 45 Glu en la posición 1 también puede ser Asp, Val en la posición 3 también puede
 ser Gln y Leu en la posición 4 también puede ser Met
 <220>
 <221> Región V
 <222> (70)..(102)
 50 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VK-CDR1
 <220>
 <221> Región V
 <222> (147)..(168)
 55 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VK-CDR2
 <220>
 <221> Región V
 <222> (265)..(288)
 60 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VK-CDR3

ES 2 687 520 T3

[illegible]

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

5 <210> 15
<211> 366
<212> ADN
<213> Homo sapiens

10 <220>
<221> CDS
<222> (1)..(366)
<223> secuencia de cadena pesada variable (VH) de NI-203.19H8-VH

15 <220>
<221> Región V
<222> (76)..(105)
<223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR1

20 <220>
<221> Región V
<222> (148)..(198)
<223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR2

25 <220>
<221> Región V
<222> (295)..(333)
<223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR3

30 <400> 15
gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg acg 48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Thr
1 5 10 15

35 tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcg tct ggg ttc acc ttc agc agt tat 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

40 ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggc ctg gag tgg gtg 144
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

45 gca att ata tgg tat gat gga agt aag gaa tat tat gca gac tcc ctg 192
Ala Ile Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Glu Tyr Tyr Ala Asp Ser Leu
50 55 60

50 aag ggc cga gtc acc atc tcc aga gac aat tcc gag aac act ctc tat 240
Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Glu Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

55 ctg caa ctg cac acc ctg aga gtc gag gac acg gct gtg tat ttc tgt 288
Leu Gln Leu His Thr Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

60 ggc agg aca atc gca tcg gcc acc gtg gac cac ggt atg gac gtc tgg 336
Ala Arg Thr Ile Ala Ser Ala Thr Val Asp His Gly Met Asp Val Trp
100 105 110

60 ggc caa ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tcg 366
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

5 <210> 16
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 16
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Thr
 1 5 10 15

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

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

25 Ala Ile Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Glu Tyr Tyr Ala Asp Ser Leu
 50 55 60

30 Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Glu Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

35 Leu Gln Leu His Thr Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

40 Ala Arg Thr Ile Ala Ser Ala Thr Val Asp His Gly Met Asp Val Trp
 100 105 110

45 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

45 <210> 17
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

50 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(321)
 <223> secuencia de cadena ligera variable (VK) de NI-203.19H8-VL

55 <220>
 <221> Región V
 <222> (70)..(102)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VK-CDR1

60 <220>
 <221> Región V
 <222> (147)..(168)

<223> región determinante de complementariedad (CDR) VK-CDR2

<220>
 <221> Región V
 5 <222> (265)..(291)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VK-CDR3

<400> 17

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

<210> 18
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 18

45	Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
	1 5 10 15
50	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser His Asp Ile Ser Thr Trp
	20 25 30
55	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile
	35 40 45
60	Phe Gly Ala Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Ser Pro Arg Phe Ser Gly
	50 55 60
65	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
	65 68

	65				70					75					80	
5	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Thr	Asn	Asn	Phe	Pro	Pro
					85					90					95	
10	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Arg	Leu	Glu	Ile	Lys					
				100					105							
	<210>	19														
	<211>	363														
	<212>	ADN														
15	<213>	Homo sapiens														
	<220>															
	<221>	CDS														
20	<222>	(1)..(363)														
	<223>	secuencia de cadena pesada variable (VH) de NI-203.26C11-VH														
	<220>															
	<221>	Región V														
25	<222>	(76)..(111)														
	<223>	región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR1														
	<220>															
	<221>	Región V														
30	<222>	(154)..(201)														
	<223>	región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR2														
	<220>															
	<221>	Región V														
35	<222>	(298)..(330)														
	<223>	región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR3														
	<400>	19														
40	cag	gtg	cag	ctg	cag	gag	tcg	ggc	cca	gga	ttg	gtg	aag	cct	tct	cag
	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Gln
	1				5					10					15	
	acc	ctg	tcc	ctc	acc	tgc	act	gtc	tct	ggg	ggc	tcc	atc	agc	agt	ggg
45	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Gly	Ser	Ile	Ser	Ser	Gly
				20					25					30		
	aat	tac	tac	tgg	acc	tgg	atc	cgg	cag	ccc	gcc	ggg	aag	gga	ctg	gag
	Asn	Tyr	Tyr	Trp	Thr	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Ala	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu
			35					40					45			
50	tgg	att	ggg	cat	atc	tat	tcc	agt	ggg	acc	acc	aat	tac	aac	ccc	tcc
	Trp	Ile	Gly	His	Ile	Tyr	Ser	Ser	Gly	Thr	Thr	Asn	Tyr	Asn	Pro	Ser
		50					55					60				
55	ctc	gag	agt	cga	gtc	acc	att	tca	gta	gac	acg	tcc	aag	aac	cag	ttc
	Leu	Glu	Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe
	65				70					75					80	
60	tcc	ctg	agc	ctg	aac	tct	gtg	acc	gcc	gca	gac	acg	gcc	gtt	tat	tac
	Ser	Leu	Ser	Leu	Asn	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr
					85					90					95	

ES 2 687 520 T3

```

    tgt gcg aga cca ctg gct aca gtt ccg gat gct ttt aat atc tgg ggc      336
    Cys Ala Arg Pro Leu Ala Thr Val Pro Asp Ala Phe Asn Ile Trp Gly
    100      105      110

5   caa ggg aca atg gtc acc gtc tct tcg      363
    Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
    115      120

10  <210>  20
    <211>  121
    <212>  PRT
    <213>  Homo sapiens

15  <400>  20

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

20  Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
    20      25      30

25  Asn Tyr Tyr Trp Thr Trp Ile Arg Gln Pro Ala Gly Lys Gly Leu Glu
    35      40      45

30  Trp Ile Gly His Ile Tyr Ser Ser Gly Thr Thr Asn Tyr Asn Pro Ser
    50      55      60

35  Leu Glu Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
    65      70      75      80

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

40  Cys Ala Arg Pro Leu Ala Thr Val Pro Asp Ala Phe Asn Ile Trp Gly
    100      105      110

45  Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
    115      120

50  <210>  21
    <211>  333
    <212>  ADN
    <213>  Homo sapiens

55  <220>
    <221>  CDS
    <222>  (1)..(333)
    <223>  secuencia de cadena ligera variable (VK) de NI-203.26C11-VL

60  <220>

```

<221> Región V
 <222> (70)..(114)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VK-CDR1

5 <220>
 <221> Región V
 <222> (160)..(180)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VK-CDR2

10 <220>
 <221> Región V
 <222> (277)..(303)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VK-CDR3

15 <400> 21
 gaa att gtg atg act cag tct cca gac tcc ctg gct gtg tct ctg ggc 48
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

20 gag agg gcc acc atc aag tgc aag tcc agc cag agt gtt tta tac agc 96
 Glu Arg Ala Thr Ile Lys Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
 20 25 30

25 aat aag aac ttc tta gct tgg tac cag cag aaa cca gga cag cct cct 144
 Asn Lys Asn Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

30 aaa tta ctc att tac tgg gca tct act cgg gaa tcc ggg gtc cct gac 192
 Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60

35 cga ttc agt ggc agc ggg tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc 240
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80

40 agc ctg cag gct gaa gat gtg gca gtt tat tac tgt cag cag tat tat 288
 Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr
 85 90 95

45 agt aat cct aac act ttt ggc cag ggg acc aag gtg gag atc aaa 333
 Ser Asn Pro Asn Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

45 <210> 22
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

50 <400> 22
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

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

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

5 Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 10 Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr
 85 90 95
 15 Ser Asn Pro Asn Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110
 20 <210> 23
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 25 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(372)
 <223> secuencia de cadena pesada variable (VH) de NI-203.8E3-VH
 30 <220>
 <221> Región V
 <222> (76)..(105)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR1
 35 <220>
 <221> Región V
 <222> (148)..(198)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR2
 40 <220>
 <221> Región V
 <222> (295)..(339)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR3
 45 <400> 23
 cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gct gaa gtg aag aaa cct ggg tcc 48
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 50 tcg gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct gga ggc acc ttc agt agt cac 96
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser His
 20 25 30
 55 act atc agc tgg gtg cga cag gcc cct ggg caa ggg ctt gag tgg atg 144
 Thr Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 60 gga ggg atc atc ccc atc ttt ggt aca gca aac tac gca cag aag ttt 192
 Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

ES 2 687 520 T3

	cag gac aga gtc acg gtt acc gcg gac aaa tcc acg aat aca gcc tac	240
	Gln Asp Arg Val Thr Val Thr Ala Asp Lys Ser Thr Asn Thr Ala Tyr	
	65 70 75 80	
5	atg gag ttg agt agc ctc aga cct gag gac acg gcc gtg tat tac tgt	288
	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
	85 90 95	
10	gcg aag ggg gaa ctg gaa cca cga atc ctc tac tac tac ggt atg gac	336
	Ala Lys Gly Glu Leu Glu Pro Arg Ile Leu Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp	
	100 105 110	
15	gtc tgg ggc cga ggg acc acg gtc acc gtc tcc tcg	372
	Val Trp Gly Arg Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser	
	115 120	
	<210> 24	
	<211> 124	
20	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 24	
25	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser	
	1 5 10 15	
30	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser His	
	20 25 30	
35	Thr Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met	
	35 40 45	
40	Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe	
	50 55 60	
45	Gln Asp Arg Val Thr Val Thr Ala Asp Lys Ser Thr Asn Thr Ala Tyr	
	65 70 75 80	
50	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
	85 90 95	
55	Ala Lys Gly Glu Leu Glu Pro Arg Ile Leu Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp	
	100 105 110	
60	Val Trp Gly Arg Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser	
	115 120	
	<210> 25	
	<211> 336	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(336)
 5 <223> secuencia de cadena ligera variable (VK) de NI-203.8E3-VK

<220>
 <221> Región V
 <222> (70)..(117)
 10 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VK-CDR1

<220>
 <221> Región V
 <222> (163)..(183)
 15 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VK-CDR2

<220>
 <221> Región V
 <222> (280)..(306)
 20 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VK-CDR3

<400> 25
 gat gtt gtg atg act cag tct cca ctc tcc ctg ccc gtc acc ctt gga 48
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15

cag ccg gcc tcc atc tcc tgc agg tct agt caa agc ctc gta tac agt 96
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser
 20 25 30

gat gga aac acc tac ttg aat tgg ttt cac cag agg cca ggc caa tct 144
 Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe His Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

cca agg cgg cta att tat aag gtt tct aat cgt gac tct ggg gtc cca 192
 Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60

gac aga ttc agc ggc agt ggg tca ggc act gat ttc aca ctg aaa atc 240
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

agc agg gtg gag gct gag gat gtt ggg gtt tat tac tgc atg caa ggt 288
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly
 85 90 95

tca aat tgg cca ggg acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa 336
 Ser Asn Trp Pro Gly Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

50

<210> 26
 <211> 112
 <212> PRT
 55 <213> Homo sapiens

<400> 26
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15

60

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

5 Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe His Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

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

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

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

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

25 <210> 27
<211> 372
<212> ADN
<213> Homo sapiens

30 <220>
<221> CDS
<222> (1)..(372)
35 <223> secuencia de cadena pesada variable (VH) de NI-203.11B12-VH

<220>
<221> Región V
<222> (76)..(105)
40 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR1

<220>
<221> Región V
<222> (148)..(198)
45 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR2

<220>
<221> Región V
<222> (295)..(339)
50 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR3

<400> 27
cag gtg cag ctg gtg caa tct ggg gct gag gtg aag aag cct ggg gcc 48
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
55 1 5 10 15

tca atg aag gtt tcc tgc aag gca tct gga tac acc ttc acc aac tac 96
Ser Met Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

60 tat tta cac tgg gtg cga cag gcc cct gga caa gga ctt gag tgg atg 144
75

ES 2 687 520 T3

	Tyr	Leu	His 35	Trp	Val	Arg	Gln	Ala 40	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu 45	Glu	Trp	Met	
5	gga Gly	ata Ile	atc Ile	aac Asn	cct Pro	agt Ser	gct Ala 55	ggt Gly	agc Ser	aca Thr	agc Ser	tac Tyr 60	gca Ala	cag Gln	aag Lys	ttc Phe	192
10	cag Gln 65	ggc Gly	aga Arg	gtc Val	acc Thr	atg Met 70	acc Thr	agg Arg	gac Asp	acg Thr	tcc Ser 75	acg Thr	agc Ser	aca Thr	gtc Val	tac Tyr 80	240
15	atg Met	gaa Glu	ctg Leu	agc Ser	agc Ser 85	ctg Leu	aaa Lys	tct Ser	gaa Glu	gac Asp 90	acg Thr	gcc Ala	gtc Val	tat Tyr	tac Tyr 95	tgt Cys	288
	gcg Ala	aga Arg	gat Asp	tcc Ser 100	gct Ala	ggg Gly	ata Ile	cag Gln	ata Ile 105	tgg Trp	ttc Phe	agg Arg	gat Asp	gct Ala 110	ttt Phe	gat Asp	336
20	atc Ile	tgg Trp	ggc Gly 115	caa Gln	ggg Gly	aca Thr	atg Met	gtc Val 120	acc Thr	gtc Val	tct Ser	tcg Ser					372
25	<210>	28															
	<211>	124															
	<212>	PRT															
	<213>	Homo sapiens															
30	<400>	28															
	Gln 1	Val	Gln	Leu	Val 5	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu 10	Val	Lys	Lys	Pro	Gly 15	Ala	
35	Ser	Met	Lys	Val 20	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser 25	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr 30	Asn	Tyr	
40	Tyr	Leu	His 35	Trp	Val	Arg	Gln	Ala 40	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu 45	Glu	Trp	Met	
45	Gly 50	Ile	Ile	Asn	Pro	Ser	Ala 55	Gly	Ser	Thr	Ser	Tyr 60	Ala	Gln	Lys	Phe	
50	Gln 65	Gly	Arg	Val	Thr	Met 70	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser 75	Thr	Ser	Thr	Val	Tyr 80	
	Met	Glu	Leu	Ser	Ser 85	Leu	Lys	Ser	Glu	Asp 90	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr 95	Cys	
55	Ala	Arg	Asp	Ser 100	Ala	Gly	Ile	Gln	Ile 105	Trp	Phe	Arg	Asp	Ala 110	Phe	Asp	
60	Ile	Trp	Gly 115	Gln	Gly	Thr	Met	Val 120	Thr	Val	Ser	Ser					

5 <210> 29
 <211> 333
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(333)
 <223> secuencia de cadena ligera variable (VL) de NI-203.11B12-VL

15 <220>
 <221> Región V
 <222> (67)..(102)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR1

20 <220>
 <221> Región V
 <222> (148)..(168)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR2

25 <220>
 <221> Región V
 <222> (277)..(303)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR3

30 <400> 29
 cag cct gtg ctg act cag cca ccc tct gcc tct gct tcc ctg gga tcc 48
 Gln Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ser
 1 5 10 15

35 tcg gtc aag ctc acc tgc act ctg aac agt ggg cac agt agc tac acc 96
 Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Asn Ser Gly His Ser Ser Tyr Thr
 20 25 30

40 atc gca tgg cat cag cag cag cca ggg aag gcc cct cgg tac ttg atg 144
 Ile Ala Trp His Gln Gln Gln Pro Gly Lys Ala Pro Arg Tyr Leu Met
 35 40 45

45 aag gtt gaa cat aat gga aac tac aac aag ggg agc gga ctt cct gat 192
 Lys Val Glu His Asn Gly Asn Tyr Asn Lys Gly Ser Gly Leu Pro Asp
 50 55 60

50 cgc ttc tca ggc tcc agc tct ggg gct gac cgc tac ctc gcc atc tcc 240
 Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Ser
 65 70 75 80

55 aac ctc cag tct gag gat gag gct gat tat tac tgt gag acc tgg gac 288
 Asn Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Glu Thr Trp Asp
 85 90 95

60 act agc act agg gtc ttc ggc gga ggg acc aag ctg acc gtc cta 333
 Thr Ser Thr Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

60 <210> 30
 <211> 111
 <212> PRT

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

<210> 31
 <211> 384
 35 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 40 <221> CDS
 <222> (1)..(384)
 <223> secuencia de cadena pesada variable (VH) NI-203.205F8-VH

<220>
 45 <221> Región V
 <222> (76)..(105)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR1

<220>
 50 <221> Región V
 <222> (157)..(201)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR2

<220>
 55 <221> Región V
 <222> (298)..(351)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR3

<400> 31
 60 cag gtg cag ctg cag gag tcg ggc ccc gga ctg gtg aag cct tcg gag
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

ES 2 687 520 T3

	1		5		10		15										
5	acc	ctg	tcc	ctc	acc	tgc	act	gtc	tct	ggg	gac	tcc	gtc	agc	agt	ggg	96
	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Asp	Ser	Val	Ser	Ser	Gly	
				20					25					30			
10	agt	tac	tac	tgg	agc	tgg	atc	cgg	cag	ccc	cca	ggg	aag	gga	ctg	gag	144
	Ser	Tyr	Tyr	Trp	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	
			35					40					45				
15	tgg	att	ggg	tat	atc	tat	tac	agt	ggg	agc	acc	aac	tac	aac	ccc	tcc	192
	Trp	Ile	Gly	Tyr	Ile	Tyr	Tyr	Ser	Gly	Ser	Thr	Asn	Tyr	Asn	Pro	Ser	
		50					55					60					
20	ctc	aag	agt	cga	gtc	acc	ata	tca	gta	gac	acg	tcc	aag	aac	cag	ttc	240
	Leu	Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	
	65					70				75						80	
25	tcc	ctg	aag	ctg	agc	tct	gtg	acc	gct	gcg	gac	acg	gcc	gta	tat	tcc	288
	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Ser	
					85					90					95		
30	tgt	gcg	aga	gtc	ccc	tat	ggg	tac	gga	tat	agg	ggc	tac	gat	ggg	gct	336
	Cys	Ala	Arg	Val	Pro	Tyr	Gly	Tyr	Gly	Tyr	Arg	Gly	Tyr	Asp	Gly	Ala	
				100					105					110			
35	tgg	tac	ttt	gac	tac	tgg	ggc	cag	gga	acc	ctg	gtc	acc	gtc	tcc	tcg	384
	Trp	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	
			115					120					125				
	<210>	32															
	<211>	128															
	<212>	PRT															
	<213>	Homo sapiens															
	<400>	32															
40	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu	
	1				5					10				15			
45	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Asp	Ser	Val	Ser	Ser	Gly	
				20					25					30			
50	Ser	Tyr	Tyr	Trp	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	
			35					40					45				
55	Trp	Ile	Gly	Tyr	Ile	Tyr	Tyr	Ser	Gly	Ser	Thr	Asn	Tyr	Asn	Pro	Ser	
		50					55					60					
60	Leu	Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	
	65					70				75						80	
	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Ser	
					85					90					95		

	Cys	Ala	Arg	Val	Pro	Tyr	Gly	Tyr	Gly	Tyr	Arg	Gly	Tyr	Asp	Gly	Ala		
				100					105					110				
5	Trp	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser		
			115					120					125					
10	<210>	33																
	<211>	318																
	<212>	ADN																
	<213>	Homo sapiens																
15	<220>																	
	<221>	CDS																
	<222>	(1)..(318)																
	<223>	secuencia de cadena ligera variable (VK) de NI-203.205F8-VL																
20	<220>																	
	<221>	Región V																
	<222>	(69)..(102)																
	<223>	región determinante de complementariedad (CDR) VK-CDR1																
25	<220>																	
	<221>	Región V																
	<222>	(148)..(168)																
	<223>	región determinante de complementariedad (CDR) VK-CDR2																
30	<220>																	
	<221>	Región V																
	<222>	(265)..(288)																
	<223>	región determinante de complementariedad (CDR) VK-CDR3																
35	<400>	33																
	gaa	att	gtg	ttg	aca	cag	tct	cca	gcc	acc	ctg	tct	ttg	tct	cca	ggg		48
	Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly		
	1				5					10					15			
40	gaa	aga	gcc	acc	ctc	tcc	tgc	agg	gcc	agt	cag	agt	gtt	agc	agc	tac		96
	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Tyr		
				20					25					30				
45	tta	gcc	tgg	tac	caa	cag	aaa	cct	ggc	cag	gct	ccc	agg	ctc	ctc	atc		144
	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile		
			35					40					45					
50	tat	gat	gca	tcc	aac	agg	gcc	act	ggc	atc	cca	gcc	agg	ttc	agt	ggc		192
	Tyr	Asp	Ala	Ser	Asn	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly		
		50					55					60						
55	agt	ggg	tct	ggg	aca	gac	ttc	act	ctc	acc	atc	agc	agc	cta	gag	cct		240
	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu	Pro		
	65					70				75								

Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

5 <210> 34
<211> 106
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10 <400> 34

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

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

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

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

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

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

35 Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

40 <210> 35
<211> 357
<212> ADN
<213> Homo sapiens

45 <220>
<221> CDS
<222> (1)..(357)
<223> secuencia de cadena pesada variable (VH) de NI-203.9B3-VH

50 <220>
<221> Región V
<222> (76)..(105)
<223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR1

55 <220>
<221> Región V
<222> (148)..(198)
<223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR2

60 <220>

```
<221> Región V
<222> (295)..(324)
<223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR3
```

[illegible]

40	<210>	36
	<211>	119
	<212>	PRT
	<213>	Homo sapiens

45 <400> 36
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
50 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
55 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
60 Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Thr Lys Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

ES 2 687 520 T3

	Lys Gly Arg Phe Thr Thr Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Ser	
	65 70 75 80	
5	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys	
	85 90 95	
10	Ala Arg Gly Phe Ser Ser Ser Trp Glu Phe Gly Phe Trp Gly Gln Gly	
	100 105 110	
	Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
15	115	
	<210> 37	
	<211> 330	
	<212> ADN	
20	<213> Homo sapiens	
	<220>	
	<221> CDS	
25	<222> (1)..(330)	
	<223> secuencia de cadena ligera variable (VL) de NI-203.9B3-VL	
	<220>	
	<221> Región V	
30	<222> (67)..(108)	
	<223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR1	
	<220>	
	<221> Región V	
35	<222> (154)..(174)	
	<223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR2	
	<220>	
	<221> Región V	
40	<222> (271)..(300)	
	<223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR3	
	<400> 37	
45	cag tct gcc ctg act cag cct ccc tcc gcg tcc ggg tct cct gga cag	48
	Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln	
	1 5 10 15	
	tca gtc acc atc tcc tgc act gga acc agc ggt tac att tat ggt tat	96
50	Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Gly Tyr Ile Tyr Gly Tyr	
	20 25 30	
	aac tat gtc tcc tgg tac caa cag cac ccc ggc aaa gcc ccc aaa gtc	144
55	Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val	
	35 40 45	
	atg att tat gag gtc act aag cgg ccc tca ggg gtc cct gat cgc ttc	192
	Met Ile Tyr Glu Val Thr Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe	
	50 55 60	
60	tct ggc tcc aag tct ggc aac acg gcc tcc ctg acc gtc tct ggg ctc	240
	Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu	
	83	

ES 2 687 520 T3

65 70 75 80

5 cag gct gag gat gag gct gtt tat tac tgc gcc tca tat gca ggc agc 288
Gln Ala Glu Asp Glu Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Tyr Ala Gly Ser 85 90 95

10 aac aat gta gta ttc ggc gga ggg acc aag ctg acc gtc cta 330
Asn Asn Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu 100 105 110

15 <210> 38
<211> 110
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20 Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

25 Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Gly Tyr Ile Tyr Gly Tyr
20 25 30

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

35 Met Ile Tyr Glu Val Thr Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

40 Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu
65 70 75 80

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

50 Asn Asn Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

55 <210> 39
<211> 360
<212> ADN
<213> Homo sapiens

60 <220>
<221> CDS
<222> (1)..(360)
<223> secuencia de cadena pesada variable (VH) de NI-203.1D10-VH

<220>
<221> Región V
<222> (76)..(105)
<223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR1

<220>
 <221> Región V
 <222> (151)..(198)
 5 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR2

 <220>
 <221> Región V
 <222> (295)..(327)
 10 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR3

 <400> 39
 gag gtg cag ctg gtg cag tct ggc gca gaa gtg aag aag ccc ggg gag 48
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 15 1 5 10 15

 tct ctc aga atc tcc tgt aag gct tct gga tac agc ttc acc aac tct 96
 Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Ser
 20 20 25 30

 tgg atc gcc tgg gtg cgc cag atg ccc ggg aaa ggc ctg gac tac gtg 144
 Trp Ile Ala Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Asp Tyr Val
 35 35 40 45

 ggt atc atc tat cct ggt gac tct gat acc aag tat ggc ccg tcc ttc 192
 Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Lys Tyr Gly Pro Ser Phe
 50 55 60

 caa ggc cac gtc act atc tca gcc gac aac ttc gcc aac acc gcc tac 240
 Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Asn Phe Ala Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

 ctg cag tgg agc agc ctg aag gcc tcc gac acc gcc atc tat tat tgt 288
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
 85 90 95

 gcg aga cgg gca gca gcg gct att aac tgg ttc gac tcc tgg ggc cag 336
 Ala Arg Arg Ala Ala Ala Ala Ile Asn Trp Phe Asp Ser Trp Gly Gln
 100 105 110

 gga acc ctg gtc acc gtc tcc tcg 360
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

 45
 <210> 40
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 50
 <400> 40

 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 55 1 5 10 15

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

 60 Trp Ile Ala Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Asp Tyr Val
 85

ES 2 687 520 T3

	35	40	45	
5	Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Lys Tyr Gly Pro Ser Phe 50 55 60			
10	Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Asn Phe Ala Asn Thr Ala Tyr 65 70 75 80			
15	Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys 85 90 95			
20	Ala Arg Arg Ala Ala Ala Ala Ile Asn Trp Phe Asp Ser Trp Gly Gln 100 105 110			
25	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser 115 120			
30	<210> 41 <211> 333 <212> ADN <213> Homo sapiens			
35	<220> <221> CDS <222> (1)..(333) <223> secuencia de cadena ligera variable (VK) de NI-203.1D10-VL			
40	<220> <221> Región V <222> (70)..(117) <223> región determinante de complementariedad (CDR) VK-CDR1			
45	<220> <221> Región V <222> (163)..(183) <223> región determinante de complementariedad (CDR) VK-CDR2			
50	<220> <221> Región V <222> (280)..(303) <223> región determinante de complementariedad (CDR) VK-CDR3			
55	<400> 41 gac atc cag ttg acc cag tct cca ctc tcc ctg tcc gtc acc cct gga Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly 1 5 10 15			48
60	gag ccg gcc tcc atc tcc tgc agg tct agc cag agc ctc ctg cat cct Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Pro 20 25 30			96
65	aat gga aac gac tat ttg gat tgg tac gtg cag aag cca ggg cag tct Asn Gly Asn Asp Tyr Leu Asp Trp Tyr Val Gln Lys Pro Gly Gln Ser 35 40 45			144

ES 2 687 520 T3

	cca	cag	atc	gtg	atc	tac	atg	ggg	tct	aat	cgg	gcc	gcc	ggg	gtc	cct	192
	Pro	Gln	Ile	Val	Ile	Tyr	Met	Gly	Ser	Asn	Arg	Ala	Ala	Gly	Val	Pro	
5		50					55					60					
	gac	agg	ttc	agt	ggc	agt	gga	tca	ggc	aca	gat	ttt	aca	ctg	aaa	atc	240
	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile	
	65				70					75					80		
10	agc	aga	gtg	gag	gct	gag	gat	gtt	ggg	act	tat	tac	tgc	ctg	caa	gct	288
	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Leu	Gln	Ala	
				85					90					95			
15	cta	cgc	ggg	tac	act	ttt	ggc	cag	ggg	acc	aag	gtg	gaa	atc	aaa		333
	Leu	Arg	Gly	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys		
				100					105					110			
20	<210>	42															
	<211>	111															
	<212>	PRT															
	<213>	Homo sapiens															
25	<400>	42															
	Asp	Ile	Gln	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Ser	Val	Thr	Pro	Gly	
	1				5					10					15		
30	Glu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	His	Pro	
				20					25					30			
35	Asn	Gly	Asn	Asp	Tyr	Leu	Asp	Trp	Tyr	Val	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	
			35					40					45				
40	Pro	Gln	Ile	Val	Ile	Tyr	Met	Gly	Ser	Asn	Arg	Ala	Ala	Gly	Val	Pro	
		50					55					60					
	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile	
	65				70					75					80		
45	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Leu	Gln	Ala	
				85					90						95		
50	Leu	Arg	Gly	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys		
				100					105					110			
55	<210>	43															
	<211>	360															
	<212>	ADN															
	<213>	Homo sapiens															
60	<220>																
	<221>	CDS															

<222> (1)..(360)
 <223> secuencia de cadena pesada variable (VH) de NI-203.2A11-VH

 5 <220>
 <221> Región V
 <222> (76)..(105)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR1

 10 <220>
 <221> Región V
 <222> (148)..(198)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR2

 15 <220>
 <221> Región V
 <222> (295)..(327)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR3

 20 <400> 43
 cag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg ggg 48
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

 25 tcc ctg aga ctc tcc tgt gta gcg tct gga ttc acc ttc agc agt tat 96
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

 30 ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg 144
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

 35 gca ttt gta cgg tat gat gga agt aat aag tac tat gca gac tcc gtg 192
 Ala Phe Val Arg Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

 40 aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac tcg ctg tct 240
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ser Leu Ser
 65 70 75 80

 45 ctt caa atg aac agt ctg aga act gaa gac acg gct gta tat tac tgc 288
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

 45 gcg aaa gaa cag gag gac cac aag gaa gct ttt gac tac tgg ggc cag 336
 Ala Lys Glu Gln Glu Asp His Lys Glu Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

 50 gga acc ctg gtc acc gtc tcc tcg 360
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

 55 <210> 44
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 60 <400> 44
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

5 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 10 Ala Phe Val Arg Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 15 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ser Leu Ser
 65 70 75 80
 20 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 25 Ala Lys Glu Gln Glu Asp His Lys Glu Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 30 <210> 45
 <211> 318
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 35
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(318)
 40 <223> secuencia de cadena ligera variable (VK) de NI-203.2A11-VL
 <220>
 <221> Región V
 <222> (70)..(99)
 45 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VK-CDR1
 <220>
 <221> Región V
 <222> (145)..(165)
 50 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VK-CDR2
 <220>
 <221> Región V
 <222> (262)..(288)
 55 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VK-CDR3
 <400> 45
 gaa att gtg atg aca cag tct cca gcc acc ctg tct gtg tct cca ggg
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 60 1 5 10 15

48

ES 2 687 520 T3

[illegible]

<211> 378
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(378)
 <223> secuencia de cadena pesada variable (VH) de NI-203.10C4-VH, en la que Glu

10 en las posiciones 1 y 6 también puede ser Gln

<220>
 <221> Región V
 <222> (76)..(105)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR1

15

<220>
 <221> Región V
 <222> (148)..(198)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR2

20

<220>
 <221> Región V
 <222> (295)..(345)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR3

25

<400> 47
 gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gct gaa gtg agg aag cct ggg gcc 48
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Arg Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 tca gtg agg gtc tcc tgc cag aca tct gga tac agc gtc acc gac tac 96
 Ser Val Arg Val Ser Cys Gln Thr Ser Gly Tyr Ser Val Thr Asp Tyr
 20 25 30
 tat cta cac tgg gtg cga cag gcc cct gga cag ggc ctt gag tgg atg 144
 Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 gga gtg atg aac ccg agc aat gga aac gtg ggc tac cca cag aag ttt 192
 Gly Val Met Asn Pro Ser Asn Gly Asn Val Gly Tyr Pro Gln Lys Phe
 50 55 60
 cag ggc cga gtc acc atg acc gca gac acg tcc acg ggc aca gtg tac 240
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Gly Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 atg gtg ttg acc ggc ctt acg gct ggg gac acg gcc gtc tac tac tgt 288
 Met Val Leu Thr Gly Leu Thr Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 gcc aga ggc ggg tcc acg ccg ggt cag gaa gta agg agt ccc cac gtc 336
 Ala Arg Gly Gly Ser Thr Pro Gly Gln Glu Val Arg Ser Pro His Val
 100 105 110
 ctt gac ctc tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tcg 378
 Leu Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

60

<210> 48

<211> 126
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 48
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Arg Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 10 Ser Val Arg Val Ser Cys Gln Thr Ser Gly Tyr Ser Val Thr Asp Tyr
 20 25 30
 15 Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 20 Gly Val Met Asn Pro Ser Asn Gly Asn Val Gly Tyr Pro Gln Lys Phe
 50 55 60
 25 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Gly Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Met Val Leu Thr Gly Leu Thr Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 30 Ala Arg Gly Gly Ser Thr Pro Gly Gln Glu Val Arg Ser Pro His Val
 100 105 110
 35 Leu Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125
 40 <210> 49
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 45 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(336)
 <223> secuencia de cadena ligera de variable (VK) de NI-203.10C4-VL, en la que
 Val en la posición 2 también puede ser Ile y Ser en la posición 7 también puede
 50 ser Thr
 <220>
 <221> Región V
 <222> (70)..(117)
 55 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VK-CDR1
 <220>
 <221> Región V
 <222> (163)..(183)
 60 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VK-CDR2

<220>
 <221> Región V
 <222> (280)..(306)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VK-CDR3

5

<400> 49
 gat gtt gtg atg act cag tct ccc ctc tct ctg tcc gtc acc cct gga 48
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

10

cag ccg gcc tcc atc tcc tgc agg tct gat gag agc ctc ctg cat agt 96
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Asp Glu Ser Leu Leu His Ser
 20

15

gat gga agg acc tat ttg tat tgg tat cta cag aag ccc ggc cag cct 144
 Asp Gly Arg Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro
 35 40 45

20

cct cag ctc ctg atc tat gaa gtt tcc aac cgg ttc tcg gga gtg cca 192
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

25

aat agg ttc agt ggc agc ggg tca ggg aca gat ttc aca ctg aaa atc 240
 Asn Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

30

agc cgg gtg gag gct gag gat gtt ggc gtt tat tac tgc atg cag ggt 288
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly
 85 90 95

35

gta cac ttt cct cag acg ttc ggc cag ggg acc aag ctg gag atc aaa 336
 Val His Phe Pro Gln Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 50
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

40

<400> 50
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

45

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Asp Glu Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30

50

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

55

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

60

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

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

5 Val His Phe Pro Gln Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

10 <210> 51
<211> 369
<212> ADN
<213> Homo sapiens

15 <220>
<221> CDS
<222> (1)..(369)
<223> secuencia de la cadena pesada variable (VH) de NI-203.20H9-VH

20 <220>
<221> Región V
<222> (76)..(105)
<223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR1

25 <220>
<221> Región V
<222> (148)..(198)
<223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR2

30 <220>
<221> Región V
<222> (295)..(336)
<223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR3

35 <400> 51
cag gtg cag ctg gtg caa tct ggg tct gag ttg aag aag cct ggg gcc 48
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

40 tca gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct gga tac atc ttc agt aaa cat 96
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Ser Lys His
20 25 30

45 ggt atc aac tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggc ctt gag tgg ata 144
Gly Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

50 gga tgg atc aac acc aat acg ggg aac cca aca tat gcc cag gac ttc 192
Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Asn Pro Thr Tyr Ala Gln Asp Phe
50 55 60

55 aca gga cga ttt gtc ttc tcc ttg gac acc tct gtc agc acg gca tat 240
Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

ctg gag atc agc agc cta aag gct gag gac act gcc gtg tat tac tgt 288
Leu Glu Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

60 gcg aga gaa tca gag ccg att ttt gga gtt atc tat tac atg gac gtc 336
94

Ala Arg Glu Ser Glu Pro Ile Phe Gly Val Ile Tyr Tyr Met Asp Val
100 105 110

5 tgg ggc aaa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tcg 369
Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

10 <210> 52
<211> 123
<212> PRT
<213> Homo sapiens

15 <400> 52
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

20 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Ser Lys His
20 25 30

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

30 Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Asn Pro Thr Tyr Ala Gln Asp Phe
50 55 60

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

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

45 Ala Arg Glu Ser Glu Pro Ile Phe Gly Val Ile Tyr Tyr Met Asp Val
100 105 110

45 Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

50 <210> 53
<211> 321
<212> ADN
<213> Homo sapiens

55 <220>
<221> CDS
<222> (1)..(321)
<223> secuencia de la cadena ligera variable (VK) de NI-203.20H9-VL

60 <220>
<221> Región V
<222> (70)..(102)

<223> región determinante de complementariedad (CDR) VK-CDR1

<220>
 <221> Región V
 5 <222> (148)..(168)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VK-CDR2

<220>
 <221> Región V
 10 <222> (265)..(291)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VK-CDR3

<400> 53
 15 gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga 48
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

gac agc gtc acc atc act tgc cgg gca agc cag agc ata agc act aat 96
 20 Asp Ser Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Thr Asn
 20 25 30

tta aat tgg tat cag aag aaa cca gga caa gcc cct acg gtc ttg atc 144
 Leu Asn Trp Tyr Gln Lys Lys Pro Gly Gln Ala Pro Thr Val Leu Ile
 35 40 45

25 tat gct gcg tcc agt ttg caa ggt ggg gtc cca tca agg ttc agg ggc 192
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Gly Gly Val Pro Ser Arg Phe Arg Gly
 50 55 60

30 cgg gga tct ggg aca tat ttc act ctc acc atc agc ggt ctt caa cct 240
 Arg Gly Ser Gly Thr Tyr Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Pro
 65 70 75 80

35 gaa gat ttt gca act tat tac tgt caa cac aat tac aat gat ttg tgg 288
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Asn Tyr Asn Asp Leu Trp
 85 90 95

acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa 321
 40 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 54
 <211> 107
 45 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 54

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

Asp Ser Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Thr Asn
 55 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Lys Lys Pro Gly Gln Ala Pro Thr Val Leu Ile
 60 35 40 45

ES 2 687 520 T3

	Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	Gln	Gly	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Arg	Gly	
	50						55					60					
5	Arg	Gly	Ser	Gly	Thr	Tyr	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Gly	Leu	Gln	Pro	
	65					70					75					80	
10	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	Asn	Tyr	Asn	Asp	Leu	Trp	
					85					90					95		
	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys						
15				100					105								
	<210>	55															
	<211>	360															
	<212>	ADN															
20	<213>	Homo sapiens															
	<220>																
	<221>	CDS															
25	<222>	(1)..(360)															
	<223>	secuencia de la cadena pesada variable (VH) de NI-203.26D2-VH															
	<220>																
	<221>	Región V															
30	<222>	(76)..(105)															
	<223>	región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR1															
	<220>																
	<221>	Región V															
35	<222>	(148)..(198)															
	<223>	región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR2															
	<220>																
	<221>	Región V															
40	<222>	(295)..(327)															
	<223>	región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR3															
	<400>	55															
45	cag	gtg	cag	ctg	gtg	gag	tct	ggg	gga	ggc	gtg	gtc	cag	cct	ggg	ggg	48
	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	
	1				5					10					15		
	tcc	ctg	aga	ctc	tcc	tgt	gca	gcg	tct	ggg	ttc	acg	ttc	aga	acc	tgt	96
50	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Arg	Thr	Cys	
				20					25					30			
	ggc	atg	cac	tgg	gtc	cgc	cag	gct	cca	ggc	aag	ggg	ctg	gaa	tgg	gtg	144
	Gly	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
			35					40					45				
55	gca	ttt	gtt	cgg	tct	gat	gga	act	act	aga	tat	tac	gca	gac	tcc	ctg	192
	Ala	Phe	Val	Arg	Ser	Asp	Gly	Thr	Thr	Arg	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Leu	
		50					55					60					
60	atg	ggc	cgc	ttc	acc	atc	tcc	aga	gac	aat	tcc	aag	aac	tcg	ctg	tat	240
	Met	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr	
											97						

ES 2 687 520 T3

	65						70						75						80	
5	ctt	caa	atg	aac	agt	ctg	aga	cct	gag	gac	acg	gct	ctt	tat	tac	tgt	288			
	Leu	Gln	Met	Asn	Ser 85	Leu	Arg	Pro	Glu	Asp 90	Thr	Ala	Leu	Tyr	Tyr 95	Cys				
10	gcg	agg	gaa	aag	gag	gat	cac	agg	gaa	gct	ttt	gac	tac	tgg	ggc	cag	336			
	Ala	Arg	Glu	Lys 100	Glu	Asp	His	Arg	Glu 105	Ala	Phe	Asp	Tyr	Trp 110	Gly	Gln				
	gga	acc	ctg	gtc	acc	gtc	tcc	tcg									360			
	Gly	Thr	Leu 115	Val	Thr	Val	Ser	Ser 120												
15																				
	<210>	56																		
	<211>	120																		
	<212>	PRT																		
	<213>	Homo sapiens																		
20																				
	<400>	56																		
25	Gln	val	Gln	Leu	val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	val	val	Gln	Pro	Gly	Gly				
	1				5					10					15					
	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Arg	Thr	Cys				
				20					25					30						
30	Gly	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val				
			35					40					45							
35	Ala	Phe	Val	Arg	Ser	Asp	Gly	Thr	Thr	Arg	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Leu				
		50					55					60								
40	Met	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr				
	65					70					75					80				
	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Leu	Tyr	Tyr	Cys				
					85					90					95					
45	Ala	Arg	Glu	Lys	Glu	Asp	His	Arg	Glu	Ala	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln				
				100					105					110						
50	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser												
			115					120												
55																				
	<210>	57																		
	<211>	318																		
	<212>	ADN																		
	<213>	Homo sapiens																		
60																				
	<220>																			

<221> CDS
 <222> (1)..(318)
 <223> secuencia de cadena ligera variable (VK) de NI-203.26D2-VL

5 <220>
 <221> Región V
 <222> (70)..(99)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VK-CDR1

10 <220>
 <221> Región V
 <222> (145)..(165)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VK-CDR2

15 <220>
 <221> Región V
 <222> (262)..(288)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VK-CDR3

20 <400> 57
 gaa att gtg atg aca cag tct cca gcc acc ctg tct gtg tct cca ggg 48
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15

25 gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag cgt gtt agc act gta 96
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Arg Val Ser Thr Val
 20 25 30

30 gcc tgg tac cag cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc atc tat 144
 Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45

35 gat gca tcc acc agg gcc act gat atc ccc gcc agg ttc agt ggc agt 192
 Asp Ala Ser Thr Arg Ala Thr Asp Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

40 ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc act ctg caa tct gaa 240
 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Thr Leu Gln Ser Glu
 65 70 75 80

45 gac tct gca gtt tat tac tgt cag cag tat aat agg tgg ccc ctc act 288
 Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Arg Trp Pro Leu Thr
 85 90 95

50 ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa 318
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

50 <210> 58
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

55 <400> 58
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15

60 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Arg Val Ser Thr Val
 99

ES 2 687 520 T3

	20	25	30	
5	Ala Trp Tyr 35 Gln Gln Lys Pro Gly 40 Gln Ala Pro Arg Leu 45 Leu Ile Tyr			
10	Asp Ala 50 Ser Thr Arg Ala 55 Thr Asp Ile Pro Ala 60 Arg Phe Ser Gly Ser			
15	Gly 65 Ser Gly Thr Asp 70 Phe Thr Leu Thr Ile 75 Ser Thr Leu Gln Ser Glu 80			
20	Asp Ser Ala Val 85 Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr 90 Asn Arg Trp Pro Leu 95 Thr			
25	Phe Gly Gly Gly 100 Thr Lys Val Glu 105 Ile Lys			
30	<210> 59 <211> 360 <212> ADN <213> Homo sapiens			
35	<220> <221> CDS <222> (1)..(360) <223> secuencia de cadena pesada variable (VH) de NI-203.60H3-VH			
40	<220> <221> Región V <222> (76)..(105) <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR1			
45	<220> <221> Región V <222> (148)..(198) <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR2			
50	<220> <221> Región V <222> (295)..(327) <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR3			
55	gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga gga ttg gca cgc cct gga ggc 48 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Ala Arg Pro Gly Gly 1 5 10			
60	tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gtc gct gga ttc act ttc agt ggt tat 96 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ala Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr 20 25 30			
65	gaa atg aat tgg gtc cgc cag gca cca ggg aag ggg ctg gag tgg att 144 Glu Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile 35 40 45			
	100			

ES 2 687 520 T3

	tca tat att agc ggt cct ggg gat gtg ata tac tac gca gac tct gtg	192
	Ser Tyr 50 Ile Ser Gly Pro Gly 55 Asp Val Ile Tyr Tyr 60 Ala Asp Ser Val	
5	aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc aag aac tca ctg ttt	240
	Lys Gly Arg Phe Thr Ile 70 Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Phe 80	
10	cta cag atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gct gtt tat tat tgt	288
	Leu Gln Met Asn Ser 85 Leu Arg Ala Glu Asp 90 Thr Ala Val Tyr Tyr 95 Cys	
15	acg aga gtc ccc cct gac atc agc tat gga ttt gat tac tgg ggc cag	336
	Thr Arg Val Pro 100 Pro Asp Ile Ser Tyr 105 Gly Phe Asp Tyr Trp 110 Gly Gln	
20	ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tcg	360
	Gly Thr 115 Leu Val Thr Val Ser 120	
25	<210> 60 <211> 120 <212> PRT <213> Homo sapiens <400> 60	
30	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Ala Arg Pro Gly Gly	
	1 5 10 15	
35	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ala Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr	
	20 25 30	
40	Glu Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile	
	35 40 45	
45	Ser Tyr Ile Ser Gly Pro Gly Asp Val Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val	
	50 55 60	
50	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Phe	
	65 70 75 80	
55	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
	85 90 95	
60	Thr Arg Val Pro Pro Asp Ile Ser Tyr Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln	
	100 105 110	
60	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
	115 120	

<210> 61
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(321)
 <223> secuencia de la cadena ligera variable (VK) de NI-203.60H3-VL

10

<220>
 <221> Región V
 <222> (70)..(102)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VK-CDR1

15

<220>
 <221> Región V
 <222> (148)..(168)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VK-CDR2

20

<220>
 <221> Región V
 <222> (265)..(291)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VK-CDR3

25

<400> 61
 gac atc cag atg acc cag tct cca tct tcc ctg tct gca tct gta cga 48
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Arg
 1 5 10 15

30

gac agc gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag agc att agc acc tat 96
 Asp Ser Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Thr Tyr
 20 25 30

35

tta aat tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aac ctc ctg atc 144
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile
 35 40 45

40

cat gat aca gac att ttg caa agt ggg gtc cca tca agg ttc agt ggc 192
 His Asp Thr Asp Ile Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

45

act gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc ggt ctg caa cct 240
 Thr Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Pro
 65 70 75 80

50

gaa gat ttt gca act tac tac tgt caa cag agt tac agt acc cct cct 288
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro
 85 90 95

55

act ttt ggc cag ggg acc aag ctg gag atc aaa 321
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

60

<210> 62
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

```

<400> 62
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Arg
1      5      10      15
5
Asp Ser Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Thr Tyr
20      25      30
10
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile
35      40      45
15
His Asp Thr Asp Ile Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50      55      60
20
Thr Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Pro
65      70      75      80
25
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro
85      90      95
30
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100      105
35
<210> 63
<211> 381
<212> ADN
<213> Homo sapiens
40
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(381)
<223> secuencia de cadena pesada variable (VH) de NI-203.19F2-VH
45
<220>
<221> Región V
<222> (76)..(105)
<223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR1
50
<220>
<221> Región V
<222> (148)..(198)
<223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR2
55
<220>
<221> Región V
<222> (295)..(348)
<223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR3
60
<400> 63
gag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg agg aag cct ggg tcc
1      5      10      15
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Arg Lys Pro Gly Ser

```

48

ES 2 687 520 T3

	tcc	gtg	aag	gtc	tcc	tgc	aag	gct	tct	gga	ggc	aac	ttc	ttg	agc	tat	96
	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Gly	Asn	Phe	Leu	Ser	Tyr	
				20					25					30			
5	tcc	atc	agt	tgg	gtg	cga	cag	gcc	cct	gga	caa	ggg	ctt	gag	tgg	atg	144
	Ser	Ile	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	
			35					40					45				
10	gga	ggg	atc	atc	ccg	atc	ttt	ggt	aca	cca	aac	tac	gca	cag	aag	ttc	192
	Gly	Gly	Ile	Ile	Pro	Ile	Phe	Gly	Thr	Pro	Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe	
		50					55					60					
15	caa	gga	aga	gtc	aca	att	acg	gcg	gac	aaa	tcg	acg	agg	aca	gcc	tac	240
	Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Thr	Arg	Thr	Ala	Tyr	
	65					70					75					80	
20	atg	gag	ctg	agc	agc	ctg	aga	ttt	gat	gac	acg	gcc	gtc	tat	tat	tgt	288
	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Phe	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85					90					95			
25	gcg	gat	gcg	aca	aga	ccg	ggt	aca	gca	gcc	tct	ggt	ttc	tat	tac	tac	336
	Ala	Asp	Ala	Thr	Arg	Pro	Gly	Thr	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Tyr	Tyr	Tyr	
				100					105					110			
30	ggt	atg	gac	gtc	tgg	ggc	caa	ggg	acc	acg	gtc	acc	gtc	tcc	tcg		381
	Gly	Met	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser		
			115				120						125				
35	<210>	64															
	<211>	127															
	<212>	PRT															
	<213>	Homo sapiens															
40	<400>	64															
	Glu	val	Gln	Leu	val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	val	Arg	Lys	Pro	Gly	Ser	
	1			5						10					15		
45	ser	val	lys	val	ser	cys	lys	ala	ser	gly	gly	asn	phe	leu	ser	tyr	
				20					25					30			
50	ser	ile	ser	trp	val	arg	gln	ala	pro	gly	gln	gly	leu	glu	trp	met	
			35					40					45				
55	gly	gly	ile	ile	pro	ile	phe	gly	thr	pro	asn	tyr	ala	gln	lys	phe	
		50					55					60					
60	gln	gly	arg	val	thr	ile	thr	ala	asp	lys	ser	thr	arg	thr	ala	tyr	
	65					70					75					80	
65	met	glu	leu	ser	ser	leu	arg	phe	asp	asp	thr	ala	val	tyr	tyr	cys	
				85					90					95			
70	ala	asp	ala	thr	arg	pro	gly	thr	ala	ala	ser	gly	phe	tyr	tyr	tyr	

ES 2 687 520 T3

	100	105	110	
5	Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser			
	115	120	125	
10	<210> 65 <211> 318 <212> ADN <213> Homo sapiens			
15	<220> <221> CDS <222> (1)..(318) <223> secuencia de cadena ligera kappa variable de NI-203.19F2-VK			
20	<220> <221> Región V <222> (70)..(102) <223> región determinante de complementariedad (CDR) VK-CDR1			
25	<220> <221> Región V <222> (148)..(168) <223> región determinante de complementariedad (CDR) VK-CDR2			
30	<220> <221> Región V <222> (265)..(288) <223> región determinante de complementariedad (CDR) VK-CDR3			
35	<400> 65 gaa att gtg atg aca cag tct cca gac acc ctg tct gtg tct cca ggt Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly			48
	1 5 10 15			
40	gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt aac aac aac Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asn Asn Asn			96
	20 25 30			
45	tta gcc tgg ttc cag cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc atc Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile			144
	35 40 45			
50	tat ggt gca tcc acc agg gcc act ggt att cca gcc aga ttc agt ggc Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly			192
	50 55 60			
55	agt ggg tct ggg aca gag ttc act ctc acc atc agc agc cta cag tct Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser			240
	65 70 75 80			
60	gaa gat ttt gca gtt tat ttc tgt cag cag agt cac aat tgg ccc act Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser His Asn Trp Pro Thr			288
	85 90 95			
60	ttc ggc cct ggg acc aaa gtg gat atc aaa Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys			318
	100 105			

```

5  <210> 66
   <211> 106
   <212> PRT
   <213> Homo sapiens
   <400> 66

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

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

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

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

30  Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
    65      70      75      80

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

40  Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
    100      105

45  <210> 67
   <211> 369
   <212> ADN
   <213> Homo sapiens

50  <220>
   <221> CDS
   <222> (1)..(369)
   <223> secuencia de cadena pesada variable (VH) de NI-203.15C7-VH

55  <220>
   <221> Región V
   <222> (73)..(105)
   <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR1

60  <220>
   <221> Región V
   <222> (148)..(198)
   <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR2

65  <220>
   <221> Región V
   <222> (295)..(336)

```

<223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR3

<400> 67

5 gag gtg cag ctg gtg gag act ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg atg 48
Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Met
1 5 10 15

tcc ctg aaa ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc agt acc tat
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr

10 20 25 30 96

act atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg 144
Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

192

tca ttt ata tca tat gat gga agg gat aaa tac tac gca gat tcc gtg
Ser Phe Ile Ser Tyr Asp Gly Arg Asp Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

20 aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aaatccc aagaac atgttg tat 240
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Met Leu Tyr
 65 70 75 80

ctg caa atg aac agc ctg aga gat gag gac atg gct gtg tat tac tgt
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Met Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95 288

30 gcg act ctg caa gta tgg caa ctc tac gat tac tac gga atg gac gtc 336
 Ala Thr Leu Gln Val Trp Gln Leu Tyr Asp Tyr Tyr Gly Met Asp Val

tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tcg 369
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 68

<211> 123

<212> PRT

40 <213> Homo sapiens

<400> 68

45 Glu Val Gln Leu val Glu Thr Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Met
 1 5 10 15

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

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

35 Ser Phe Ile Ser Tyr Asp Gly Arg Asp Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

5 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Met Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 10 Ala Thr Leu Gln Val Trp Gln Leu Tyr Asp Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 100 105 110
 15 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 20 <210> 69
 <211> 330
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 25 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(330)
 <223> secuencia de cadena ligera variable (VL) de NI-203.15C7-VL
 30 <220>
 <221> Región V
 <222> (67)..(105)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR1
 35 <220>
 <221> Región V
 <222> (151)..(171)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR2
 40 <220>
 <221> Región V
 <222> (268)..(300)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR3
 45 <400> 69
 cag tct gtg ttg acg cag ccg ccc tca gtg tct gcg gcc cca gga cag 48
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 50 aag gtc acc atc tcc tgc tct gga agc agc tcc aac att ggg aat aat 96
 Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
 20 25 30
 55 tat gta tct tgg tat cag caa ctc cca gga aca gcc ccc aaa ctc ctc 144
 Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45
 60 att tat aac agt gat aag cga ccc tca ggg att cct gac cga ttc tct 192
 Ile Tyr Asn Ser Asp Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 gcc tcc aag tct ggc acg tca gcc acc ctg ggc atc acc ggg ctc cag 240
 Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
 65 70 75 80

ES 2 687 520 T3

act ggg gac gag gcc gat tat tac tgc gca aca tgg gat acc aga ctg 288
Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Thr Arg Leu
85 90 95

5 agt gct ggg gta ttc ggc gga ggg acc aag ctg acc gtc ctt 330
Ser Ala Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

10 <210> 70
<211> 110
<212> PRT
<213> Homo sapiens

15 <400> 70
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

20 Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

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

30 Ile Tyr Asn Ser Asp Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

35 Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Thr Arg Leu
85 90 95

40 Ser Ala Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

45 <210> 71
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> epítipo lineal reconocido por el anticuerpo NI-203.15C7

55 <220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(10)
<223> epítipo lineal único reconocido por el anticuerpo NI-203.15C7

60 <400> 71
Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu Val His Ser

1

5

10

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo contra polipéptido amiloide de islote (IAPP) monoclonal humano o un fragmento de unión a IAPP y/o proIAPP del mismo, **caracterizado por que** el anticuerpo reconoce preferiblemente agregados de IAPP y/o proIAPP humanos que comprenden oligómeros y/o fibrillas de IAPP y/o proIAPP sobre IAPP y/o proIAPP fisiológicos, y no reconoce sustancialmente péptido β -amiloide patológico ($A\beta_{1-42}$) en cerebro humano de la enfermedad de Alzheimer, en el que el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en:
- (a) un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo de IAPP que comprende la secuencia de aminoácidos SSNNFGA establecida en la SEQ ID NO: 4, CNTATCA establecida en la SEQ ID NO: 5 o QRLANFLVHS establecida en la SEQ ID NO: 71;
- (b) un anticuerpo que es capaz de unirse a un epítipo de IAPP humano, en el que el anticuerpo o el fragmento de unión a IAPP del mismo comprende en su región variable las siguientes seis regiones determinantes de complementariedad (CDR):
- (i)
- VHCDR1: posiciones 26-35 de la SEQ ID NO: 12,
 VHCDR2: posiciones 50-66 de la SEQ ID NO: 12,
 VHCDR3: posiciones 99-110 de la SEQ ID NO: 12,
 VKCDR1: posiciones 24-34 de la SEQ ID NO: 14,
 VKCDR2: posiciones 50-56 de la SEQ ID NO: 14, y
 VKCDR3: posiciones 89-96 de la SEQ ID NO: 14, o
 en las que una o más de las CDR pueden comprender una o dos sustituciones de aminoácidos;
- (ii)
- VHCDR1: posiciones 26-35 de la SEQ ID NO: 16,
 VHCDR2: posiciones 50-66 de la SEQ ID NO: 16,
 VHCDR3: posiciones 99-111 de la SEQ ID NO: 16,
 VKCDR1: posiciones 24-34 de la SEQ ID NO: 18,
 VKCDR2: posiciones 50-56 de la SEQ ID NO: 18, y
 VKCDR3: posiciones 89-97 de la SEQ ID NO: 18, o
 en las que una o más de las CDR pueden comprender una o dos sustituciones de aminoácidos;
- (iii)
- VHCDR1: posiciones 26-37 de la SEQ ID NO: 20,
 VHCDR2: posiciones 52-67 de la SEQ ID NO: 20,
 VHCDR3: posiciones 100-110 de la SEQ ID NO: 20,
 VKCDR1: posiciones 24-38 de la SEQ ID NO: 22,
 VKCDR2: posiciones 54-60 de la SEQ ID NO: 22, y
 VKCDR3: posiciones 93-101 de la SEQ ID NO: 22, o
 en las que una o más de las CDR pueden comprender una o dos sustituciones de aminoácidos;
- (iv)
- VHCDR1: posiciones 26-35 de la SEQ ID NO: 24,
 VHCDR2: posiciones 50-66 de la SEQ ID NO: 24,
 VHCDR3: posiciones 99-113 de la SEQ ID NO: 24,
 VKCDR1: posiciones 24-39 de la SEQ ID NO: 26,
 VKCDR2: posiciones 55-61 de la SEQ ID NO: 26, y
 VKCDR3: posiciones 94-102 de la SEQ ID NO: 26, o
 en las que una o más de las CDR pueden comprender una o dos sustituciones de aminoácidos;
- (v)
- VHCDR1: posiciones 26-35 de la SEQ ID NO: 28,
 VHCDR2: posiciones 50-66 de la SEQ ID NO: 28,
 VHCDR3: posiciones 99-113 de la SEQ ID NO: 28,
 VLCDR1: posiciones 23-34 de la SEQ ID NO: 30,
 VLCDR2: posiciones 50-56 de la SEQ ID NO: 30, y
 VLCDR3: posiciones 93-101 de la SEQ ID NO: 30, o
 en las que una o más de las CDR pueden comprender una o dos sustituciones de aminoácidos;
- (vi)
- VHCDR1: posiciones 26-35 de la SEQ ID NO: 64,
 VHCDR2: posiciones 50-66 de la SEQ ID NO: 64,
 VHCDR3: posiciones 99-116 de la SEQ ID NO: 64,
 VKCDR1: posiciones 24-34 de la SEQ ID NO: 66,
 VKCDR2: posiciones 50-56 de la SEQ ID NO: 66, y

- VKCDR3: posiciones 89-96 de la SEQ ID NO: 66, o en las que una o más de las CDR pueden comprender una o dos sustituciones de aminoácidos; (vii)
- 5 VHCDR1: posiciones 25-35 de la SEQ ID NO: 68, VHCDR2: posiciones 50-66 de la SEQ ID NO: 68, VHCDR3: posiciones 99-112 de la SEQ ID NO: 68, VLCDR1: posiciones 23-35 de la SEQ ID NO: 70, VLCDR2: posiciones 51-57 de la SEQ ID NO: 70, y VLCDR3: posiciones 90-100 de la SEQ ID NO: 70, o
- 10 en las que una o más de las CDR pueden comprender una o dos sustituciones de aminoácidos; y (c) un anticuerpo que es capaz de unirse a un epítipo de IAPP y prolAPP humano, en el que el anticuerpo o el fragmento de unión a IAPP y/o prolAPP del mismo comprende en su región variable las siguientes seis CDR: (viii)
- 15 VHCDR1: posiciones 26-37 de la SEQ ID NO: 20, VHCDR2: posiciones 52-67 de la SEQ ID NO: 20, VHCDR3: posiciones 100-110 de la SEQ ID NO: 20, VKCDR1: posiciones 24-38 de la SEQ ID NO: 22, VKCDR2: posiciones 54-60 de la SEQ ID NO: 22, y VKCDR3: posiciones 93-101 de la SEQ ID NO: 22, o
- 20 en las que una o más de las CDR pueden comprender una o dos sustituciones de aminoácidos.
2. Anticuerpo o fragmento de unión a IAPP/proIAPP del mismo, según la reivindicación 1, que comprende en su región variable
- 25 (a) una secuencia de aminoácidos de la región V_H y V_L seleccionada entre (i) SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 14 (ii) SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 18 (iii) SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 22 (iv) SEQ ID NO: 24 y SEQ ID NO: 26 (v) SEQ ID NO: 28 y SEQ ID NO: 30
- 30 (vi) SEQ ID NO: 64 y SEQ ID NO: 66 (vii) SEQ ID NO: 68 y SEQ ID NO: 70; o (b) una secuencia de aminoácidos de la región V_H y V_L establecida en (viii) SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 22.
- 35 3. Anticuerpo, según la reivindicación 1 ó 2, que es un anticuerpo quimérico roedor-humano o un anticuerpo roedorizado.
4. Anticuerpo o molécula de unión a antígeno que compite con un anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para la unión específica a IAPP y/o prolAPP **caracterizado por que** el anticuerpo reconoce preferiblemente agregados de IAPP y/o prolAPP humanos que comprenden oligómeros y/o fibrillas de IAPP y/o prolAPP sobre IAPP y/o prolAPP fisiológicos, y no reconoce sustancialmente el péptido β -amiloide patológico (A β_{1-42}) en cerebro humano de la enfermedad de Alzheimer.
- 40 5. Anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que se selecciona del grupo que consiste en un fragmento F_v de cadena simple (scFv), un fragmento F(ab'), un fragmento F(ab) y un fragmento F(ab')₂.
- 45 6. Polinucleótido que codifica al menos el dominio de unión o región variable de una cadena de inmunoglobulina del anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a 5.
7. Vector que comprende el polinucleótido, según la reivindicación 6, opcionalmente en combinación con un polinucleótido, según la reivindicación 6, que codifica la región variable de la otra cadena de inmunoglobulina de dicha molécula de unión.
- 50 8. Célula huésped que comprende el polinucleótido, según la reivindicación 6, o el vector, según la reivindicación 7.
- 55 9. Anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o codificado por el polinucleótido, según la reivindicación 6, que está (i) marcado de forma detectable; y/o (ii) unido a un fármaco.

10. Anticuerpo, según la reivindicación 9, en el que el marcador detectable se selecciona del grupo que consiste en una enzima, un radioisótopo, un fluoróforo y un metal pesado.

11. Composición, que comprende el anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, 9 ó 10, el polinucleótido, según la reivindicación 6, el vector, según la reivindicación 7 o la célula, según la reivindicación 8, en la que la composición es

- (i) una composición farmacéutica y que comprende además un portador farmacéuticamente aceptable;
- (ii) una vacuna; o
- (iii) una composición de diagnóstico.

12. Composición, según la reivindicación 11, en la que la composición farmacéutica y/o la vacuna comprenden además un agente adicional útil para el tratamiento de diabetes mellitus tipo 2 (T2D) y/o para utilizar en el tratamiento o prevención del rechazo de islotes después del trasplante clínico de islotes pancreáticos, o en la que la composición de diagnóstico comprende además reactivos utilizados convencionalmente en métodos de diagnóstico de base inmunológica o basados en ácidos nucleicos.

13. Anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, 9 ó 10, el polinucleótido, según la reivindicación 6, el vector, según la reivindicación 7 o la célula, según la reivindicación 8, o una composición farmacéutica o de diagnóstico que comprende cualquiera de los mismos para utilizar en el tratamiento profiláctico, tratamiento terapéutico y/o control de la progresión o una respuesta al tratamiento de un trastorno relacionado con IAPP y/o proIAPP.

14. Método de diagnóstico o control de la progresión de amiloidosis de islotes en un sujeto, comprendiendo el método determinar la presencia de oligómeros, agregados o fibrillas de IAPP y/o proIAPP en una muestra del sujeto que será diagnosticado con al menos un anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a 5, 9 ó 10, en el que la presencia de oligómeros, agregados o fibrillas de IAPP y/o proIAPP, es indicativa de diabetes mellitus tipo 2 (T2D) presintomática, prodrómica o clínica y/o de la deficiencia de células beta después del trasplante clínico de islotes pancreáticos y un incremento del nivel de oligómeros, agregados o fibrillas de IAPP y/o proIAPP en comparación con el nivel del IAPP fisiológico o en comparación con una muestra de referencia derivada de un sujeto de control sano o una muestra de control del mismo sujeto, es indicativa del progreso de diabetes mellitus tipo 2 (T2D) presintomática, prodrómica o establecida y/o de deficiencia de islotes después del trasplante clínico de islotes pancreáticos en dicho sujeto.

15. Anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a 5, 9, 10 ó 13, para utilizar en la detección *in vivo* de o el reconocimiento de un agente terapéutico y/o de diagnóstico para IAPP y/o proIAPP en el cuerpo humano o de un animal.

16. Anticuerpo para utilizar, según la reivindicación 15, en el que dicha detección *in vivo* comprende tomografía por emisión de positrones (PET), tomografía por emisión monofotónica (SPECT), obtención de imágenes ópticas del infrarrojo cercano (NIR) u obtención de imágenes de resonancia magnética (MRI) y/o en el que el anticuerpo se diseña para utilizar en el método, según la reivindicación 14.

17. Péptido que tiene un epítipo de IAPP reconocido específicamente por un anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el péptido consiste en 10 aminoácidos contiguos y comprende la secuencia de aminoácidos SSNNFGA establecida en la SEQ ID NO: 4, CNTATCA establecida en la SEQ IS NO: 5 o QRLANFLVHS establecida en la SEQ ID NO: 71.

18. Método de diagnóstico de amiloidosis de islotes indicativa de diabetes mellitus tipo 2 presintomática o clínica y/o de la deficiencia de células beta después del trasplante clínico de islotes pancreáticos en un sujeto, que comprende una etapa de determinar la presencia de un anticuerpo que se une a un péptido, según la reivindicación 17, en una muestra biológica de dicho sujeto.

19. Equipo útil en el diagnóstico o control de la progresión de amiloidosis de islotes, comprendiendo dicho equipo al menos un anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a 5, 9, 10 ó 13, el polinucleótido, según la reivindicación 6, el vector, según la reivindicación 7 o la célula, según la reivindicación 8 y/o el péptido, según la reivindicación 17, opcionalmente con reactivos y/o instrucciones para su utilización.

A **NI-203.9A2-VH (secuencia de cadena pesada variable VH)**
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTFAMSWVRQAPGKGLEWVSTISGSGDNTYYADSLKG
FR3-----CDR3-----JH-----
RFTISRDN SKNTLYLQVNSLRPEDTAVYYCAKSPSSLLATYFDYWGQGTLVTVSS

NI-203.9A2-VH (secuencia de cadena pesada variable VH después de PIMC)
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
EVQL**L**ESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTFAMSWVRQAPGKGLEWVSTISGSGDNTYYADSLKG
FR3-----CDR3-----JH-----
RFTISRDN SKNTLYLQVNSLRPEDTAVYYCAKSPSSLLATYFDYWGQGTLVTVSS

NI-203.9A2-VK (secuencia de cadena ligera variable VK)
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
EIVLTQSPSTLSASVGDRVTITCRASESINSWLAWYQQKPGKGP~~KLL~~IKKASSLQSGVPSRFSSGSGS
-----CDR3---JK-----
GTEFTLTISLQPD~~DF~~ATYYCQQHNSYWTFGQGTKVEIK

NI-203.9A2-VK (secuencia de cadena ligera variable VK después de PIMC)
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASESINSWLAWYQQKPGKGP~~KLL~~IKKASSLQSGVPSRFSSGSGS
-----CDR3---JK-----
GTEFTLTISLQPD~~DF~~ATYYCQQHNSYWTFGQGTKVEIK

B **NI-203.19H8-VH (secuencia de cadena pesada variable VH)**
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
EVQLVESGGGVVQPGTSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIIWYDGSKEYYADSLKG
FR3-----CDR3-----JH-----
RVTISRDNSENTLYLQLHTLRVEDTAVYFCARTIASATVDHGMDVWGQGTLVTVSS

NI-203.19H8-VK (secuencia de cadena ligera variable VK)
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
DVVMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASHDISTWLAWYQQRP~~GK~~APNLLIFGASRLQSGVSPRFSSGSGS
-----CDR3---JK-----
GTDFTLTISLQPEDFATYYCQQTNNFPPTFGQGTRLEIK

Figura 1

C NI-203.26C11-VH (secuencia de cadena pesada variable VH)
 FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
 QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGNYWTWIRQPAGKGLEWIGHIYSSGTTNYPNPSLES
 FR3-----CDR3-----JH-----
 RVTISVDTSKNQFSLNSVTAAADTAVYYCARPLATVPDAFNIWGQGTMTVTSS

NI-203.26C11-VK (secuencia de cadena ligera variable VK)
 FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3---
 EIVMTQSPDSLAVSLGERATIKCKSSQSVLYSNKNFLAWYQQKPGQPPELLIYWASTRESGVPDRFS
 -----CDR3-----JK-----
 GSGSGTDFLTITSSSLQAEDVAVYYCQQYYSNPNTFGQGTKVEIK

D NI-203.8E3-VH (secuencia de cadena pesada variable VH)
 FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSHTISWVRQAPGQGLEWMGGIIPFGTANYAQKFQD
 FR3-----CDR3-----JH-----
 RVTVTADKSTNTAYMELSSLRPEDTAVYYCAKGELEPRILYYYGMDVWGRGTTVTSS

NI-203.8E3-VK (secuencia de cadena ligera variable VK)
 FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3---
 DVVMTQSPSLPVTLGQPASISCRSSQSLVYSDGNTYLNWFHQRPQGQSPRLIYKVSNRDSGVPDRF
 -----CDR3-----JK-----
 SSGSGTDFTLKISRVEAEDVGYYCMQGSNWPGTFGQGTKVEIK

E NI-203.11B12-VH (secuencia de cadena pesada variable VH)
 FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
 QVQLVQSGAEVKKPGASMKVSKASGYTFTNYLHWVRQAPGQGLEWMGIINPSAGSTSYAQKFQG
 FR3-----CDR3-----JH-----
 RVTMTRDTSTSTVYMELSSLKSEDTAVYYCARDASAGIQIWFRDAFDIWGQGTMTVTSS

NI-203.11B12-VL (secuencia de cadena ligera variable VL)
 FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3---
 QPVLTPPPSASASLGSSVKLTCTLNSGHSSYTIAWHQQQPGKAPRYLMKVEHNGNYNKGSGLPDRFS
 -----CDR3-----JK-----
 GSSSGADRYLAISNLQSEDEADYYCETWDTSTRVFGGGTKLTVL

Figura 1 (continuación)

F NI-203.205F8-VH (secuencia de cadena pesada variable VH)
 FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
 QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGDSVSSGSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYPNPSLKS
 FR3-----CDR3-----JH-----
 RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYSCARVPYGYRGYDGAIFYWGGQGLTVTVSS

NI-203.205F8-VK (secuencia de cadena ligera variable VK)
 FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGS
 -----CDR3---JK-----
 GTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQRSNRFTFGPGTKVDIK

G NI-203.9B3-VH (secuencia de cadena pesada variable VH)
 FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
 EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGTTKYYADSVKG
 FR3-----CDR3-----JH-----
 RFTTSRDNSKNTLSLQMNSLRAEDSAVYYCARGFSSSWEFGEFGWGQGLTVTVSS

NI-203.9B3-VL (secuencia de cadena ligera variable VL)
 FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
 QSALTQPPSASGSPGQSVTISCTGTSGYIYGYNYVSWYQQHPGKAPKVMIEVTKRPSGVPDRFSG
 -----CDR3---JK-----
 SKSGNTASLTVSGLQAEDAEVYYCASYAGSNVVFVGGGTKLTVL

H NI-203.19F2-VH (secuencia de cadena pesada variable VH)
 FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
 EVQLVQSGAEVRKPGSSVKVSCKASGGNFLSYSISWVRQAPGQGLEWMGGIIPFGTPNYAQKFQG
 FR3-----CDR3-----JH-----
 RVTITADKSTRTAYMELSSLRFDDTAVYYCADATRPGTAAASGFYYYGMDVWGGQGLTVTVSS

NI-203.19F2-VK (secuencia de cadena ligera variable VK)
 FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
 EIVMTQSPDTLSVSPGERATLSCRASQSVNNNLAWFQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGS
 -----CDR3---JK-----
 GTEFTLTISLQSEDFAVYFCQQSHNWPTFGPGTKVDIK

Figura 1 (continuación)

I **NI-203.15C7-VH (secuencia de cadena pesada variable VH)**

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
 EVQLVETGGGVVQPGMSLKLSCAASSGFTFSTYTMHWVRQAPGKGLEWVSFISYDGRDKYYADSVKG

FR3-----CDR3-----JH-----
 RFTISRDNNSKNMLYLQMNSLRDEDMAVYYCATLQVWQLYDYYGMDVWGQGTTVTVSS

NI-203.15C7-VL (secuencia de cadena ligera variable VL)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
 QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYNSDKRPSGIPDRFSASKS

-----CDR3-----JK-----
 GTSATLGITGLQTGDEADYYCATWDTRLSAGVFGGGTKLTVL

Figura 1 (continuación)

A NI-203.1D10-VH (secuencia de cadena pesada variable VH)
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGYSTNSWIAWVRQMPGKGLDYVGIIYPGDSDTKYGPSFQG
FR3-----CDR3-----JH-----
HVTISADNFANTAYLQWSSLKASDTAIYYCARRAAAAINWFDSWGQGTLVTVSS

NI-203.1D10-VK (secuencia de cadena ligera variable VK)
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3---
DIQLTQSPLSLSVTPGEPASISCRSSQSLHPNGNDYLDWYVQKPGQSPQIVIMGSNRAAGVPDRF
-----CDR3---JK-----
SGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGTYYCLQALRGYTFGQGTKVEIK

B NI-203.2A11-VH (secuencia de cadena pesada variable VH)
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAFVRYDGSNKYYADSVKG
FR3-----CDR3-----JH-----
RFTISRDNKNSLSLQMNSLRTEDTAVYYCAKEQEDHKEAFDYWGQGTLVTVSS

NI-203.2A11-VK (secuencia de cadena ligera variable VK)
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQRVTIIAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATDIPARFSGSGS
-----CDR3-----JK-----
GTDFTLTISLQSEDFAVYYCQQYNQWPLTFGGGTKLEIK

C NI-203.10C4-VH (secuencia de cadena pesada variable VH)
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
EVQLVESGAIEVRKPGASVRVSCQTSGYSVTDYYLHWVRQAPGQGLEWMGMNPSNGNVGYPQKQFQG
FR3-----CDR3-----JH-----
RVTMTADTSTGTVMVLTGLTAGDTAVYYCARGGSTPGQEVRSPHVLDLWGQGTLVTVSS

NI-203.10C4-VH (secuencia de cadena pesada variable VH después de PIMC)
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
QVQLVQSGAEVRKPGASVRVSCQTSGYSVTDYYLHWVRQAPGQGLEWMGMNPSNGNVGYPQKQFQG
FR3-----CDR3-----JH-----
RVTMTADTSTGTVMVLTGLTAGDTAVYYCARGGSTPGQEVRSPHVLDLWGQGTLVTVSS

Figura 2

NI-203.10C4-VK (secuencia de cadena ligera variable VK)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3---
 DVVMTQSP~~LS~~SVTPGQPASISCR~~S~~DESL~~L~~HSDGRTYLYWYLQKPGQPPQLLIYEVS~~N~~RFS~~G~~VPNRF
 -----CDR3-----JK-----
 SGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGVHFPQTFGQGTKLEIK

NI-203.10C4-VK (secuencia de cadena ligera variable VK después de PIMC)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3---
 D~~I~~VMTQ~~T~~PLS~~S~~SVTPGQPASISCR~~S~~DESL~~L~~HSDGRTYLYWYLQKPGQPPQLLIYEVS~~N~~RFS~~G~~VPNRF
 -----CDR3-----JK-----
 SGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGVHFPQTFGQGTKLEIK

D NI-203.20H9-VH (secuencia de cadena pesada variable VH)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
 QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYIFSKHGINWVRQAPGGLEWIGWINTNTGNPTYAQDFTG
 FR3-----CDR3-----JH-----
 RFVFSLDTSVSTAYLEISSLKAEDTAVYYCARESEPIFGVIYYMDVWGKGT~~T~~TVSS

NI-203.20H9-VK (secuencia de cadena ligera variable VK)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
 DIQMTQSPSSLSASVGDSTITCRASQSISTNLN~~W~~YQKKPGQAPT~~V~~LIYAASSLQGGVPSRFRGRGS
 -----CDR3-----JK-----
 GTYFTLTISGLQPEDFATYYCQHNYNDLWTFGQGTKVEIK

E NI-203.26D2-VH (secuencia de cadena pesada variable VH)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
 QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFRTCGMHWVRQAPGKLEWVAFVRS~~D~~GTTRYADSLMG
 FR3-----CDR3-----JH-----
 RFTISRDNSKNSLYLQMNSLRPEDTALYYCAREKEDHREAFDYWGQGT~~L~~TVSS

NI-203.26D2-VK (secuencia de cadena ligera variable VK)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
 EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQ~~R~~VSTVAWYQQKPGQAPRLLIYDASTRATDIPARFSGSGS
 -----CDR3-----JK-----
 GTDFTLTISTLQSEDSAVYYCQQYNRWPLTFGGGTKVEIK

Figura 2 (continuación)

F **NI-203.60H3-VH (secuencia de cadena pesada variable VH)**

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
 EVQLVESGGGLARPGGSLRLSCAVAGFTFSGYEMNWVRQAPGKGLEWISYISGPGDVIYYADSVKG

FR3-----CDR3-----JH-----
 RFTISRDNAKNSLFLQMNSLRAEDTAVYYCTRVPPDISYGFDYWGQGTLVTVSS

NI-203.60H3-VK (secuencia de cadena ligera variable VK)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
 DIQMTQSPSSLSASVRDSVTITCRASQSISTYLNWYQQKPGKAPNLLIHDTDILQSGVPSRFSGTGS

-----CDR3-----JK-----
 GTDFTLTISGLQPEDFATYYCQQSYSTPPTFGQGTKLEIK

Figura 2 (continuación)

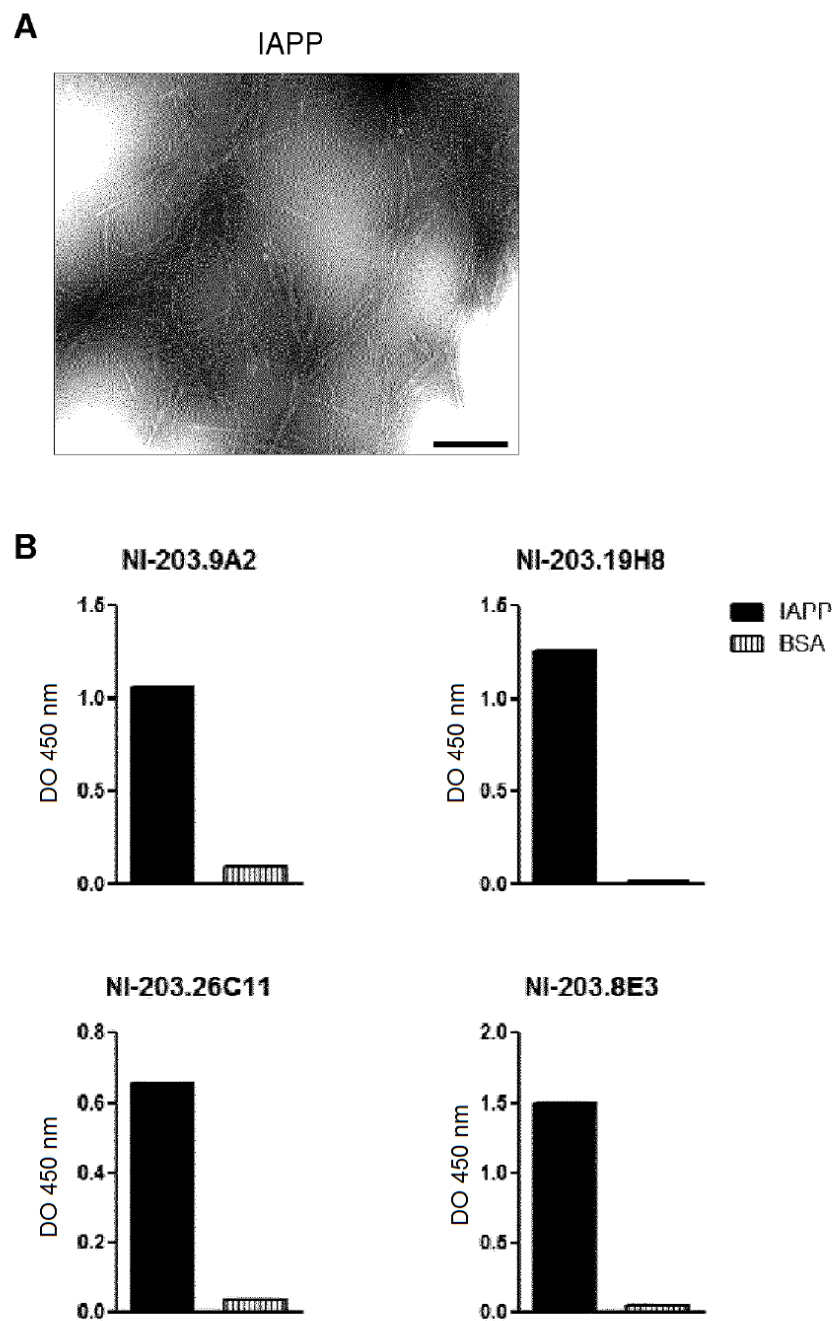


Figura 3

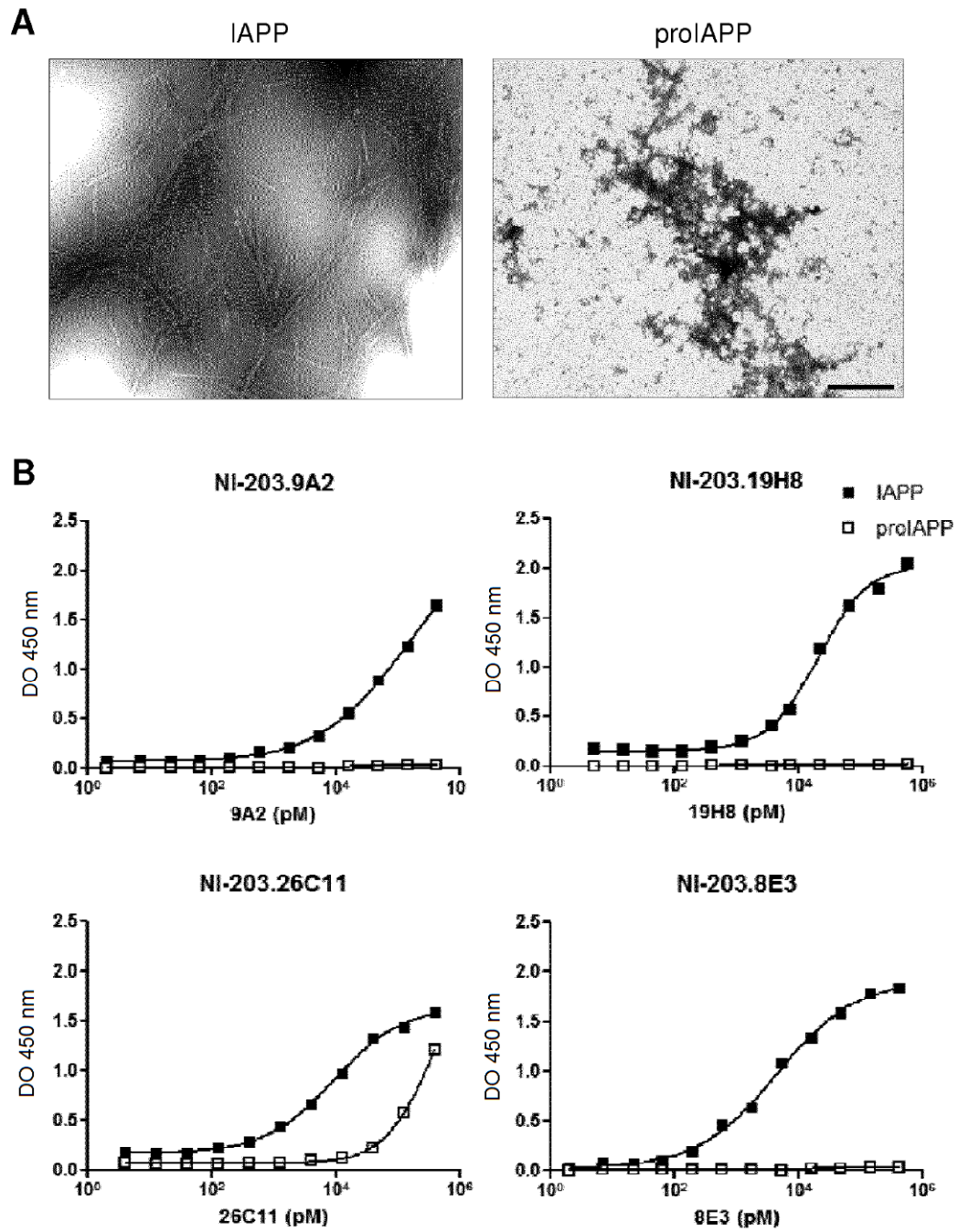


Figura 4

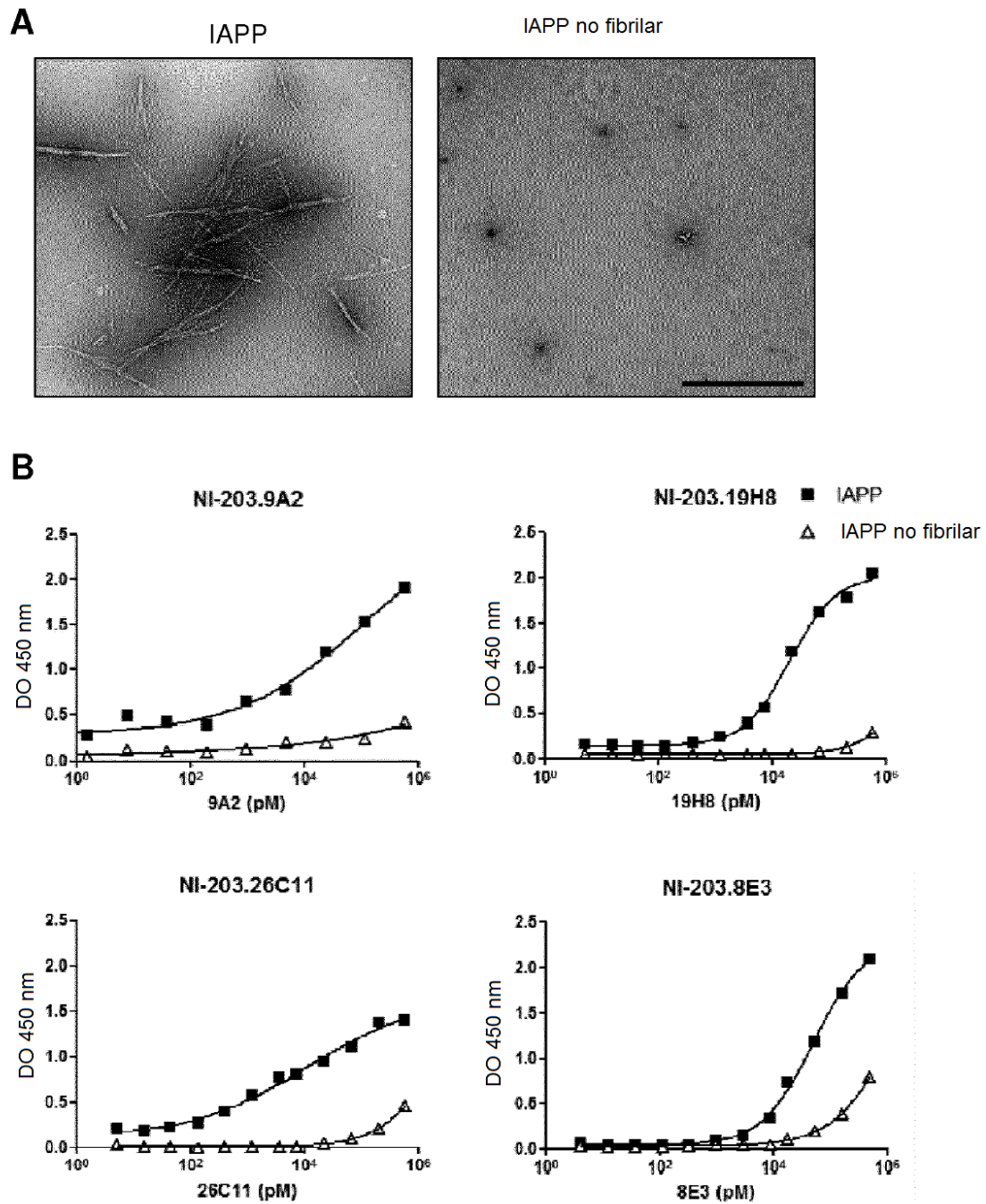
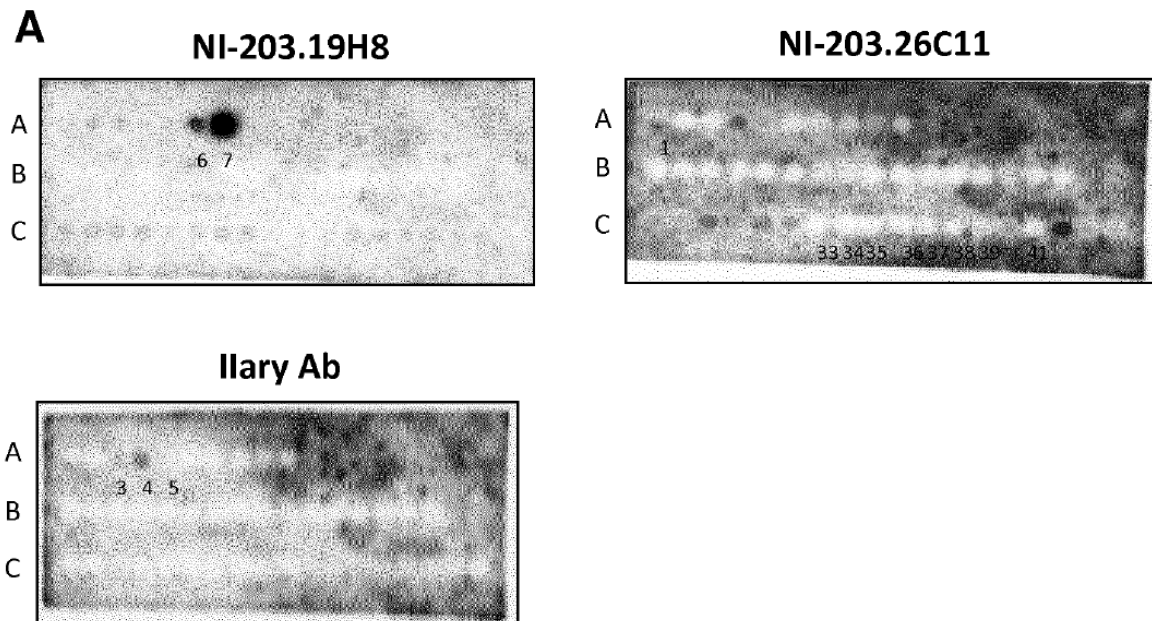


Figura 5



B

IAPP humana: 1-KCNTATCATQRLANFLVHSSNFGAILSSTNVGSNTY-37

Anticuerpo	Epítipo de unión
NI-203.9A2	NI
NI-203.19H8	19-SSNNFGA-25
NI-203.26C11	N-Terminal: 2-CNTATCA-8
NI-203.8E3	NI
NI-203.19F2	NI
NI-203.15C7	10-QRLANFLVHS-19

Figura 6

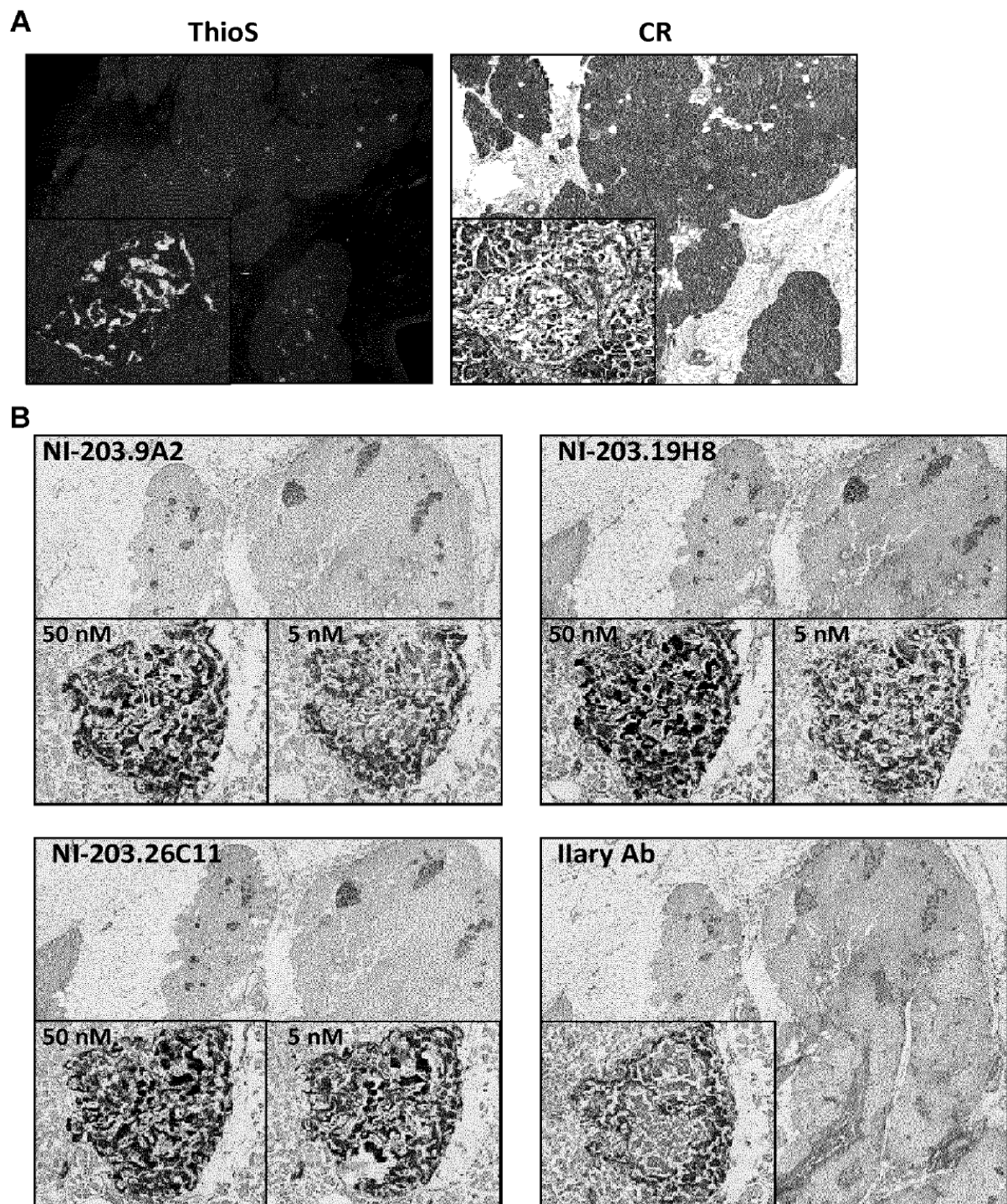


Figura 7

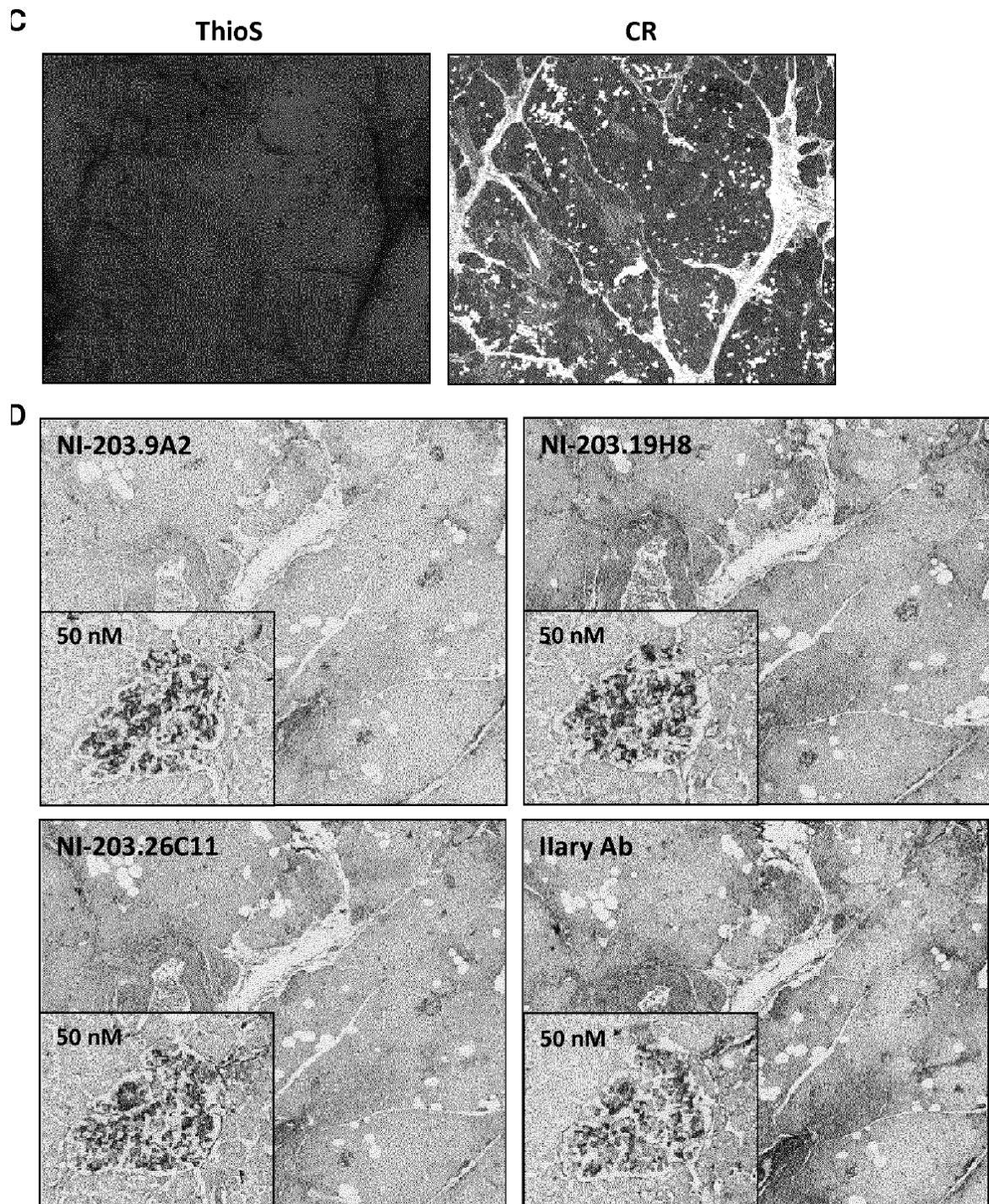


Figura 7 (continuación)

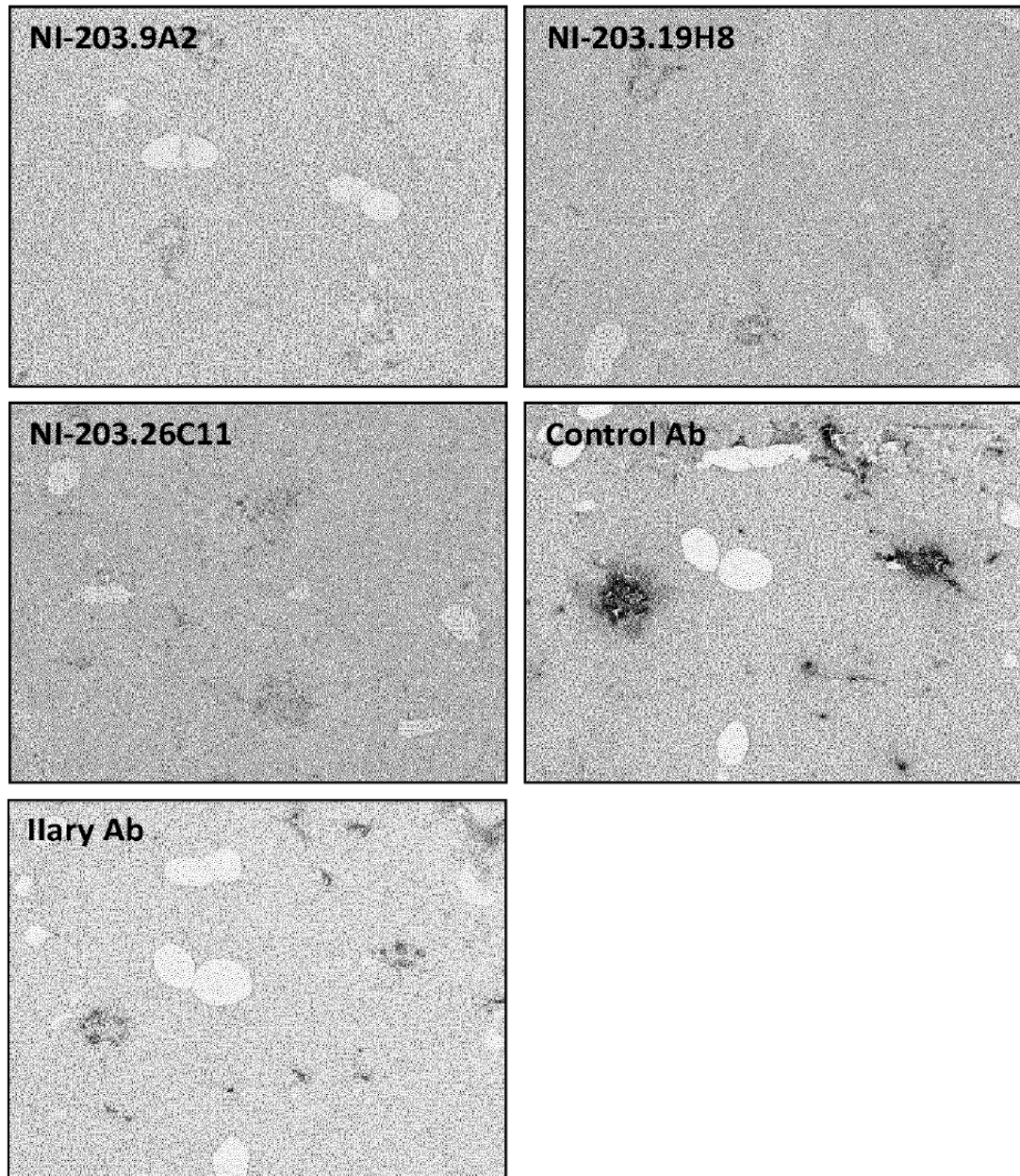


Figura 8

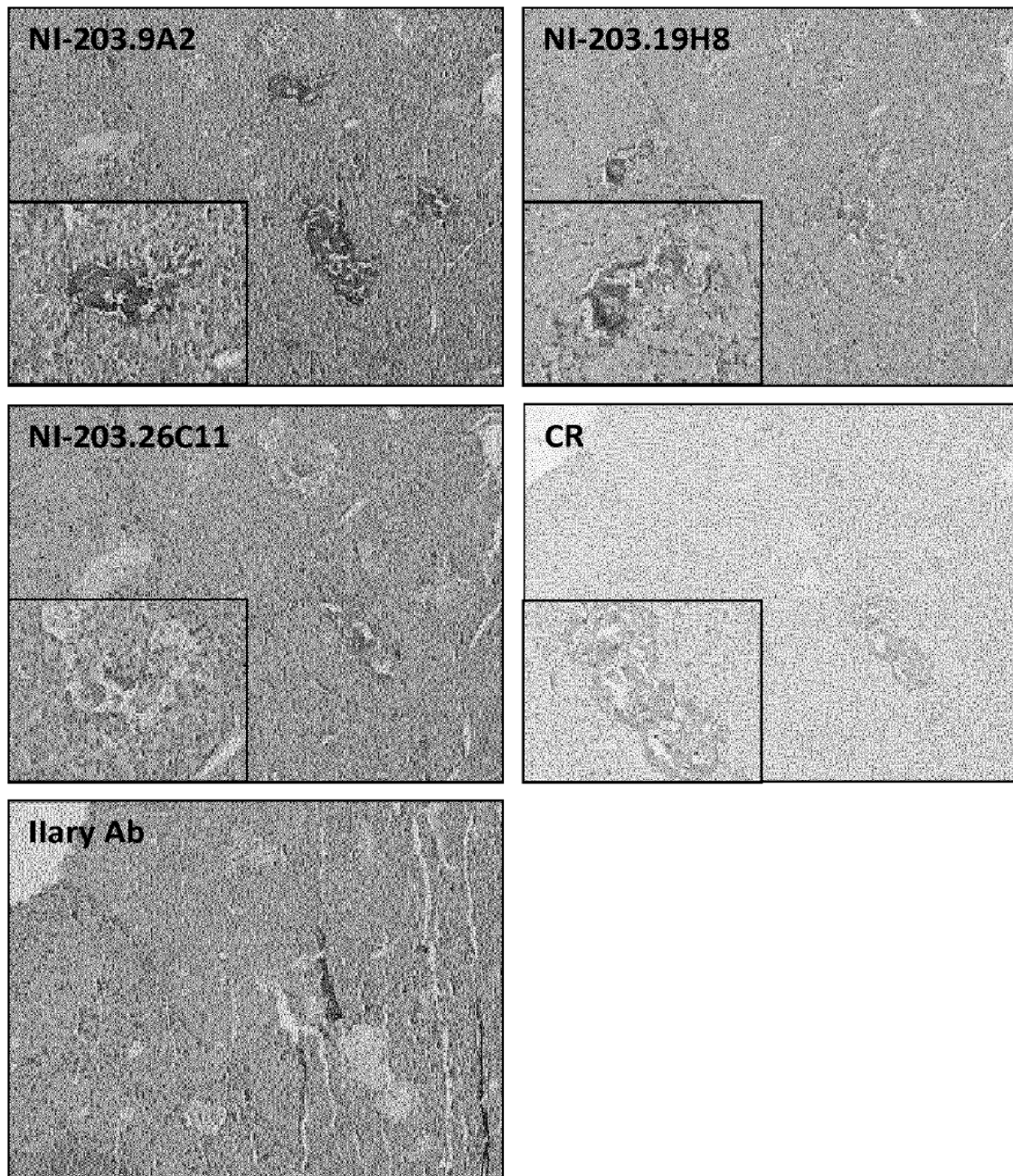


Figura 9

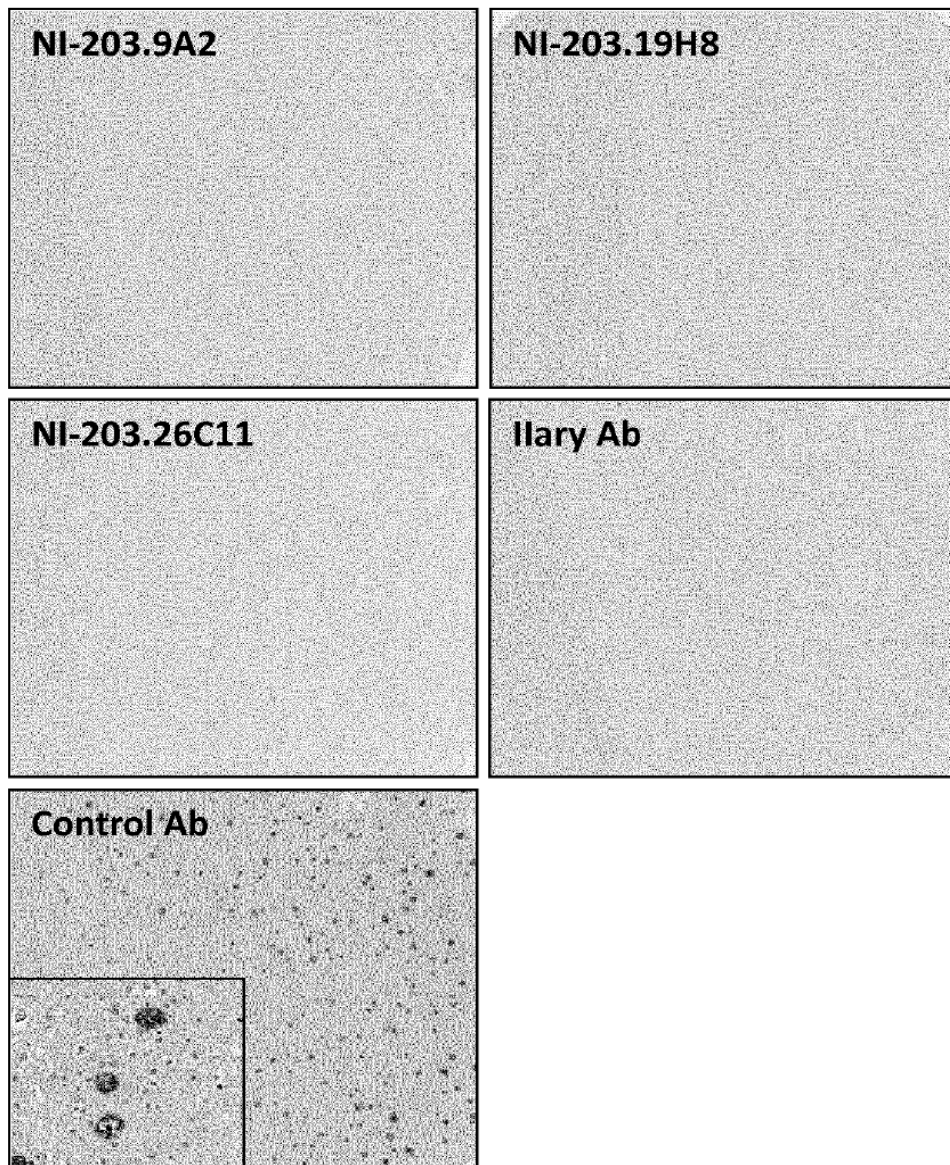
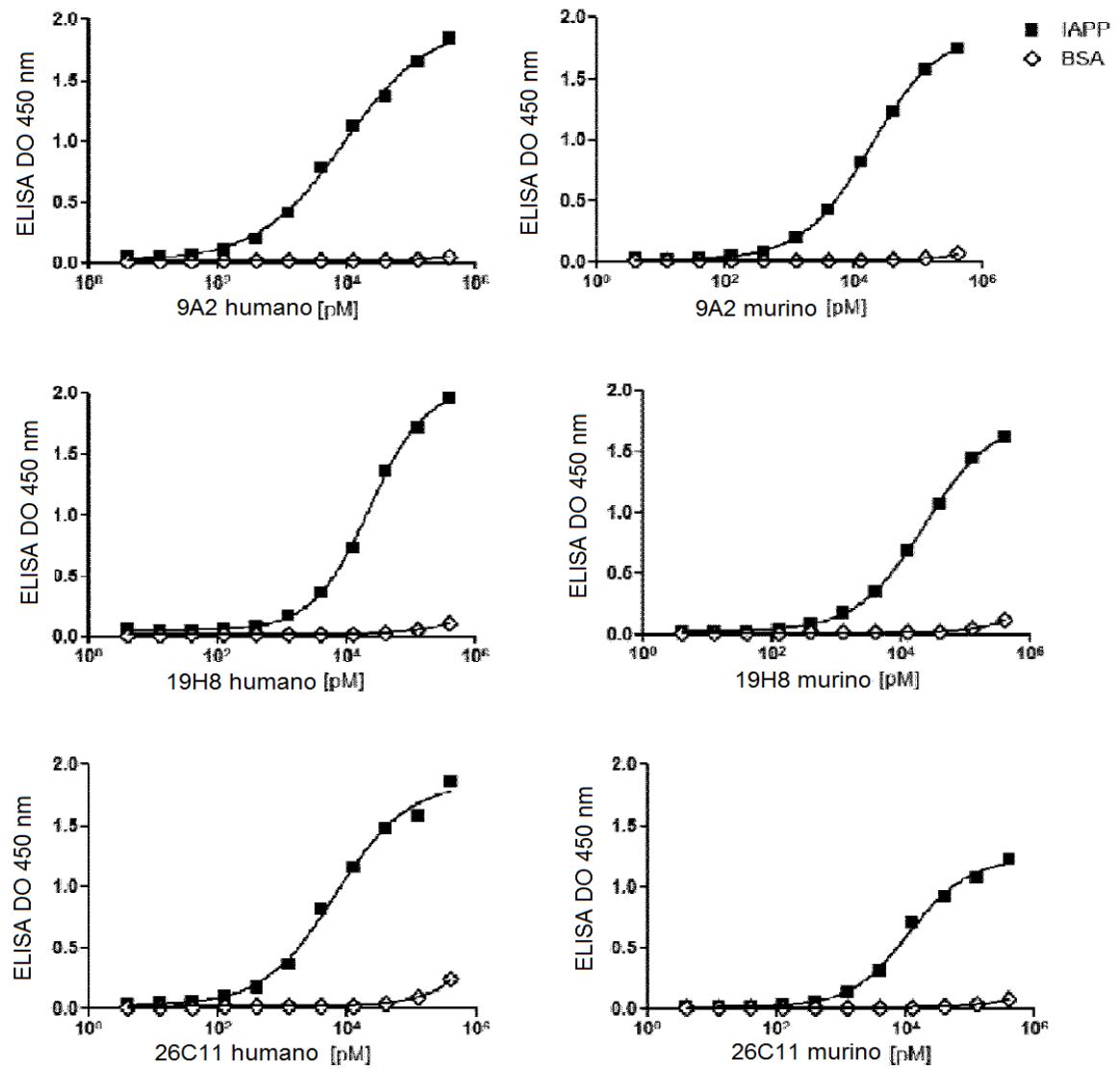


Figura 10

A**B**

Anticuerpos humanos	EC ₅₀ [nM]
NI-203.9A2	9.4
NI-203.19H8	22.9
NI-203.26C11	6.8

C

Anticuerpos quiméricos de ratón	EC ₅₀ [nM]
NI-203.9A2	18.6
NI-203.19H8	23.9
NI-203.26C11	11.5

Figura 11

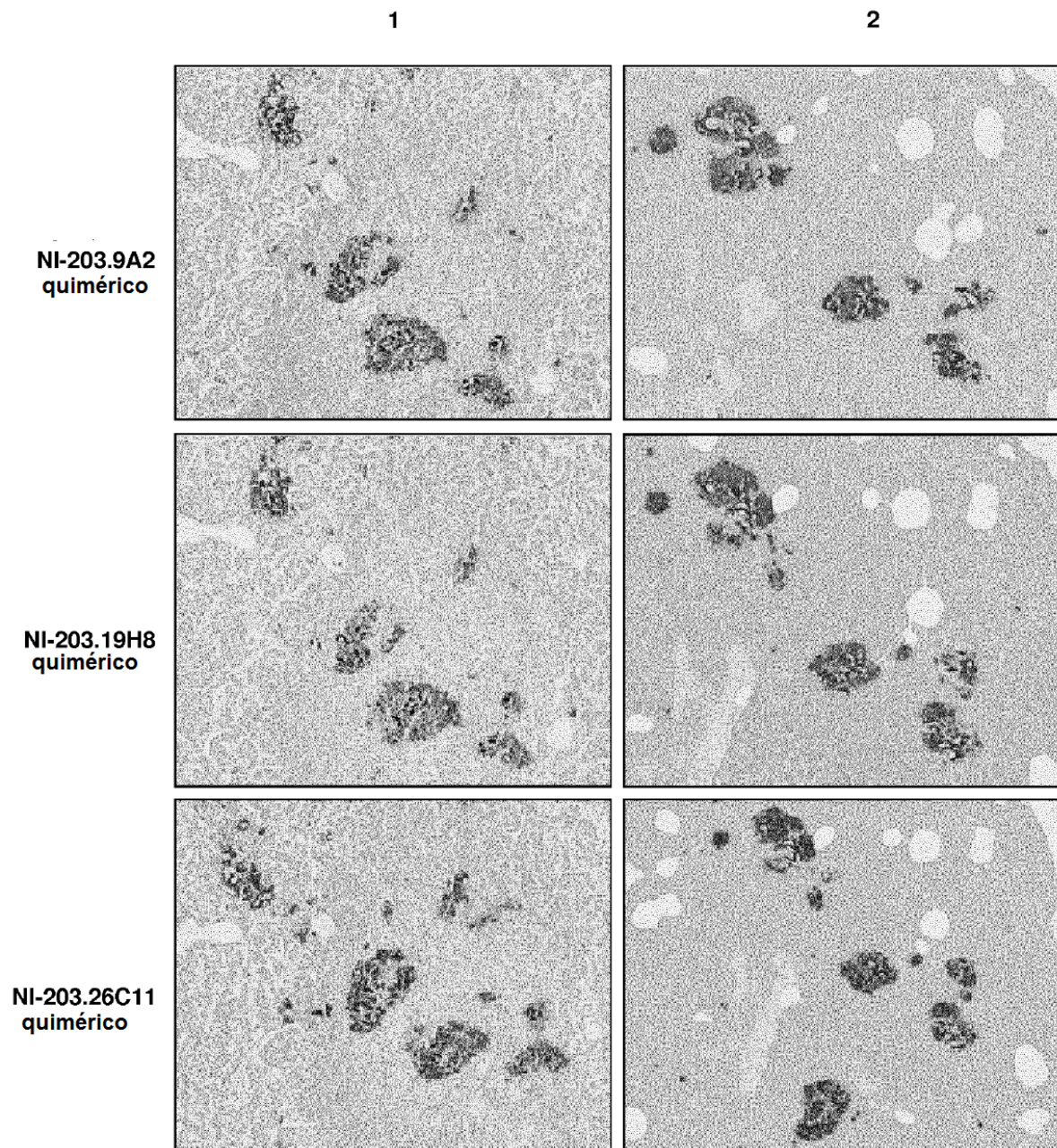


Figura 12