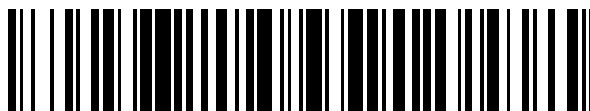


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 687 951**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

C07K 16/40 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.10.2012** **PCT/US2012/059878**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.04.2013** **WO13055998**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.10.2012** **E 12840084 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.07.2018** **EP 2766393**

54 Título: **Anticuerpos anti-HtrA1 y procedimientos de uso**

30 Prioridad:

14.10.2011 US 201161547649 P

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

30.10.2018

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es:

WU, YAN;
VAN LOOKEREN-CAMPAGNE, MENNO;
KIRCHHOFFER, DANIEL;
LIPARI, MICHAEL TERRY;
KATSCHKE, JR., KENNETH J.;
MORAN, PAUL M.;
STAWICKI, SCOTT y
LIANG, WEI-CHING

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 687 951 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-HtrA1 y procedimientos de uso

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a anticuerpos anti-HtrA1 y a procedimientos de uso de los mismos.

Antecedentes

La serina proteasa HtrA1 (PRSS11, Clan PA, familia S1) pertenece a una familia evolutivamente conservada de proteínas HtrA (Clausen, T., *et al.*, *Nat Rev Mol Cell Biol* 12:152-62 (2011); Clausen, T., *et al.*, *Mol Cell* 10:443-55 (2002)). En seres humanos, HtrA1, 3 y 4 comparten la misma arquitectura de dominio: un módulo similar a IGFBP N terminal y un módulo similar a Kazal, un dominio proteasa con pliegue similar a tripsina y un dominio PDZ C terminal. La pertinencia fisiológica de HtrA1 se ha establecido firmemente mediante la identificación de mutaciones humanas con pérdida de función que provocan microangiopatía cerebral isquémica hereditaria (Hara, K., *et al.*, *N Engl J Med* 360:1729-39 (2009)). El mecanismo molecular implica una inhibición insuficiente de TGF- β por HtrA1 que da como resultado una señalización de TGF- β incrementada (Hara *et al.*, 2009). La señalización de TGF- β con regulación errónea mediante la expresión anómala de HtrA1 también puede contribuir a la enfermedad artrítica (Oka, C., *et al.*, *Development* 131:1041-53 (2004); Tsuchiya, A., *et al.*, *Bone* 37:323-36 (2005)), quizás junto con la degradación mediada por HtrA1 de diversos componentes de la matriz extracelular (Chamberland *et al.*, *J Biol Chem* 284:27352-9 (2009); Grau, S., *et al.*, *J Biol Chem* 281:6124-9 (2006); Hadfield, K.D., *et al.*, *J Biol Chem* 283:5928-38 (2008); Tocharus, J., *et al.*, *Dev Growth Differ* 46:257-74 (2004); Tsuchiya *et al.*, 2005)) o indirectamente por medio de la regulación por incremento de las metaloproteasas de la matriz (Grau *et al.*, 2006). Además, los estudios genéticos en seres humanos identificaron una fuerte correlación entre la progresión de la degeneración macular senil y un SNP en la región promotora de HtrA1, que da como resultado niveles de transcritos de HtrA1 incrementados (Dewan, A., *et al.*, *Science* 314:989-92 (2006); Yang, Z., *et al.*, *Science* 314:992-3 (2006)). Se divulgan anticuerpos policlonales frente a HtrA1 en el documento WO 2009/046405. Por lo tanto, la inhibición de la función enzimática de HtrA1 es un enfoque terapéutico atractivo, por ejemplo, en la degeneración macular senil y en la enfermedad artrítica.

Sumario

La invención proporciona anticuerpos anti-HtrA1 y procedimientos de uso de los mismos para fines terapéuticos como se define en las reivindicaciones. La invención se dirige a un anticuerpo monoclonal aislado que se une a HtrA1 e inhibe su actividad serina proteasa para uno o más sustratos para HtrA1, en el que el anticuerpo comprende una secuencia de VH que comprende la SEQ ID NO: 32 y una secuencia de VL que comprende la SEQ ID NO: 31.

En un aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a HtrA1 que tiene una o más de las siguientes propiedades: (i) una Cl_{50} de menos de 50 nM, 30 nM, 25 nM, 20 nM, 15 nM, 10 nM, 5 nM, 3 nM, 2,5 nM, 2 nM, 1 nM o menos para uno o más sustratos para HtrA1; (ii) se une a HtrA1 con una proporción de 1 dominio variable a una subunidad de un trímero de HtrA1 (por ejemplo, un Fab se une a un trímero de HtrA1 con una proporción de 3 Fab a 1 trímero de HtrA1 y una IgG se une a un trímero de HtrA1 con una proporción de 3 IgG a 2 trímeros de HtrA1), (iii) para los anticuerpos que comprenden dos dominios variables, se une a HtrA1 de una manera que da como resultado la formación de una "jaula" similar a la mostrada en la fig. 9, (iv) no previene la formación de trímeros de HtrA1, (v) se une a uno o más residuos en el bucle C de la proteína HtrA1, (vi) se une al dominio proteasa de HtrA1, (vii) se une a un epítipo que comprende uno o ambos de los aminoácidos N224 o K248 de SEQ ID NO: 13, o aminoácidos equivalentes a los mismos en una secuencia de HtrA1 diferente (por ejemplo, los aminoácidos N224 y K248 de SEQ ID NO: 14, véanse las figs. 10A y B); (viii) se une a un epítipo que comprende uno o más de los siguientes residuos de N224, K248, V201, T223, K243, K225, E247 y H220 de SEQ ID NO: 13, o aminoácidos equivalentes a los mismos en una secuencia de HtrA1 diferente; (ix) reacciona de manera cruzada con HtrA1 murina; (x) no reacciona de manera cruzada con HtrA2, HtrA3 y/o HtrA4; (xi) se une de manera competitiva a HtrA1 con un anticuerpo que comprende una secuencia de VH de SEQ ID NO: 8 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 7, (xii) se une a HtrA1 con una constante de disociación de ≤ 500 nM o (xiii) inhibe la formación de complejos entre HtrA1 y $\alpha 1$ antitripsina (A1AT).

En otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une a HtrA1, en el que el anticuerpo (i) se une a un epítipo que incluye N224, K248, o ambos, de HtrA1 e (ii) inhibe HtrA1 con una Cl_{50} de ≤ 30 nM. En determinados modos de realización, el epítipo incluye además uno o más de los siguientes residuos de HtrA1: V201, T223, K243, K225, E247 y H220. En determinados modos de realización, el anticuerpo puede comprender además una o más de las siguientes propiedades: (i) se une a HtrA1 con una proporción de 1 dominio variable a una subunidad de un trímero de HtrA1 o (ii) no previene la formación de trímeros de HtrA1. En determinados modos de realización, se determina la Cl_{50} usando un ensayo con serina proteasa con un sustrato que tiene la SEQ ID NO: 12, por ejemplo, tal como el ensayo de FRET descrito en el presente documento.

En determinados modos de realización, un anticuerpo descrito en el presente documento no reacciona de manera cruzada con uno o más de HtrA2, HtrA3 y HtrA4.

En determinados modos de realización, un anticuerpo descrito en el presente documento tiene una constante de disociación de ≤ 500 nM. La constante de disociación se puede determinar, por ejemplo, mediante BIAcore usando un Fab.

En determinados modos de realización, un anticuerpo descrito en el presente documento es un anticuerpo humano, humanizado o quimérico.

En determinados modos de realización, un anticuerpo descrito en el presente documento es un fragmento de anticuerpo que se une a HtrA1.

En determinados modos de realización, un anticuerpo descrito en el presente documento comprende (a) HVR-H1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; (b) HVR-H2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; y (c) HVR-H3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 y (d) HVR-L1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; (e) HVR-L2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y (f) HVR-L3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

En determinados modos de realización, un anticuerpo descrito en el presente documento comprende (a) HVR-H1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20; (b) HVR-H2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; y (c) HVR-H3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

En determinados modos de realización, un anticuerpo descrito en el presente documento comprende además (a) HVR-L1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18; (b) HVR-L2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y (c) HVR-L3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19, o el anticuerpo descrito en el presente documento comprende además (d) HVR-L1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21; (e) HVR-L2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y (f) HVR-L3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22. En determinados modos de realización, un anticuerpo descrito en el presente documento comprende además una secuencia estructural (FR2) del dominio variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 17.

En determinados modos de realización, un anticuerpo descrito en el presente documento comprende (a) una secuencia de VH que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8; (b) una secuencia de VL que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.

En determinados modos de realización, un anticuerpo descrito en el presente documento comprende una secuencia de VH que comprende la SEQ ID NO: 32 y una secuencia de VL que comprende la SEQ ID NO: 31.

En determinados modos de realización, un anticuerpo descrito en el presente documento comprende una secuencia de VH de SEQ ID NO: 8 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 7.

En determinados modos de realización, un anticuerpo descrito en el presente documento comprende una secuencia de VH de SEQ ID NO: 30 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 28.

En determinados modos de realización, un anticuerpo descrito en el presente documento comprende una secuencia de VH de SEQ ID NO: 30 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 29.

En determinados modos de realización, un anticuerpo descrito en el presente documento es un anticuerpo IgG1 o IgG4 de longitud completa.

En otro aspecto, se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo anti-HtrA1 descrito en el presente documento.

En otro aspecto, se proporciona una célula huésped que comprende un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo anti-HtrA1 descrito en el presente documento.

En otro aspecto, se proporciona un procedimiento de producción de un anticuerpo. El procedimiento puede comprender cultivar una célula huésped que comprende un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo anti-HtrA1 en condiciones adecuadas para la expresión del ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-HtrA1. El procedimiento puede comprender además recuperar el anticuerpo anti-HtrA1 del cultivo de células huésped, purificar el anticuerpo anti-HtrA1 o formular el anticuerpo anti-HtrA1 con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, se proporciona un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo anti-HtrA1 y un agente citotóxico.

En otro aspecto, se proporciona una formulación farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-HtrA1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la solicitud proporciona un anticuerpo anti-HtrA1 para su uso como medicamento, por ejemplo, para su uso en el tratamiento de la degeneración macular senil (DMS, húmeda o seca), atrofia geográfica (AG), retinopatía diabética (RD), retinopatía de la prematuridad (RP) o vasculopatía coroidea polipoidea (VCP), para inhibir la degeneración de las células de la retina o fotorreceptoras o para inhibir la actividad proteasa de HtrA1 en un ojo.

En otro aspecto, la solicitud proporciona un anticuerpo anti-HtrA1 para su uso del tratamiento de un individuo que tiene degeneración macular senil (húmeda o seca), atrofia geográfica, retinopatía diabética, retinopatía de la prematuridad o vasculopatía coroidea polipoidea, que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-HtrA1 como se describe en el presente documento.

En otro aspecto, la solicitud proporciona un anticuerpo anti-HtrA1 para su uso en la inhibición de la degeneración de las células de la retina o fotorreceptoras en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-HtrA1 como se describe en el presente documento para inhibir la degeneración de las células de la retina o fotorreceptoras.

En otro aspecto, la solicitud proporciona un anticuerpo anti-HtrA1 para su uso en la inhibición de la actividad serina proteasa de HtrA1 en un ojo de un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-HtrA1 como se describe en el presente documento para inhibir la actividad serina proteasa de HtrA1 en el ojo.

Breve descripción de las figuras

Figs. 1A-B. La fig. 1A muestra la secuencia de dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo 94 anti-HtrA1 (YW505.94) (SEQ ID NO: 7). La fig. 1B muestra la secuencia de dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo 94 anti-HtrA1 (YW505.94) (SEQ ID NO: 8). Los residuos se numeran de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat (Kabat, E.A., *et al.*, 1991, en: Sequences of proteins of immunological interest, quinta edición. National Institutes of Health, Bethesda, MD). La secuencia de dominio variable de la cadena ligera de YW505.94 se alinea con la secuencia consenso de la cadena ligera Kappa I humana (SEQ ID NO: 9) y la secuencia de dominio variable de la cadena pesada de YW505.94 se alinea con la secuencia de la cadena pesada del subgrupo III humana (SEQ ID NO: 10). Las secuencias encerradas en cuadros son CDR de acuerdo con las definiciones de Kabat. Las diferencias de secuencia entre anti-HtrA1 (YW505.94) y las secuencias consenso aparecen sombreadas.

Fig. 2. Cribado del panel de 13 anticuerpos derivados de fago (IgG). Se incubaron concentraciones únicas (0,08-0,28 mg/ml final) de IgG con HuHtrA1 o HuHtrA1_PD y se midió la actividad enzimática en el ensayo de FRET. De los 13 anticuerpos sometidos a prueba, los anticuerpos YW503.57, YW504.57, YW504.61 e YW505.94 (también denominado Ab94 o IgG94) inhibieron fuertemente las actividades tanto de HuHtrA1 como de HuHtrA1_PD.

Fig. 3. Inhibición de HuHtrA1 por IgG94 y Fab94. Se incubó HuHtrA1 con IgG94 y Fab94 durante 20 min a 37 °C. Se midió la actividad enzimática frente al sustrato peptídico H2-Opt y se calcularon las actividades fraccionales (v_i/v_o) a partir de las velocidades lineales determinadas. IgG94 a 300 nM no inhibió la hidrólisis de H2-Opt por tripsina (1 nM) o elastasa (1 nM).

Fig. 4. IgG94 inhibe la hidrólisis de caseína marcada con tinte fluorescente (BODIPY FL) por HuHtrA1 y MuHtrA1. Se incubaron HuHtrA1 y MuHtrA1 con IgG94 durante 15 min a 37 °C. Se midió la hidrólisis del reactivo BODIPY FL de caseína en un lector de microplacas a 37 °C y se determinaron las tasas lineales del incremento de fluorescencia y se expresaron como un porcentaje de tasas no inhibidas (% de control).

Fig. 5. Especificidad de IgG94. Se incubaron MuHtrA1_PD, MuHtrA3_PD y MuHtrA4_PD con concentraciones crecientes de IgG94 y se determinaron las actividades enzimáticas frente al sustrato peptídico H2-Opt (panel superior) o reactivo BODIPY FL de caseína (panel inferior) y se expresaron como un porcentaje de actividades enzimáticas no inhibidas (% de control).

Fig. 6. Inhibición por IgG94 de la escisión de sustratos macromoleculares mediada por HuHtrA1. Se incubaron concentraciones crecientes de IgG94 (2,3-150 nM para β -caseína, 2-125 nM para decorina, 2,3-150 nM para biglucano) con HuHtrA1 (10 nM para β -caseína, 125 nM para decorina, 75 nM para biglucano) durante 15 min a 37 °C. Se añadieron los sustratos β -caseína, decorina y biglucano (50 μ g/ml) y se incubaron durante 2-14 h. Después de la adición de tampón de muestra de SDS, se analizaron los hidrolizados mediante SDS-PAGE (condiciones no reductoras) y se tiñeron mediante SimplyBlue Safestain.

Figs. 7A-C. Cartografía del epítipo funcional de IgG94 en HuHtrA1_PD. La fig. 7A muestra los resultados de un ELISA que mide la unión de IgG94 a los mutantes de HuHtrA1_PD con sustituciones de alanina de los residuos circundantes al sitio activo. Las filas sombreadas indican sustituciones de alanina que dieron como resultado una disminución de la unión superior a 5 veces. La fig. 7B muestra la estructura de HuHtrA1_PD (PDB 3NWU) (Clausen, T., *et al.*, Nat Rev Mol Cell Biol. 12:152-62 (2011)) con residuos mutados indicados. El sombreado en gris medio muestra mutaciones sin pérdida de unión a IgG94 en experimentos iniciales; el sombreado en gris oscuro muestra un subconjunto de

residuos con pérdida > 5 veces de la afinidad de unión. Los tres monómeros que forman el trímero del dominio proteasa, mostrados en la representación superficial, están sombreados en gris claro. Los residuos de la tríada catalítica D250 y S328 están subrayados. La fig. 7C muestra una vista en primer plano de los bucles que albergan los residuos N224 y K248 del epítipo en un monómero (gris claro, en diagrama en colores) de HuHtrA1_PD (PDB 3NWU). También se incluye el residuo catalítico H220.

Figs. 8A-B. SEC-MALLS (cromatografía de exclusión por tamaño-dispersión de luz láser de ángulo múltiple) del complejo Fab94:HuHtrA1_PD (S328A) (fig. 8A) y del complejo IgG94:HuHtrA1_PD (S328A) (fig. 8B). Se muestran los picos de elución mediante SEC (eje x) y las masas de proteínas y complejos individuales (eje y, líneas de puntos a lo largo de los picos de elución).

Fig. 9. Hipotético 'modelo de jaula' del complejo IgG:HuHtrA1-PD.

Figs. 10A-B. Alineación de HtrA1 humana (SEQ ID NO: 13), HtrA1 murina (SEQ ID NO: 14), HtrA3 murina (SEQ ID NO: 15) y HtrA4 murina (SEQ ID NO: 16).

Fig. 11. La expresión de ARNm de HtrA1 se incrementa en la retina en un modelo murino de exposición a la luz constante (panel superior izquierdo). Los niveles de HtrA2 no varían significativamente en el mismo modelo (panel superior derecho). La expresión de HtrA1 es significativamente más alta que los niveles de expresión de HtrA2, HtrA3 y HtrA4 en la retina de ratón en el punto de referencia (panel inferior).

Fig. 12. Respuestas incrementadas de las células bipolares/glías de Müller en ausencia de expresión de HtrA1 en un modelo murino de exposición a la luz constante.

Fig. 13. Preservación de la retina en ausencia de expresión de HtrA1 en un modelo murino de exposición a la luz constante.

Fig. 14. Preservación de las células fotorreceptoras de la capa nuclear externa (CNE) en ausencia de expresión de HtrA1 en un modelo murino de exposición a la luz constante.

Fig. 15. Secuencias de HVR de la cadena ligera para variantes mejoradas en afinidad del anticuerpo anti-HtrA1 YW505.94a.

Fig. 16. Secuencias de HVR de la cadena pesada para variantes mejoradas en afinidad del anticuerpo anti-HtrA1 YW505.94a.

Fig. 17. Resultados de un ensayo de competición con fago que demuestra la unión de variantes mejoradas en afinidad de YW505.94a frente a HuHtrA1.

Fig. 18. Resultados de un ensayo de competición con fago que demuestra la unión de variantes mejoradas por afinidad de YW505.94a frente a MuHtrA1.

Figs. 19A-C. Resultados del ensayo de ELISA que muestran los niveles de proteína HtrA1 en tejidos de rata (fig. 19A), líquido ocular de ratón (fig. 19B) y tejido de la retina de ratón (fig. 19C).

Descripción detallada de los modos de realización de la invención

I. Definiciones

Una "estructura humana aceptora" para los fines en el presente documento es una estructura que comprende la secuencia de aminoácidos de una estructura del dominio variable de la cadena ligera (VL) o una estructura del dominio variable de la cadena pesada (VH) derivada de una estructura de inmunoglobulina humana o una estructura consenso humana, como se define a continuación. Una estructura humana aceptora "derivada de" una estructura de inmunoglobulina humana o una estructura consenso humana puede comprender la misma secuencia de aminoácidos de la misma o puede contener cambios en la secuencia de aminoácidos. En algunos modos de realización, el número de cambios de aminoácidos es 10 o menos, 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos o 2 o menos. En algunos modos de realización, la estructura humana aceptora de VL es idéntica en secuencia a la secuencia estructural de inmunoglobulina humana de VL o a la secuencia estructural consenso humana.

"Afinidad" se refiere a la fuerza de la suma total de las interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su ligando (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique de otro modo, como se usa en el presente documento, "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre los miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su ligando Y se puede representar, en general, mediante la constante de disociación (Kd). La afinidad se puede medir mediante procedimientos comunes conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en el presente documento. Los modos de realización ilustrativos y ejemplares específicos para medir la afinidad de unión

se describen a continuación.

Un anticuerpo “con maduración de la afinidad” se refiere a un anticuerpo con una o más alteraciones en una o más regiones hipervariables (HVR), en comparación con un anticuerpo original que no posee dichas alteraciones, dando como resultado dichas alteraciones una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno.

Los términos “anticuerpo anti-HtrA1” y “un anticuerpo que se une a HtrA1” se refieren a un anticuerpo que se puede unir a HtrA1 con una afinidad suficiente, de tal manera que el anticuerpo sea útil como agente de diagnóstico y/o terapéutico en la selección como diana de HtrA1. En un modo de realización, el grado de unión de un anticuerpo anti-HtrA1 a una proteína distinta de HtrA1 no relacionada es de menos de aproximadamente un 10 % de la unión del anticuerpo a HtrA1 como se mide, por ejemplo, mediante un radioinmunoensayo (RIA). En determinados modos de realización, un anticuerpo que se une a HtrA1 tiene una constante de disociación (K_d) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0,1 \text{ nM}$, $\leq 0,01 \text{ nM}$ o $\leq 0,001 \text{ nM}$ (por ejemplo, 10^{-8} M o menos, por ejemplo, desde 10^{-8} M a 10^{-13} M , por ejemplo, desde 10^{-9} M a 10^{-13} M). En determinados modos de realización, un anticuerpo anti-HtrA1 se une a un epítipo de HtrA1 que está conservado entre HtrA1 de especies diferentes.

Se usa el término “anticuerpo” en el presente documento en el sentido más amplio y abarca diversas estructuras de anticuerpos, que incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multispecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo siempre que presenten la actividad de unión a antígeno deseada.

Un “fragmento de anticuerpo” se refiere a una molécula distinta de un anticuerpo inalterado que comprende una porción de un anticuerpo inalterado que se une al antígeno al que se une el anticuerpo inalterado. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpos monocatenarios (por ejemplo, scFv) y anticuerpos multispecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

Un “anticuerpo que se une al mismo epítipo” que un anticuerpo de referencia se refiere a un anticuerpo que bloquea la unión del anticuerpo de referencia a su antígeno en un ensayo de competición en un 50 % o más y, a la inversa, el anticuerpo de referencia bloquea la unión del anticuerpo a su antígeno en un ensayo de competición en un 50 % o más. En el presente documento se proporciona un ensayo de competición ejemplar.

El término anticuerpo “quimérico” se refiere a un anticuerpo en el que una porción de la cadena pesada y/o ligera deriva de una fuente o especie particular, mientras que el resto de la cadena pesada y/o ligera deriva de una fuente o especie diferente.

La “clase” de un anticuerpo se refiere al tipo de dominio constante o región constante que posee su cadena pesada. Hay cinco clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas se pueden dividir además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂. Los dominios constantes de la cadena pesada que se corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se llaman α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente.

El término “agente citotóxico” como se usa en el presente documento se refiere a una sustancia que inhibe o previene una función celular y/o provoca la muerte o destrucción celular. Los agentes citotóxicos incluyen, pero no se limitan a, isótopos radioactivos (por ejemplo, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² e isótopos radioactivos de Lu); agentes o fármacos quimioterápicos (por ejemplo, metotrexato, adriamicina, alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, daunorrubicina u otros agentes intercalantes); agentes inhibidores del crecimiento; enzimas y fragmentos de las mismas, tales como enzimas nucleolíticas; antibióticos; toxinas, tales como toxinas de micromoléculas o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de las mismas; y los diversos agentes antineoplásicos o antitumorales divulgados a continuación.

“Funciones efectoras” se refieren a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc de un anticuerpo, que varían con el isotipo del anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC); unión al receptor Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC); fagocitosis; la regulación por disminución de receptores de la superficie celular (por ejemplo, el receptor de linfocitos B); y activación de linfocitos B.

Una “cantidad eficaz” de un agente, por ejemplo, una formulación farmacéutica, se refiere a una cantidad eficaz, en las dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico o profiláctico deseado.

El término “región Fc” se usa en el presente documento para definir una región C terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene al menos una porción de la región constante. El término incluye regiones Fc y regiones Fc variantes de secuencia natural. En un modo de realización, una región Fc de la cadena pesada de IgG humana se extiende desde Cys226, o desde Pro230, al extremo carboxílico de la cadena pesada. Sin embargo, la lisina C terminal (Fys447) de la región Fc puede o no estar presente. A menos que se especifique de otro modo en el presente documento, la numeración de los residuos de aminoácido en la región Fc o región constante se realiza de acuerdo

con el sistema de numeración EU, también llamado índice EU, como se describe en Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

“Región estructural” o “FR” se refiere a los residuos del dominio variable distintos de los residuos de la región hipervariable (HVR). La FR de un dominio variable consiste, en general, en cuatro dominios de FR: FR1, FR2, FR3 y FR4. En consecuencia, las secuencias de HVR y FR aparecen, en general, en la siguiente secuencia en VH (o VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

Los términos “anticuerpo de longitud completa”, “anticuerpo inalterado” y “anticuerpo completo” se usan en el presente documento de manera intercambiable para referirse a un anticuerpo que tiene una estructura sustancialmente similar a una estructura de anticuerpo natural o que tiene cadenas pesadas que contienen una región Fc como se define en el presente documento.

Los términos “célula huésped”, “línea de células huésped” y “cultivo de células huésped” se usan de manera intercambiable y se refieren a células en las que se ha introducido ácido nucleico exógeno, incluyendo la descendencia de dichas células. Las células huésped incluyen “transformantes” y “células transformadas”, que incluyen la célula transformada primaria y la descendencia derivada de la misma independientemente del número de pases. La descendencia puede que no sea completamente idéntica en el contenido de ácido nucleico a una célula original, sino que puede contener mutaciones. La descendencia mutante que tiene la misma función o actividad biológica que la cribada o seleccionada en la célula transformada originalmente se incluye en el presente documento.

Un “anticuerpo humano” es uno que posee una secuencia de aminoácidos que se corresponde con la de un anticuerpo producido por un ser humano o una célula humana o derivado de una fuente no humana que utiliza repertorios de anticuerpos humanos u otras secuencias que codifican anticuerpos humanos. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión a antígeno no humanos.

Una “estructura consenso humana” es una estructura que representa los residuos de aminoácido que se producen más comúnmente en una selección de secuencias estructurales de VL o VH de inmunoglobulina humana. En general, la selección de secuencias de VL o VH de inmunoglobulina humana es a partir de un subgrupo de secuencias de dominio variable. En general, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, publicación del NIH 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3. En un modo de realización, para el VL, el subgrupo es el subgrupo kappa I como en Kabat *et al.*, *supra*. En un modo de realización, para el VH, el subgrupo es el subgrupo III como en Kabat *et al.*, *supra*.

Un anticuerpo “humanizado” se refiere a un anticuerpo quimérico que comprende residuos de aminoácido de HVR no humanas y residuos de aminoácido de FR humanas. En determinados modos de realización, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos un dominio variable, y típicamente dos, en el que/en los que todas o sustancialmente todas las HVR (por ejemplo, CDR) se corresponden con las de un anticuerpo no humano y todas o sustancialmente todas las FR se corresponden con las de un anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado puede comprender opcionalmente al menos una porción de una región constante de anticuerpo derivada de un anticuerpo humano. Una “forma humanizada” de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo no humano, se refiere a un anticuerpo que se ha sometido a humanización.

El término “región hipervariable” o “HVR” como se usa en el presente documento se refiere a cada una de las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son de secuencia hipervariable y/o forman bucles definidos estructuralmente (“bucles hipervariables”). En general, los anticuerpos tetracatenarios naturales comprenden seis HVR; tres en el VH (H1, H2, H3) y tres en el VL (L1, L2, L3). Las HVR comprenden, en general, residuos de aminoácido de los bucles hipervariables y/o de las “regiones determinantes de la complementariedad” (CDR), siendo las últimas las de variabilidad de secuencia más alta y/o estando implicadas en el reconocimiento antigénico. Una región HVR como se usa en el presente documento comprende cualquier número de residuos localizados dentro de las posiciones 24-36 (para L1), 46-56 (para L2), 89-97 (para L3), 26-35B (para H1), 47-65 (para H2) y 93-102 (para H3). Por lo tanto, una HVR incluye residuos en las posiciones descritas previamente:

A) 24-34 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) (Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987);

B) 24-34 de L1, 50-56 de L2, 89-97 de L3, 31-35B de H1, 50-65 de H2 y 95-102 de H3 (Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991).

C) 30-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35 (H1), 47-58 (H2), 93-100a-j (H3) (MacCallum *et al.* *J. Mol. Biol.* 262:732-745 (1996).

Con la excepción de CDR1 en VH, las CDR comprenden, en general, los residuos de aminoácido que forman los bucles hipervariables. Las CDR también comprenden “residuos determinantes de la especificidad” o “SDR”, que son los residuos que entran en contacto con el antígeno. Los SDR están contenidos dentro de regiones de las CDR, llamadas CDR abreviadas o a-CDR. Las a-CDR ejemplares (a-CDR-L1, a-CDR-L2, a-CDR-L3, a-CDR-H1, a-CDR-H2

y a-CDR-H3) se producen en los residuos de aminoácido 31-34 de L1, 50-55 de L2, 89-96 de L3, 31-35B de H1, 50-58 de H2 y 95-102 de H3. (Véase Almagro y Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008).) A menos que se indique de otro modo, los residuos de HVR y otros residuos en el dominio variable (por ejemplo, los residuos de FR) se numeran en el presente documento de acuerdo con Kabat *et al.*, *supra*.

Un “inmunoconjugado” es un anticuerpo conjugado a una o más molécula(s) heterógena(s) que incluyen, pero no se limitan a, un agente citotóxico.

Un “individuo” o “sujeto” es un mamífero. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a, animales domesticados (por ejemplo, vacas, ovejas, gatos, perros y caballos), primates (por ejemplo, seres humanos y primates no humanos, tales como monos), conejos y roedores (por ejemplo, ratones y ratas). En determinados modos de realización, el individuo o sujeto es un ser humano.

Un anticuerpo “aislado” es uno que se ha separado de un componente de su entorno natural. En algunos modos de realización, un anticuerpo se purifica a más de un 95 % o 99 % de pureza determinada, por ejemplo, mediante electroforesis (por ejemplo, SDS-PAGE, isoelectroenfoque (IEF), electroforesis capilar) o cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico o HPLC de fase inversa). Para obtener una revisión de los procedimientos para evaluar la pureza de los anticuerpos, véase, por ejemplo, Flatman *et al.*, *J. Chromatogr. B* 848:79-87 (2007).

Un ácido nucleico “aislado” se refiere a una molécula de ácido nucleico que se ha separado de un componente de su entorno natural. Un ácido nucleico aislado incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que contienen habitualmente la molécula de ácido nucleico, pero la molécula de ácido nucleico está presente de manera extracromosómica en una localización cromosómica que es diferente de su localización cromosómica natural o contiene solo secuencias codificantes.

“Ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo anti-HtrA1” se refiere a una o más moléculas de ácido nucleico que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpo (o fragmentos de las mismas), incluyéndose dicha(s) molécula(s) de ácido nucleico en un único vector o en vectores separados, y estando dicha(s) molécula(s) de ácido nucleico presente(s) en una o más localizaciones en una célula huésped.

El término “anticuerpo monoclonal” como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al mismo epítipo, excepto por posibles anticuerpos variantes, por ejemplo, que contienen mutaciones naturales o surgen durante la producción de una preparación de anticuerpos monoclonales, estando presentes, en general, dichas variantes en cantidades insignificantes. A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales, que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos frente a diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales se dirige frente a un único determinante en un antígeno. Por tanto, el modificador “monoclonal” indica el carácter del anticuerpo por haberse obtenido a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se debe interpretar como que requiere la producción del anticuerpo mediante ningún procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se van a usar de acuerdo con la presente invención se pueden preparar mediante una variedad de técnicas, que incluyen, pero no se limitan al procedimiento de hibridoma, procedimientos de ADN recombinante, procedimientos de presentación en fagos y procedimientos que utilizan animales transgénicos que contienen todos o parte de los locus de inmunoglobulina humana; estando descritos en el presente documento dichos procedimientos y otros procedimientos ejemplares para preparar anticuerpos monoclonales.

Un “anticuerpo no marcado” se refiere a un anticuerpo que no está conjugado a un resto heterógeno, (por ejemplo, un resto citotóxico) o radiomarcador. El anticuerpo no marcado puede estar presente en una formulación farmacéutica.

“Anticuerpos naturales” se refieren a moléculas de inmunoglobulina natural con estructuras variables. Por ejemplo, los anticuerpos IgG naturales son glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 Dalton, compuestas de dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas que están unidas con puentes disulfuro. Desde el extremo N al C, cada cadena pesada tiene una región variable (VH), también llamada dominio pesado variable o dominio variable de la cadena pesada, seguida de tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3). De forma similar, desde el extremo N al C, cada cadena ligera tiene una región variable (VL), también llamada dominio ligero variable o dominio variable de la cadena ligera, seguida de un dominio ligero constante (CL). La cadena ligera de un anticuerpo se puede asignar a uno de dos tipos, llamados kappa (κ) y lambda (λ), basándose en la secuencia de aminoácidos de su dominio constante.

El término “prospecto del envase” se usa para hacer referencia a las instrucciones incluidas habitualmente en los envases comerciales de productos terapéuticos, que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosificación, administración, politerapia, contraindicaciones y/o advertencias con respecto al uso de dichos productos terapéuticos.

“Porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos” con respecto a una secuencia polipeptídica de referencia se define como el porcentaje de residuos de aminoácido de una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácido de secuencia polipeptídica de referencia, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si

fuera necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y sin tener en consideración ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. Se puede lograr la alineación para fines de determinación del porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos de diversas maneras que se encuentran dentro de la experiencia en la técnica, por ejemplo, usando un programa informático disponible al público, tal como el programa informático BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar los parámetros apropiados para alinear secuencias, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr la alineación máxima sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan. Para los fines en el presente documento, sin embargo, los valores del % de identidad de secuencia de aminoácidos se generan usando el programa de ordenador de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa de ordenador de comparación de secuencias ALIGN-2 se creó por Genentech, Inc., y el código fuente se ha presentado con la documentación de usuario en la Oficina de Derechos de Autor de EE. UU., Washington DC, 20559, en la que se ha registrado con el n.º de registro de derechos de autor de EE. UU. TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible al público de Genentech, Inc., South San Francisco, California, o se puede compilar a partir del código fuente. El programa ALIGN-2 se debe compilar para su uso en un sistema operativo UNIX, incluyendo UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias se establecen por el programa ALIGN-2 y no varían.

En situaciones en las que se emplea ALIGN-2 para las comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos dada A con respecto a, con o frente a una secuencia de aminoácidos dada B (que, de forma alternativa, se puede parafrasear como una secuencia de aminoácidos dada A que tiene o comprende un determinado % de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a, con o frente a una secuencia de aminoácidos dada B) se calcula como sigue:

100 veces la fracción X/Y

en la que X es el número de residuos de aminoácido puntuados como emparejamientos idénticos mediante el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en esa alineación del programa de A y B, y en la que Y es el número total de residuos de aminoácido en B. Se apreciará que si la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A con respecto a B no igualará el % de identidad de secuencia de aminoácidos de B con respecto a A. A menos que se indique específicamente de otro modo, todos los valores del % de identidad de secuencia de aminoácidos usados en el presente documento se obtienen como se describe en el párrafo inmediatamente precedente usando el programa de ordenador ALIGN-2.

El término “formulación farmacéutica” se refiere a una preparación que está en tal forma que permite la actividad biológica de un ingrediente activo contenido en la misma para que sea eficaz, y que no contiene ningún componente adicional que sea inaceptablemente tóxico para un sujeto al que se administrará la formulación.

Un “vehículo farmacéuticamente aceptable” se refiere a un ingrediente en una formulación farmacéutica, distinto de un ingrediente activo, que no sea tóxico para un sujeto. Un vehículo farmacéuticamente aceptable incluye, pero no se limita a, un tampón, excipiente, estabilizante o conservante.

El término “A asociada a alto requerimiento de temperatura” o “HtrA1”, como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier HtrA1 natural de cualquier fuente de vertebrado, incluyendo mamíferos tales como primates (por ejemplo, seres humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas), a menos que se indique de otro modo. El término abarca la HtrA1 no procesada “de longitud completa”, así como cualquier forma de HtrA1 que resulte del procesamiento en la célula. El término también abarca variantes naturales de HtrA1, por ejemplo, variantes de empalme o variantes alélicas. Se muestra la secuencia de aminoácidos de una HtrA1 ejemplar en la SEQ ID NO: 13. Los fragmentos ejemplares de HtrA1 humana incluyen fragmentos que comprenden, que consisten esencialmente en, o que consisten en Q23-P480 o P161-K379 de aminoácido.

Como se usa en el presente documento, “tratamiento” (y las variaciones gramaticales del mismo, tales como “tratar” o “que trata”) se refiere a la intervención clínica en un intento de alterar la evolución natural del individuo que se trata, y que se puede realizar para la profilaxis o bien durante la evolución de una patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen, pero no se limitan a, la prevención de la aparición o recidiva de la enfermedad, el alivio de los síntomas, la disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, la prevención de la metástasis, la disminución de la tasa de progresión de la enfermedad, la mejora o atenuación de la enfermedad y la remisión o el pronóstico mejorado. En algunos modos de realización, se usan los anticuerpos de la invención para retrasar el desarrollo de una enfermedad o para ralentizar la progresión de una enfermedad.

El término “región variable” o “dominio variable” se refiere al dominio de una cadena pesada o ligera de anticuerpo que está implicado en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y de la cadena ligera (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo natural, en general, tienen estructuras similares, comprendiendo cada dominio cuatro regiones estructurales (FR) conservadas y tres regiones hipervariables (HVR). (Véase, por ejemplo, Kindt *et al.* *Kuby Immunology*, 6.^a ed., W.H. Freeman and Co., página 91 (2007)). Un único dominio VH o VL puede ser suficiente para conferir especificidad de unión a antígeno. Además, los anticuerpos que se unen a un antígeno particular se pueden aislar usando un dominio VH o VL de un anticuerpo que se une al antígeno para cribar

una colección de dominios VL o VH complementarios, respectivamente. Véase, por ejemplo, Portolano *et al.*, *J. Immunol.* 150:880-887 (1993); Clarkson *et al.*, *Nature* 352:624-628 (1991).

El término "vector", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede propagar otro ácido nucleico al que se enlaza. El término incluye el vector como una estructura de ácido nucleico autorreplicante, así como el vector incorporado en el genoma de una célula huésped en la que se ha introducido. Determinados vectores pueden dirigir la expresión de los ácidos nucleicos a los que se enlazan funcionalmente. Dichos vectores se denominan en el presente documento "vectores de expresión".

II. Composiciones y procedimientos

En un aspecto, la invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que una reducción de la actividad de HtrA1 tiene efectos protectores sobre las células fotorreceptoras en el ojo, la capa nuclear externa y sobre la funcionalidad del electroretinograma. En determinados modos de realización, se proporcionan anticuerpos que se unen a HtrA1. Los anticuerpos de la invención son útiles, por ejemplo, para el diagnóstico o tratamiento de diversas enfermedades asociadas a la actividad de HtrA1, incluyendo trastornos oculares, tales como degeneración macular senil o atrofia geográfica.

A. Anticuerpos anti-HtrA1 ejemplares

La invención se dirige a un anticuerpo monoclonal aislado que se une a HtrA1 e inhibe su actividad serina proteasa para uno o más sustratos para HtrA1, en el que el anticuerpo comprende una secuencia de VH que comprende la SEQ ID NO: 32 y una secuencia de VL que comprende la SEQ ID NO: 31. Un anticuerpo anti-HtrA1 puede tener una o más de las siguientes propiedades: (i) tiene una CI_{50} de menos de 50 nM, 30 nM, 25 nM, 20 nM, 15 nM, 10 nM, 5 nM, 3 nM, 2,5 nM, 2 nM, 1 nM o menos para uno o más sustratos para HtrA1; (ii) se une a HtrA1 con una proporción de 1 dominio variable a una subunidad de un trímero de HtrA1 (por ejemplo, un Fab se une a un trímero de HtrA1 con una proporción de 3 Fab a 1 trímero de HtrA1 y una IgG se une a un trímero de HtrA1 con una proporción de 3 IgG a 2 trímeros de HtrA1), (iii) para los anticuerpos que comprenden dos dominios variables, se une a HtrA1 de una manera que da como resultado la formación de una "jaula" similar a la mostrada en la fig. 9, (iv) no previene la formación de trímeros de HtrA1, (v) se une a uno o más residuos en el bucle C de la proteína HtrA1, (vi) se une al dominio proteasa de HtrA1, (vii) se une a un epítipo que comprende uno o ambos de los aminoácidos N224 o K248 de SEQ ID NO: 13, o aminoácidos equivalentes a los mismos en una secuencia de HtrA1 diferente (por ejemplo, los aminoácidos N224 y K248 de SEQ ID NO: 14, véanse las figs. 10A-B); (viii) se une a un epítipo que comprende uno o más de los residuos N224, K248, V201, T223, K243, K225, E247 y H220 de SEQ ID NO: 13, o aminoácidos equivalentes a los mismos en una secuencia de HtrA1 diferente; (ix) reacciona de manera cruzada con HtrA1 murina; (x) no reacciona de manera cruzada con HtrA2, HtrA3 y/o HtrA4; (xi) se une de manera competitiva a HtrA1 con un anticuerpo que comprende una secuencia de VH de SEQ ID NO: 8 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 7 o (xii) se une a HtrA1 con una constante de disociación de ≤ 500 nM o (xiii) inhibe la formación de complejos entre HtrA1 y $\alpha 1$ antitripsina (A1AT).

Se divulga un anticuerpo anti-HtrA1 que comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR seleccionadas de (a) HVR-H1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 87; (b) HVR-H2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 88; (c) HVR-H3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 89; (d) HVR-L1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 85; (e) HVR-L2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58; y (f) HVR-L3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 86. En un modo de realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-HtrA1 que comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR seleccionadas de (a) HVR-H1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25; (b) HVR-H2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26; (c) HVR-H3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27; (d) HVR-L1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23; (e) HVR-L2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y (f) HVR-L3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24. En un modo de realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-HtrA1 que comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR seleccionadas de (a) HVR-H1, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de: SEQ ID NO: 4, 20, 47-51 y 75-80; (b) HVR-H2, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de: SEQ ID NO: 5, 52 y 81-82; (c) HVR-H3, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de: SEQ ID NO: 6, 53 y 83-84; (d) HVR-L1, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de: SEQ ID NO: 1, 18, 21, 33 y 54-57; (e) HVR-L2, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de: SEQ ID NO: 2 y 58; y (f) HVR-L3, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de: SEQ ID NO: 3, 19, 22, 34-46 y 59-74. En un modo de realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-HtrA1 que comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR seleccionadas de (a) HVR-H1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; (b) HVR-H2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; (c) HVR-H3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; (d) HVR-L1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18; (e) HVR-L2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y (f) HVR-L3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3. En un modo de realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-HtrA1 que comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR seleccionadas de (a) HVR-H1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20; (b) HVR-H2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; (c) HVR-H3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; (d) HVR-L1, que comprende la secuencia de aminoácidos

de (i) HVR-L1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23, (ii) HVR-L2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, y (c) HVR-L3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24.

5 En otro modo de realización, un anticuerpo comprende (a) un dominio VH, que comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias de HVR de VH seleccionadas de (i) HVR-H1, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 4, 20, 47-51 y 75-80, (ii) HVR-H2, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 5, 52 y 81-82, e (iii) HVR-H3, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 6, 53 y 83-84; y (b) un dominio VL, que comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias de HVR de VL seleccionadas de (i) HVR-L1, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 1, 18, 21, 33 y 54-57, (ii) HVR-L2, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 2 y 58, y (c) HVR-L3, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 3, 19, 22, 34-46 y 59-74.

15 En otro modo de realización, un anticuerpo comprende (a) un dominio VH, que comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias de HVR de VH seleccionadas de (i) HVR-H1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, (ii) HVR-H2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, e (iii) HVR-H3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; y (b) un dominio VL, que comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias de HVR de VL seleccionadas de (i) HVR-L1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, (ii) HVR-L2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, y (c) HVR-L3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

25 En otro modo de realización, un anticuerpo comprende (a) un dominio VH, que comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias de HVR de VH seleccionadas de (i) HVR-H1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20, (ii) HVR-H2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, e (iii) HVR-H3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; y (b) un dominio VL, que comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias de HVR de VL seleccionadas de (i) HVR-L1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, (ii) HVR-L2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, y (c) HVR-L3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19.

30 En otro aspecto, un anticuerpo comprende (a) un dominio VH, que comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias de HVR de VH seleccionadas de (i) HVR-H1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20, (ii) HVR-H2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, e (iii) HVR-H3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; y (b) un dominio VL, que comprende al menos una, al menos dos o las tres secuencias de HVR de VL seleccionadas de (i) HVR-L1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21, (ii) HVR-L2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, y (c) HVR-L3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22.

40 En otro aspecto, se divulga un anticuerpo que comprende (a) HVR-H1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 87; (b) HVR-H2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 88; (c) HVR-H3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 89; (d) HVR-L1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 85; (e) HVR-L2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58; y (f) HVR-L3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 86. En un modo de realización, la invención proporciona un anticuerpo que comprende (a) HVR-H1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25; (b) HVR-H2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26; (c) HVR-H3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27; (d) HVR-L1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23; (e) HVR-L2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y (f) HVR-L3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24.

50 En otro modo de realización, se divulga un anticuerpo que comprende (a) HVR-H1, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 4, 20, 47-51 y 75-80; (b) HVR-H2, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 5, 52 y 81-82; (c) HVR-H3, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 6, 53 y 83-84; (d) HVR-L1, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 1, 18, 21, 33 y 54-57; (e) HVR-L2, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 2 y 58; y (f) HVR-L3, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 3, 19, 22, 34-46 y 59-74.

60 En otro modo de realización, se divulga un anticuerpo que comprende (a) HVR-H1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; (b) HVR-H2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; (c) HVR-H3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; (d) HVR-L1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; (e) HVR-L2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y (f) HVR-L3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

65 En otro modo de realización, se divulga un anticuerpo que comprende (a) HVR-H1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20; (b) HVR-H2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; (c) HVR-H3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; (d) HVR-L1, que comprende la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO: 18; (e) HVR-L2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y (f) HVR-L3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19.

En otro modo de realización, se divulga un anticuerpo que comprende (a) HVR-H1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20; (b) HVR-H2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; (c) HVR-H3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; (d) HVR-L1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21; (e) HVR-L2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y (f) HVR-L3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22.

En cualquiera de los modos de realización anteriores, se humaniza un anticuerpo anti-HtrA1. En un modo de realización, un anticuerpo anti-HtrA1 comprende HVR como en cualquiera de los modos de realización anteriores, y comprende además una estructura humana aceptora, por ejemplo, una estructura de inmunoglobulina humana o una estructura consenso humana. En otro modo de realización, un anticuerpo anti-HtrA1 comprende HVR como en cualquiera de los modos de realización anteriores, y comprende además un VH que comprende una secuencia FR2 de SEQ ID NO: 17.

En otro aspecto, un anticuerpo anti-HtrA1 comprende una secuencia de dominio variable de la cadena pesada (VH) que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 8 o 29. En determinados modos de realización, una secuencia de VH que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras), inserciones o deleciones en relación con la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-HtrA1 que comprenda esa secuencia retiene la capacidad de unirse a HtrA1. En determinados modos de realización, se han sustituido, insertado y/o deleccionado un total de 1 a 10 aminoácidos en la SEQ ID NO: 8 o 29. En determinados modos de realización, las sustituciones, inserciones o deleciones se producen en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). Opcionalmente, el anticuerpo anti-HtrA1 comprende la secuencia de VH en la SEQ ID NO: 8, 29 o 32, que incluye modificaciones postraduccionales de esa secuencia. En un modo de realización particular, el VH comprende una, dos o tres HVR seleccionadas de: (a) HVR-H1, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de: SEQ ID NO: 4, 20, 25 y 47-51, (b) HVR-H2, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 5, 26 y 52, y (c) HVR-H3, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 6, 27 y 53.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-HtrA1, en el que el anticuerpo comprende un dominio variable de la cadena ligera (VL), que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 7, 28 o 30. En determinados modos de realización, una secuencia de VL que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras), inserciones o deleciones en relación con la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-HtrA1 que comprenda esa secuencia retiene la capacidad de unirse a HtrA1. En determinados modos de realización, se han sustituido, insertado y/o deleccionado un total de 1 a 10 aminoácidos en la SEQ ID NO: 7, 28 o 30. En determinados modos de realización, las sustituciones, inserciones o deleciones se producen en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). Opcionalmente, el anticuerpo anti-HtrA1 comprende la secuencia de VL en la SEQ ID NO: 7, 28, 30 o 31, que incluye modificaciones postraduccionales de esa secuencia. En un modo de realización particular, el VL comprende una, dos o tres HVR seleccionadas de (a) HVR-L1, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 1, 18, 21, 23 y 33; (b) HVR-L2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y (c) HVR-L3, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 3, 19, 22, 24 y 34-36.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-HtrA1, en el que el anticuerpo comprende un VH como en cualquiera de los modos de realización proporcionados anteriormente y un VL como en cualquiera de los modos de realización proporcionados anteriormente. En un modo de realización, el anticuerpo comprende las secuencias de VH y VL en la SEQ ID NO: 32 y SEQ ID NO: 31, respectivamente, que incluyen modificaciones postraduccionales de esas secuencias. En un modo de realización, el anticuerpo comprende las secuencias de VH y VL en la SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 7, respectivamente, que incluyen modificaciones postraduccionales de esas secuencias. En un modo de realización, el anticuerpo comprende las secuencias de VH y VL en la SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 28, respectivamente, que incluyen modificaciones postraduccionales de esas secuencias. En un modo de realización, el anticuerpo comprende las secuencias de VH y VL en la SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 30, respectivamente, que incluyen modificaciones postraduccionales de esas secuencias.

En otro aspecto, se divulga un anticuerpo que se une al mismo epítipo que un anticuerpo anti-HtrA1 proporcionado en el presente documento. Por ejemplo, en determinados modos de realización, se proporciona un anticuerpo que se une al mismo epítipo que un anticuerpo anti-HtrA1 que comprende una secuencia de VH de SEQ ID NO: 8 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 7. En determinados modos de realización, se proporciona un anticuerpo que se une a un epítipo de HtrA1 que contiene el residuo N224, K248, o ambos, de SEQ ID NO: 13, o residuos equivalentes a los mismos en una secuencia de HtrA1 diferente. En determinados modos de realización, el epítipo de HtrA1 comprende además uno o más de los siguientes residuos V201, T223, K243, K225, E247 y H220 de SEQ ID NO: 13, o aminoácidos equivalentes a los mismos en una secuencia de HtrA1 diferente. En determinados modos de realización, se proporciona un anticuerpo que se une a un epítipo de HtrA1 que contiene uno o más de los residuos N224, K248

y V201 o todos de los anteriores de SEQ ID NO: 13, o residuos equivalentes a los mismos en una secuencia de HtrA1 diferente. En determinados modos de realización, se proporciona un anticuerpo que se une a un epítipo de HtrA1 que contiene uno o más de los residuos N224, K248, V201, T223 y K243 o todos de los anteriores de SEQ ID NO: 13, o residuos equivalentes a los mismos en una secuencia de HtrA1 diferente. En determinados modos de realización, se proporciona un anticuerpo que se une a un epítipo de HtrA1 que contiene uno o más de los residuos N224, K248, V201, T223, K243, K225, E247 y H22A o todos de los anteriores de SEQ ID NO: 13, o residuos equivalentes a los mismos en una secuencia de HtrA1 diferente. En determinados modos de realización, el epítipo es un epítipo lineal. En otros modos de realización, el epítipo es un epítipo conformacional.

En otro aspecto de la invención, un anticuerpo anti-HtrA1 de acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores es un anticuerpo monoclonal, que incluye un anticuerpo quimérico, humanizado o humano. En un modo de realización, un anticuerpo anti-HtrA1 es un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, un fragmento Fv, Fab, Fab', scFv, diacuerpo o F(ab')₂. En otro modo de realización, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa, por ejemplo, un anticuerpo IgG1 inalterado u otra clase o isotipo de anticuerpo como se define en el presente documento.

En determinados modos de realización, un anticuerpo anti-HtrA1 de acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores no es un anticuerpo que tiene una secuencia de VH de SEQ ID NO: 8 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 7.

En otro aspecto, un anticuerpo anti-HtrA1 de acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores puede incorporar cualquiera de las características, individualmente o en combinación, como se describen en las secciones 1-7 a continuación:

1. Afinidad del anticuerpo

En determinados modos de realización, un anticuerpo proporcionado en el presente documento tiene una constante de disociación (K_d) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0,1 \text{ nM}$, $\leq 0,01 \text{ nM}$ o $\leq 0,001 \text{ nM}$ (por ejemplo, 10^{-8} M o menos, por ejemplo, desde 10^{-8} M a 10^{-13} M , por ejemplo, desde 10^{-9} M a 10^{-13} M).

En un modo de realización, se mide la K_d mediante un ensayo de unión a antígeno radiomarcado (RIA) realizado con la versión Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno como se describe mediante el siguiente ensayo. Se mide la afinidad de unión en solución de los Fab por el antígeno equilibrando los Fab con una concentración mínima de antígeno marcado con (¹²⁵I) en presencia de una serie de valoraciones de antígeno no marcado, capturando, entonces, el antígeno unido con una placa recubierta con anticuerpo anti-Fab (véase, por ejemplo, Chen *et al.*, *J. Mol. Biol.* 293:865-881(1999)). Para establecer las condiciones para el ensayo, se recubren placas de múltiples pocillos MICROTITER® (Thermo Scientific) durante la noche con 5 µg/ml de un anticuerpo anti-Fab de captura (Cappel Labs) en carbonato de sodio 50 mM (pH 9,6) y posteriormente se bloquea con seroalbúmina bovina al 2 % (p/v) en PBS durante de dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23 °C). En una placa no adsorbente (Nunc n.º 269620), se mezcla [¹²⁵I]-antígeno 100 pM o 26 pM con diluciones en serie de un Fab de interés (por ejemplo, consistente con la evaluación del anticuerpo anti-VEGF, Fab-12, en Presta *et al.*, *Cancer Res.* 57:4593-4599 (1997)). Entonces, el Fab de interés se incuba durante la noche; sin embargo, la incubación puede continuar durante un periodo más largo (por ejemplo, de aproximadamente 65 horas) para garantizar que se alcanza el equilibrio. A continuación, se transfieren las mezclas a la placa de captura para su incubación a temperatura ambiente (por ejemplo, durante una hora). Entonces, se elimina la solución y la placa se lava ocho veces con polisorbato 20 (TWEEN-20®) al 0,1 % en PBS. Cuando las placas se hayan secado, se añaden 150 µl/pocillo de centelleador (MICROSCINT-20™; Packard) y las placas se cuentan en un contador gamma TOPCOUNT™ (Packard) durante diez minutos. Las concentraciones de cada Fab que dan menos que o igual a un 20 % de unión máxima se eligen para su uso en ensayos de unión competitiva.

De acuerdo con otro modo de realización, se mide la K_d usando ensayos de resonancia de plasmón superficial usando un dispositivo BIACORE®-2000 o uno BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25 °C con matrices CM5 de antígeno inmovilizado a ~10 unidades de respuesta (UR). En resumen, se activan matrices de biosensor de dextrano carboximetilado (CM5, BIACORE, Inc) con clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con acetato de sodio 10 mM, pH 4,8, en 5 µg/ml (~0,2 pM) antes de su inyección a un caudal de 5 µl/minuto para lograr aproximadamente 10 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Después de la inyección del antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos sin reaccionar. Para las mediciones cinéticas, se inyectan diluciones en serie de dos veces de Fab (0,78 nM a 500 nM) en PBS con tensioactivo polisorbato 20 (TWEEN-20™) (PBST) al 0,05 % a 25 °C a un caudal de aproximadamente 25 µl/min. Se calculan las tasas de asociación (k_{on}) y tasas de disociación (k_{off}) usando un simple modelo de unión uno a uno de Langmuir (programa informático de evaluación de BIACORE®, versión 3.2) ajustando simultáneamente los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación en equilibrio (K_d) se calcula como la proporción k_{off}/k_{on}. Véase, por ejemplo, Chen *et al.*, *J. Mol. Biol.* 293:865-881 (1999). Si la tasa de asociación excede 10⁶ M⁻¹s⁻¹ mediante el ensayo de resonancia de plasmón superficial anterior, entonces, se puede determinar la tasa de asociación usando una técnica de extinción fluorescente que mide el incremento o disminución de la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación=295 nm; emisión=340 nm, paso de banda de 16 nm) a 25 °C de un anticuerpo anti-antígeno 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de

antígeno medida en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con detención de flujo (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM-AMINCO™ de la serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada.

2. Fragmentos de anticuerpo

En determinados modos de realización, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es un fragmento de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, los fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv y scFv, y otros fragmentos descritos a continuación. Para obtener una revisión de determinados fragmentos de anticuerpo, véase Hudson *et al.* *Nat. Med.* 9:129-134 (2003). Para obtener una revisión de los fragmentos scFv, véase, por ejemplo, Pluckthun, en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, eds. Rosenberg y Moore, (Springer-Verlag, Nueva York), pp. 269-315 (1994); véase también el documento WO 93/16185; y las patentes de EE. UU. n.ºs 5.571.894 y 5.587.458. Para obtener un análisis de los fragmentos Fab y F(ab')₂ que comprenden residuos de epítomos de unión al receptor de rescate y que tienen una semivida *in vivo* incrementada, véase la patente de EE. UU. n.º 5.869.046.

Los diacuerpos son fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno que pueden ser bivalentes o biespecíficos. Véase, por ejemplo, el documento EP 404,097; el documento WO 1993/01161; Hudson *et al.*, *Nat. Med.* 9:129-134 (2003); y Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993). Los triacuerpos y tetracuerpos también se describen en Hudson *et al.*, *Nat. Med.* 9:129-134 (2003).

Los anticuerpos de único dominio son fragmentos de anticuerpo que comprenden todo o una porción del dominio variable de la cadena pesada o todo o una porción del dominio variable de la cadena ligera de un anticuerpo. En determinados modos de realización, un anticuerpo de único dominio es un anticuerpo de único dominio humano (Domantis, Inc., Waltham, MA; véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 6.248.516 B1).

Se pueden preparar fragmentos de anticuerpo mediante diversas técnicas que incluyen, pero no se limitan a, digestión proteolítica de un anticuerpo inalterado, así como la producción mediante células huésped recombinantes (por ejemplo, *E. coli* o fago), como se describe en el presente documento.

3. Anticuerpos quiméricos y humanizados

En determinados modos de realización, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es un anticuerpo quimérico. Se describen determinados anticuerpos quiméricos, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 4.816.567; y Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)). En un ejemplo, un anticuerpo quimérico comprende una región variable no humana (por ejemplo, una región variable derivada de un ratón, rata, hámster, conejo o primate no humano, tal como un mono) y una región constante humana. En otro ejemplo, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo de "clase cambiada" en el que se ha cambiado la clase o subclase de la del anticuerpo original. Los anticuerpos quiméricos incluyen fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

En determinados modos de realización, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo humanizado. Típicamente, se humaniza un anticuerpo no humano para reducir la inmunogenia en los seres humanos, al mismo tiempo que se retienen la especificidad y afinidad del anticuerpo no humano original. En general, un anticuerpo humanizado comprende uno o más dominios variables en los que las HVR, por ejemplo, las CDR (o porciones de las mismas), derivan de un anticuerpo no humano y las FR (o porciones de las mismas) derivan de secuencias de anticuerpos humanos. Un anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una porción de una región constante humana. En algunos modos de realización, se sustituyen algunos residuos de FR en un anticuerpo humanizado con los residuos correspondientes de un anticuerpo no humano (por ejemplo, el anticuerpo del que derivan los residuos de HVR), por ejemplo, para restablecer o mejorar la especificidad o afinidad del anticuerpo.

Los anticuerpos humanizados y los procedimientos de preparación de los mismos se revisan, por ejemplo, en Almagro y Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008), y se describen además, por ejemplo, en Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-329 (1988); Queen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:10029-10033 (1989); las patentes de EE. UU. n.ºs 5.821.337, 7.527.791, 6.982.321 y 7.087.409; Kashmiri *et al.*, *Methods* 36:25-34 (2005) (que describe el injerto de SDR (a-CDR)); Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489-498 (1991) (que describe el "revestimiento"); Dall'Acqua *et al.*, *Methods* 36:43-60 (2005) (que describe el "reordenamiento de FR"); y Osbourn *et al.*, *Methods* 36:61-68 (2005) y Klimka *et al.*, *Br. J. Cancer*, 83:252-260 (2000) (que describen el enfoque de "selección guiada" con respecto al reordenamiento de FR).

Las regiones estructurales humanas que se pueden usar para la humanización incluyen, pero no se limitan a: regiones estructurales seleccionadas usando el procedimiento de "mejor ajuste" (véase, por ejemplo, Sims *et al.* *J. Immunol.* 151:2296 (1993)); regiones estructurales derivadas de la secuencia consenso de anticuerpos humanos de un subgrupo particular de las regiones variables de la cadena ligera o pesada (véase, por ejemplo, Carter *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); y Presta *et al.* *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)); regiones estructurales (mutadas de manera somática) maduras humanas o regiones estructurales de la estirpe germinal humana (véase, por ejemplo, Almagro y Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)); y regiones estructurales derivadas del cribado de colecciones de FR (véase, por ejemplo, Baca *et al.*, *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 (1997) y Rosok *et al.*, *J. Biol. Chem.* 271:22611-

22618 (1996)).

4. Anticuerpos humanos

En determinados modos de realización, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es un anticuerpo humano. Se pueden producir anticuerpos humanos usando diversas técnicas conocidas en la técnica. Los anticuerpos humanos se describen, en general, en van Dijk y van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5: 368-74 (2001) y Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459 (2008).

Se pueden preparar anticuerpos humanos administrando un inmunógeno a un animal transgénico que se ha modificado para producir anticuerpos humanos inalterados o anticuerpos inalterados con regiones variables humanas en respuesta a la exposición a antígeno. Dichos animales típicamente contienen todos o una porción de los locus de inmunoglobulina humana, que remplazan a los locus de inmunoglobulina endógena, o que están presentes de manera extracromosómica o integrados aleatoriamente en los cromosomas del animal. En dichos ratones transgénicos, los locus de inmunoglobulina endógena, en general, se han inactivado. Para obtener una revisión de los procedimientos para obtener anticuerpos humanos a partir de animales transgénicos, véase Lonberg, *Nat. Biotech.* 23:1117-1125 (2005). Véase también, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.ºs 6.075.181 y 6.150.584 que describen la tecnología XENOMOUSE™; la patente de EE. UU. n.º 5.770.429 que describe la tecnología HuMAB®; la patente de EE. UU. n.º 7.041.870 que describe la tecnología K-M MOUSE® y la publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º US 2007/0061900, que describe la tecnología VelociMouse®). Las regiones variables humanas de anticuerpos inalterados generados por dichos animales se pueden modificar adicionalmente, por ejemplo, mediante combinación con una región constante humana diferente.

También se pueden preparar anticuerpos humanos mediante procedimientos basados en hibridoma. Se han descrito líneas de células de mieloma humano y de heteromieloma humano-murino para la producción de anticuerpos monoclonales humanos. (Véase, por ejemplo, Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987); y Boemer *et al.*, *J. Immunol.*, 147: 86 (1991)). Los anticuerpos humanos generados por medio de tecnología de hibridoma de linfocitos B humanos también se describen en Li *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006). Los procedimientos adicionales incluyen aquellos descritos, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 7.189.826 (que describe la producción de anticuerpos IgM humanos monoclonales a partir de líneas de células de hibridoma) y Ni, *Xiandai Mianyixue*, 26(4):265-268 (2006) (que describe hibridomas humanos-humanos). La tecnología de hibridoma humano (tecnología de trioma) también se describe en Vollmers y Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005) y Vollmers y Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3): 185-91 (2005).

También se pueden generar anticuerpos humanos aislando secuencias de dominio variable del clon Fv seleccionadas de colecciones de presentación en fagos derivadas de seres humanos. Entonces, se pueden combinar dichas secuencias de dominio variable con un dominio constante humano deseado. Las técnicas para seleccionar anticuerpos humanos a partir de colecciones de anticuerpos se describen a continuación.

5. Anticuerpos derivados de colecciones

Se pueden aislar los anticuerpos de la invención cribando colecciones combinatorias para determinar los anticuerpos con la actividad o las actividades deseada(s). Por ejemplo, se conoce una variedad de procedimientos en la técnica para generar colecciones de presentación en fagos y cribar dichas colecciones para determinar los anticuerpos que poseen las características de unión deseadas. Dichos procedimientos se revisan, por ejemplo, en Hoogenboom *et al.* en *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien *et al.*, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) y se describen además, por ejemplo, en McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-554; Clackson *et al.*, *Nature* 352: 624-628 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Marks y Bradbury, en *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu *et al.*, *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee *et al.*, *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); y Lee *et al.*, *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132 (2004).

En determinados procedimientos de presentación en fagos, los repertorios de genes de VH y VL se clonan por separado mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se recombinan aleatoriamente en colecciones de fagos, que, entonces, se pueden cribar para determinar el fago de unión a antígeno como se describe en Winter *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Los fagos típicamente presentan fragmentos de anticuerpo, como fragmentos Fv monocatenarios (scFv) o bien como fragmentos Fab. Las colecciones de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de afinidad alta con respecto al inmunógeno sin el requerimiento de construcción de hibridomas. De forma alternativa, se puede clonar el repertorio sin exposición previa (por ejemplo, de un ser humano) para proporcionar una única fuente de anticuerpos para una amplia gama de antígenos propios y también no propios sin ninguna inmunización como se describe por Griffiths *et al.*, *EMBO J.*, 12: 725-734 (1993). Finalmente, también se pueden preparar de manera sintética colecciones sin exposición previa clonando segmentos génicos V no reordenados a partir de células madre y usando cebadores de PCR que contienen secuencias aleatorias para codificar las regiones CDR3 altamente variables y conseguir el reordenamiento *in vitro*, como se describe por Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992). Las publicaciones de patente que describen colecciones de fagos de anticuerpos humanos

incluyen, por ejemplo: la patente de EE. UU. n.º 5.750.373 y las publicaciones de patente de EE. UU. n.ºs 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936 y 2009/0002360.

- 5 Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo aislados de colecciones de anticuerpos humanos se consideran anticuerpos humanos o fragmentos de anticuerpo humanos en el presente documento.

6. Anticuerpos multiespecíficos

- 10 En determinados modos de realización, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es un anticuerpo multiespecífico, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos multiespecíficos son anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión por al menos dos sitios diferentes. En determinados modos de realización, una de las especificidades de unión es para HtrA1 y la otra es para cualquier otro antígeno. En determinados modos de realización, los anticuerpos biespecíficos se pueden unir a dos epítopos diferentes de HtrA1.
- 15 También se pueden usar anticuerpos biespecíficos para localizar agentes citotóxicos con respecto a las células que expresen HtrA1. Se pueden preparar anticuerpos biespecíficos como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo.

- 20 Las técnicas para preparar anticuerpos multiespecíficos incluyen, pero no se limitan a, la coexpresión recombinante de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina que tengan especificidades diferentes (véase Milstein y Cuello, *Nature* 305: 537 (1983)), el documento WO 93/08829 y Traunecker *et al.*, *EMBO J.* 10: 3655 (1991)) y la genomodificación "botón en ojal" (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.731.168). También se pueden preparar anticuerpos multiespecíficos genomodificando los efectos de conducción electrostática para preparar moléculas heterodiméricas de Fc de anticuerpo (documento WO 2009/089004); reticulando dos o más anticuerpos o
- 25 fragmentos (véanse, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 4.676.980 y Brennan *et al.*, *Science*, 229: 81 (1985)); usando cremalleras de leucinas para producir anticuerpos biespecíficos (véase, por ejemplo, Kostelny *et al.*, *J. Immunol.*, 148(5): 1547-1553 (1992)); usando la tecnología de "diacuerpos" para preparar fragmentos de anticuerpo biespecífico (véase, por ejemplo, Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)); y usando dímeros de Fv monocatenarios (sFv) (véase, por ejemplo, Gruber *et al.*, *J. Immunol.*, 152:5368 (1994)); y preparando anticuerpos trispecíficos como se describe, por ejemplo, en Tutt *et al. J. Immunol.* 147: 60 (1991).

También se incluyen en el presente documento anticuerpos genomodificados con tres o más sitios de unión a antígeno funcionales, incluyendo los "anticuerpos pulpo" (véase, por ejemplo, el documento US 2006/0025576A1).

- 35 El anticuerpo o fragmento en el presente documento también incluye un "Fab de doble acción" o "DAF" que comprende un sitio de unión a antígeno que se une al HtrA1, así como otro antígeno diferente (véase, el documento US 2008/0069820, por ejemplo).

7. Variantes de anticuerpo

- 40 En determinados modos de realización, se contemplan variantes de secuencia de aminoácidos de los anticuerpos proporcionados en el presente documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de secuencia de aminoácidos de un anticuerpo se pueden preparar introduciendo modificaciones apropiadas en la secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo o mediante síntesis de péptidos. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones de y/o inserciones en y/o sustituciones de residuos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Se puede realizar cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas, por ejemplo, unión a antígeno.

50 a) Variantes de sustitución, inserción y deleción

- En determinados modos de realización, se proporcionan variantes de anticuerpo que tienen una o más sustituciones de aminoácidos. Los sitios de interés para la mutagénesis de sustitución incluyen las HVR y las FR. En la tabla 1 se muestran sustituciones conservadoras bajo el encabezado "sustituciones conservadoras". Se proporcionan cambios más sustanciales en la tabla 1 bajo el encabezamiento de "sustituciones ejemplares" y como se describe además a continuación en referencia a las clases de cadena lateral de los aminoácidos. Se pueden introducir sustituciones de aminoácidos en un anticuerpo de interés y cribar los productos para determinar una actividad deseada, por ejemplo, unión a antígeno retenida/mejorada, inmunogenia disminuida, o ADCC o CDC mejorada.

TABLA 1

Residuo original	Sustituciones ejemplares	Sustituciones preferentes
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys

Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

Los aminoácidos se pueden agrupar de acuerdo con las propiedades comunes de cadena lateral:

(1) hidrófobos: norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

(3) ácidos: Asp, Glu;

(4) básicos: His, Lys, Arg;

(5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;

(6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservadoras supondrán el intercambiar un miembro de una de estas clases por otra clase.

Un tipo de variante de sustitución implica sustituir uno o más residuos de la región hipervariable de un anticuerpo original (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). En general, la(s) variante(s) resultante(s) seleccionada(s) para su estudio adicional tendrán modificaciones (por ejemplo, mejoras) en determinadas propiedades biológicas (por ejemplo, afinidad incrementada, inmunogenia reducida) en relación con el anticuerpo original y/o habrán retenido sustancialmente determinadas propiedades biológicas del anticuerpo original. Una variante de sustitución ejemplar es un anticuerpo con maduración de la afinidad, que se puede generar convenientemente, por ejemplo, usando técnicas de maduración de la afinidad basadas en presentación en fagos, tales como las descritas en el presente documento. En resumen, se mutan uno o más residuos de HVR y los anticuerpos variantes se presentan en fagos y se criban para determinar una actividad biológica particular (por ejemplo, la afinidad de unión).

Se pueden realizar alteraciones (por ejemplo, sustituciones) en las HVR, por ejemplo, para mejorar la afinidad del anticuerpo. Se pueden realizar dichas alteraciones en "puntos calientes" de la HVR, es decir, residuos codificados por codones que se someten a una mutación con alta frecuencia durante el proceso de maduración somática (véase, por ejemplo, Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)), y/o en los SDR (las a-CDR), sometiendo a prueba el VH o VL variante resultante para determinar su afinidad de unión. La maduración de la afinidad construyendo y seleccionando de nuevo a partir de colecciones secundarias se ha descrito, por ejemplo, en Hoogenboom *et al.* en *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien *et al.*, ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001)). En algunos modos de realización de la maduración de la afinidad, se introduce la diversidad en los genes variables elegidos para su maduración mediante cualquiera de una variedad de procedimientos (por ejemplo, PCR propensa a error,

reordenamiento de cadenas o mutagénesis dirigida por oligonucleótidos). Entonces, se crea una segunda colección. Entonces, se criba la colección para identificar cualquier variante de anticuerpo con la afinidad deseada. Otro procedimiento para introducir diversidad implica enfoques dirigidos a HVR, en los que se aleatorizan varios residuos de HVR (por ejemplo, 4-6 residuos a la vez). Se pueden identificar específicamente los residuos de HVR implicados en la unión a antígeno, por ejemplo, usando modelado o mutagénesis por barrido de alanina. A menudo se seleccionan como dianas en particular CDR-H3 y CDR-L3.

En determinados modos de realización, se pueden producir sustituciones, inserciones o delecciones en una o más HVR, siempre que dichas alteraciones no reduzcan sustancialmente la capacidad del anticuerpo de unirse al antígeno. Por ejemplo, se pueden realizar alteraciones conservadoras (por ejemplo, sustituciones conservadoras como se proporciona en el presente documento) que no reduzcan sustancialmente la afinidad de unión en las HVR. Dichas alteraciones pueden estar fuera de los "puntos calientes" de la HVR o de los SDR. En determinados modos de realización de las secuencias de VH y VL variantes proporcionadas anteriormente, cada HVR está inalterada o bien no contiene más de una, dos o tres sustituciones de aminoácidos.

Un procedimiento útil para la identificación de residuos o regiones de un anticuerpo que se pueden seleccionar como dianas para la mutagénesis se llama "mutagénesis por barrido de alanina" como se describe por Cunningham y Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085. En este procedimiento, se identifica un residuo o grupo de residuos diana (por ejemplo, residuos cargados, tales como arg, asp, his, lys y glu) y se rempazan por un aminoácido neutro o cargado negativamente (por ejemplo, alanina o polialanina) para determinar si la interacción del anticuerpo con el antígeno se ve afectada. Se pueden introducir otras sustituciones en las localizaciones de aminoácidos que demuestren sensibilidad funcional a las sustituciones iniciales. De forma alternativa, o adicionalmente, una estructura cristalina de un complejo antígeno-anticuerpo para identificar los puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos residuos de contacto y residuos adyacentes se pueden seleccionar como diana o eliminar como candidatos para la sustitución. Las variantes se pueden cribar para determinar si contienen las propiedades deseadas.

Las inserciones en la secuencia de aminoácidos incluyen fusiones amino y/o carboxiterminales que varían en longitud desde un residuo a polipéptidos que contienen cien residuos o más, así como inserciones intrasecuenciales de residuos de aminoácido únicos o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un residuo de metionilo N terminal. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión al extremo N o C del anticuerpo a una enzima (por ejemplo, para ADEPT) o un polipéptido que incrementa la semivida en suero del anticuerpo.

b) Variantes de glucosilación

En determinados modos de realización, se altera un anticuerpo proporcionado en el presente documento para incrementar o disminuir el grado en el que el anticuerpo se glucosila. La adición o delección de sitios de glucosilación a un anticuerpo se puede conseguir convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de tal manera que se cree o elimine uno o más sitios de glucosilación.

Cuando el anticuerpo comprende una región Fc, se puede alterar el hidrato de carbono fijado a la misma. Los anticuerpos naturales producidos por células de mamífero típicamente comprenden un oligosacárido biantenarico ramificado que se fija, en general, mediante un enlace de N a Asn297 del dominio CH2 de la región Fc. Véase, por ejemplo, Wright *et al.* *TIBTECH* 15:26-32 (1997). El oligosacárido puede incluir diversos hidratos de carbono, por ejemplo, manosa, N-acetilglucosamina (GlcNAc), galactosa y ácido siálico, así como una fucosa fijada a una GlcNAc en el "tallo" de la estructura de oligosacárido biantenarico. En algunos modos de realización, se pueden realizar modificaciones del oligosacárido en un anticuerpo de la invención a fin de crear variantes de anticuerpo con determinadas propiedades mejoradas.

En un modo de realización, se proporcionan variantes de anticuerpo que tienen una estructura glucídica que carece de fucosa fijada (directa o indirectamente) a una región Fc. Por ejemplo, la cantidad de fucosa en dicho anticuerpo puede ser desde un 1 % a un 80 %, desde un 1 % a un 65 %, desde un 5 % a un 65 % o desde un 20 % a un 40 %. La cantidad de fucosa se determina calculando la cantidad promedio de fucosa dentro de la cadena glucídica en Asn297, en relación con la suma de todas las glucoestructuras fijadas a Asn297 (por ejemplo, estructuras complejas, híbridas y de alto contenido en manosa) como se mide mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, como se describe, por ejemplo, en el documento WO 2008/077546. Asn297 se refiere al residuo de asparagina localizado en aproximadamente la posición 297 en la región Fc (numeración EU de los residuos de la región Fc); sin embargo, también se puede localizar Asn297 aproximadamente ± 3 aminoácidos en dirección 5' o en dirección 3' de la posición 297, es decir, entre las posiciones 294 y 300, debido a variaciones de secuencia insignificantes en los anticuerpos. Dichas variantes de fucosilación pueden tener una función ADCC mejorada. Véase, por ejemplo, la publicación de patente de EE. UU. n.ºs US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Los ejemplos de publicaciones relacionadas con variantes de anticuerpo "desfucosilado" o "deficitario en fucosa" incluyen: los documentos US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki *et al.* *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki *et al.* *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004). Los ejemplos de líneas de células que

pueden producir anticuerpos defucosilados incluyen células CHO Lec13 deficitarias en fucosilación de proteínas (Ripka *et al. Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); solicitud de pat. de EE. UU. n.º US 2003/0157108 A1, Presta, L; y el documento WO 2004/056312 A1, Adams *et al.*, especialmente en el ejemplo 11) y líneas de células con genes inactivados, tales como células CHO con genes inactivados, como el gen alfa-1,6-fucosiltransferasa, *FUT8* (véase, por ejemplo, Yamane-Ohnuki *et al. Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004); Kanda, Y. *et al., Biotechnol. Bioeng.*, 94(4):680-688 (2006); y el documento WO2003/085107).

Se pueden proporcionar además variantes de anticuerpo con oligosacáridos bisecados, por ejemplo, en las que un oligosacárido biantenarío fijado a la región Fc del anticuerpo se biseca mediante GlcNAc. Dichas variantes de anticuerpo pueden tener una fucosilación reducida y/o función ADCC mejorada. Los ejemplos de dichas variantes de anticuerpo se describen, por ejemplo, en el documento WO 2003/011878 (Jean-Mairet *et al.*); la patente de EE. UU. n.º 6.602.684 (Umana *et al.*); y el documento US 2005/0123546 (Umana *et al.*). También se proporcionan variantes de anticuerpo con al menos un residuo de galactosa en el oligosacárido fijado a la región Fc. Dichas variantes de anticuerpo pueden tener una función CDC mejorada. Dichas variantes de anticuerpo se describen, por ejemplo, en el documento WO 1997/30087 (Patel *et al.*); el documento WO 1998/58964 (Raju, S.); y el documento WO 1999/22764 (Raju, S.).

c) Variantes de la región Fc

En determinados modos de realización, se pueden introducir una o más modificaciones de aminoácidos en la región Fc de un anticuerpo proporcionado en el presente documento, generando de este modo una variante de la región Fc. La variante de la región Fc puede comprender una secuencia de la región Fc humana (por ejemplo, una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprende una modificación de aminoácidos (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones de aminoácido.

En determinados modos de realización, la invención contempla una variante de anticuerpo que posee algunas, pero no todas, las funciones efectoras, que le convierten en un candidato deseable para aplicaciones en las que la semivida del anticuerpo *in vivo* es importante, aun así, determinadas funciones efectoras (tales como el complemento y la ADCC) son innecesarias o perjudiciales. Se pueden realizar ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* para confirmar la reducción/disminución de las actividades CDC y/o ADCC. Por ejemplo, se pueden realizar ensayos de unión al receptor Fc (FcR) para garantizar que el anticuerpo carezca de unión a FcγR (de ahí que sea probable que carezca de actividad ADCC), pero retenga su capacidad de unión a FcRn. Las células primarias para mediar en la ADCC, los linfocitos NK, solo expresan FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991). Los ejemplos no limitantes de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés se describen en la patente de EE. UU. n.º 5.500.362 (véase, por ejemplo, Hellstrom, I. *et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83:7059-7063 (1986)) y Hellstrom, I. *et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:1499-1502 (1985); el documento 5.821.337 (véase Bruggemann, M. *et al., J. Exp. Med.* 166:1351-1361 (1987)). De forma alternativa, se pueden emplear procedimientos de ensayo no radiactivo (véase, por ejemplo, el ensayo de citotoxicidad no radiactivo ACT1™ para citometría de flujo (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA; y el ensayo de citotoxicidad no radiactivo CytoTox 96® (Promega, Madison, WI). Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos naturales (NK). De forma alternativa, o adicionalmente, se puede evaluar *in vivo* la actividad ADCC de la molécula de interés, por ejemplo, en un modelo animal tal como el divulgado en Clynes *et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95:652-656 (1998). También se pueden llevar a cabo ensayos de unión a C1q para confirmar que el anticuerpo no se puede unir a C1q y, de ahí que carezca de actividad CDC. Véase, por ejemplo, ELISA de unión a C1q y C3c en los documentos WO 2006/029879 y WO 2005/100402. Para evaluar la activación del complemento, se puede realizar un ensayo de CDC (véanse, por ejemplo, Gazzano-Santoro *et al., J. Immunol. Methods* 202:163 (1996); Cragg, M.S. *et al., Blood* 101:1045-1052 (2003); y Cragg, M.S. y M.J. Glennie, *Blood* 103:2738-2743 (2004)). También se pueden realizar la unión al FcRn y las determinaciones del aclaramiento/semivida *in vivo* usando procedimientos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Petkova, S.B. *et al., Int'l. Immunol.* 18(12):1759-1769 (2006)).

Los anticuerpos con función efectora reducida incluyen aquellos con sustitución de uno o más de los residuos de la región Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 (patente de EE. UU. n.º 6.737.056). Dichos mutantes de Fc incluyen mutantes de Fc con sustituciones en dos o más de las posiciones de aminoácido 265, 269, 270, 297 y 327, incluyendo el llamado mutante de Fc "DANA" con la sustitución de los residuos 265 y 297 a alanina (patente de EE. UU. n.º 7.332.581).

Se describen determinadas variantes de anticuerpo con unión mejorada o disminuida a los FcR. (Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 6.737.056; el documento WO 2004/056312 y Shields *et al., J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001)).

En determinados modos de realización, una variante de anticuerpo comprende una región Fc con una o más sustituciones de aminoácidos que mejoran la ADCC, por ejemplo, sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región Fc (numeración EU de residuos).

En algunos modos de realización, las alteraciones se hacen en la región Fc, que dan como resultado una unión a C1q y/o una citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) alteradas (es decir, mejoradas o disminuidas), por ejemplo, como se describe en la patente de EE. UU. n.º 6.194.551, el documento WO 99/51642 y Idusogie *et al.* *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

En el documento US 2005/0014934 (Hinton *et al.*) se describen anticuerpos con semividas incrementadas y unión mejorada al receptor Fc neonatal (FcRn), que es responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto (Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117:587 (1976) y Kim *et al.*, *J. Immunol.* 24:249 (1994)). Esos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en la misma que mejoran la unión de la región Fc al FcRn. Dichas variantes de Fc incluyen aquellas con sustituciones en uno o más residuos de la región Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 o 434, por ejemplo, sustitución del residuo 434 de la región Fc (patente de EE. UU. n.º 7.371.826).

Véase también Duncan & Winter, *Nature* 322:738-40 (1988); la patente de EE. UU. n.º 5.648.260; la patente de EE. UU. n.º 5.624.821; y el documento WO 94/29351 con respecto a otros ejemplos de variantes de la región Fc.

d) Variantes de anticuerpo genomodificado con cisteína

En determinados modos de realización, puede ser deseable crear anticuerpos genomodificados con cisteína, por ejemplo, "thioMAb", en los que uno o más residuos de un anticuerpo se sustituyen con residuos de cisteína. En modos de realización particulares, los residuos sustituidos se producen en sitios accesibles del anticuerpo. Sustituyendo esos residuos con cisteína, los grupos tiol reactivos se posicionan de este modo en sitios accesibles del anticuerpo y se pueden usar para conjugar el anticuerpo a otros restos, tales como restos de fármaco o restos de conector-fármaco, para crear un inmunoconjugado, como se describe adicionalmente en el presente documento. En determinados modos de realización, se puede sustituir uno cualquiera o más de los siguientes residuos con cisteína: V205 (numeración de Kabat) de la cadena ligera; A118 (numeración EU) de la cadena pesada; y S400 (numeración EU) de la región Fc de la cadena pesada. Se pueden generar anticuerpos genomodificados con cisteína como se describe, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 7.521.541.

e) Derivados de anticuerpo

En determinados modos de realización, un anticuerpo proporcionado en el presente documento se puede modificar adicionalmente para que contenga restos no proteicos adicionales que se conocen en la técnica y están fácilmente disponibles. Los restos adecuados para la derivatización del anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, polímeros solubles en agua. Los ejemplos no limitantes de polímeros solubles en agua incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (homopolímeros o bien copolímeros aleatorios) y dextrano o poli(n-vinilpirrolidona)/polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de poli(óxido de propileno)/óxido de etileno, polioles polioxiethylados (por ejemplo, glicerol), poli(alcohol vinílico) y mezclas de los mismos. El propionaldehído de polietilenglicol puede tener ventajas en su fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede ser de cualquier peso molecular, y puede estar ramificado o no ramificado. El número de polímeros fijados al anticuerpo puede variar, y si se fija más de un polímero, pueden ser moléculas iguales o diferentes. En general, se puede determinar el número y/o tipo de polímeros usados para la derivatización basándose en consideraciones, que incluyen, pero no se limitan a, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo que se va a mejorar, independientemente de si el derivado de anticuerpo se usará en un tratamiento en condiciones definidas, etc.

En otro modo de realización, se proporcionan conjugados de un anticuerpo y un resto no proteico que se pueden calentar de forma selectiva mediante exposición a la radiación. En un modo de realización, el resto no proteico es un nanotubo de carbono (Kam *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 11600-11605 (2005)). La radiación puede ser de cualquier longitud de onda e incluye, pero no se limita a, las longitudes de onda que no dañan a las células normales, pero que calientan el resto no proteico a una temperatura en la que se destruyen las células proximales al anticuerpo-resto no proteico.

B. Procedimientos y composiciones recombinantes

Se pueden producir anticuerpos usando procedimientos y composiciones recombinantes, por ejemplo, como se describe en la patente de EE. UU. n.º 4.816.567. En un modo de realización, se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo anti-HtrA1 descrito en el presente documento. Dicho ácido nucleico puede codificar una secuencia de aminoácidos que comprende el VL y/o una secuencia de aminoácidos que comprende el VH del anticuerpo (por ejemplo, las cadenas ligera y/o pesada del anticuerpo). En otro modo de realización, se proporcionan uno o más vectores (por ejemplo, vectores de expresión) que comprenden dicho ácido nucleico. En otro modo de realización, se proporciona una célula huésped que comprende dicho ácido nucleico. En uno de dichos modos de realización, una célula huésped comprende (por ejemplo, se ha transformado con): (1) un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende el VL del anticuerpo y una secuencia de aminoácidos que comprende el VH del anticuerpo, o (2) un primer vector que comprende un ácido nucleico que codifica

una secuencia de aminoácidos que comprende el VL del anticuerpo y un segundo vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende el VH del anticuerpo. En un modo de realización, la célula huésped es eucariota, por ejemplo, una célula de ovario de hámster chino (CHO) o una célula linfocítica (por ejemplo, célula Y0, NS0, Sp20). En un modo de realización, se proporciona un procedimiento de preparación de un anticuerpo anti-HtrA1, en el que el procedimiento comprende cultivar una célula huésped que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo, como se proporciona anteriormente, en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo y, opcionalmente, recuperar el anticuerpo de la célula huésped (o medio de cultivo de células huésped).

Para la producción recombinante de un anticuerpo anti-HtrA1, el ácido nucleico que codifica un anticuerpo, por ejemplo, como se describe anteriormente, se aísla e inserta en uno o más vectores para su clonación y/o expresión adicional en una célula huésped. Dicho ácido nucleico se puede aislar y secuenciar fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos, que se pueden unir específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo).

Las células huésped adecuadas para la clonación o la expresión de vectores que codifican el anticuerpo incluyen las células procariotas o eucariotas descritas en el presente documento. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden producir en bacterias, en particular, cuando no se necesitan glucosilación ni la función efectora de Fc. Para la expresión de los fragmentos de anticuerpo y polipéptidos en bacterias, véase, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.ºs 5.648.237, 5.789.199 y 5.840.523. (Véase también Charlton, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254, que describe la expresión de fragmentos de anticuerpo en *E. coli*). Después de la expresión, el anticuerpo se puede aislar de la pasta de células bacterianas en una fracción soluble y se puede purificar adicionalmente.

Además de los procariotas, los microbios eucariotas, tales como los hongos filamentosos o levaduras, son huéspedes de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican anticuerpos, incluyendo cepas de hongos y levaduras en las que sus vías de glucosilación se han "humanizado", dando como resultado la producción de un anticuerpo con un patrón de glucosilación parcial o completamente humano. Véanse Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004) y Li *et al.*, *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006).

Las células huésped adecuadas para la expresión del anticuerpo glucosilado también derivan de organismos multicelulares (invertebrados y vertebrados). Los ejemplos de células de invertebrado incluyen células vegetales y de insectos. Se han identificado numerosas cepas de baculovirus, que se pueden usar en conjunto con células de insecto, en particular, para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

También se pueden utilizar cultivos de células vegetales como huéspedes. Véase, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.ºs 5.959.177, 6.040.498, 6.420.548, 7.125.978 y 6.417.429 (que describen la tecnología PLANTIBODIES™ para producir anticuerpos en vegetales transgénicos).

También se pueden usar células de vertebrado como huéspedes. Por ejemplo, pueden ser útiles líneas de células de mamífero que se adapten para crecer en suspensión. Otros ejemplos de líneas de células huésped de mamífero útiles son la línea de riñón de mono CV1 transformada por SV40 (COS-7); la línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293 como se describe, por ejemplo, en Graham *et al.*, *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); células de riñón de cría de hámster (BHK); células de Sertoli de ratón (células TM4, como se describe, por ejemplo, en Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1); células de riñón de mono verde africano (VERO-76); células de carcinoma de cuello uterino humanas (HELA); células de riñón canino (MDCK); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A); células de pulmón humanas (W138); células de hígado humanas (Hep G2); tumor de mama de ratón (MMT 060562); células TRI, como se describe, por ejemplo, en Mather *et al.*, *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982); células MRC 5; y células FS4. Otras líneas de células huésped de mamífero útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), incluyendo células CHO DHFR⁻ (Urlaub *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); y líneas de células de mieloma, tales como Y0, NS0 y Sp2/0. Para obtener una revisión de determinadas líneas de células huésped de mamífero adecuadas para la producción de anticuerpos, véase, por ejemplo, Yazaki y Wu, *Methods in Molecular Biology*, vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003).

C. Ensayos

Los anticuerpos anti-HtrA1 proporcionados en el presente documento se pueden identificar, cribar o caracterizar para determinar sus propiedades físicas/químicas y/o sus actividades biológicas mediante diversos ensayos conocidos en la técnica.

1. Ensayos de unión y otros ensayos

En un aspecto, un anticuerpo de la invención se somete a prueba para determinar su actividad de unión a antígeno, por ejemplo, mediante procedimientos conocidos, tales como ELISA, inmunoelectrotransferencia, etc.

En otro aspecto, se pueden usar ensayos de competición para identificar un anticuerpo que compite con Fab94 o IgG94 por su unión a HtrA1. En determinados modos de realización, dicho anticuerpo competidor se une al mismo

epítipo (por ejemplo, un epítipo lineal o uno conformacional) que se une mediante Fab94 o IgG94. Se proporcionan procedimientos ejemplares detallados para cartografiar un epítipo al que se une un anticuerpo en Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols," en *Methods in Molecular Biology* vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ).

En un ensayo de competición ejemplar, se incuba HtrA1 inmovilizada en una solución que comprende un primer anticuerpo marcado que se une a HtrA1 (por ejemplo, Fab94 o IgG94) y un segundo anticuerpo no marcado que se somete a prueba para determinar su capacidad de competir con el primer anticuerpo por su unión a HtrA1. El segundo anticuerpo puede estar presente en un sobrenadante de hibridoma. Como control, se incuba HtrA1 inmovilizada en una solución que comprende el primer anticuerpo marcado, pero no el segundo anticuerpo no marcado. Después de la incubación, en condiciones que permitan la unión del primer anticuerpo a HtrA1, se elimina el anticuerpo no unido en exceso y se mide la cantidad de marcador asociado a HtrA1 inmovilizada. Si se reduce sustancialmente la cantidad de marcador asociado a HtrA1 inmovilizada en la muestra de prueba en relación con la muestra de control, entonces eso indica que el segundo anticuerpo está compitiendo con el primer anticuerpo por su unión a HtrA1. Véase Harlow y Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

2. Ensayos de actividad

En un aspecto, se proporcionan ensayos para identificar anticuerpos anti-HtrA1 que tengan actividad biológica. La actividad biológica puede incluir, por ejemplo, bloquear, antagonizar, suprimir, interferir, modular y/o reducir una o más actividades biológicas de HtrA1. También se proporcionan anticuerpos que tienen dicha actividad biológica *in vivo* y/o *in vitro*.

En determinados modos de realización, un anticuerpo de la invención se somete a prueba para determinar dicha actividad biológica. En determinados modos de realización, un anticuerpo anti-HtrA1 se une a HtrA1 y reduce o inhibe su actividad serina proteasa para uno o más sustratos para HtrA1, incluyendo, por ejemplo, los sustratos de péptido H2-Opt, β -caseína o BODIPY FL-caseína como se describe en los ejemplos a continuación o cualquier otro sustrato para HtrA1 adecuado. En determinados modos de realización, un anticuerpo anti-HtrA1 inhibe la actividad serina proteasa de HtrA1 con una IC_{50} de menos de 50 nM, 30 nM, 25 nM, 20 nM, 15 nM, 10 nM, 5 nM, 3 nM, 2,5 nM, 2 nM, 1 nM o menos para uno o más sustratos para HtrA1. En determinados modos de realización, un anticuerpo anti-HtrA1 protege a las células fotorreceptoras de su degradación, protege al grosor de la capa nuclear externa o protege a la actividad funcional del electroretinograma en un modelo de enfermedad ocular, tal como el modelo murino con exposición a la luz constante descrito en los ejemplos a continuación.

D. Inmunoconjugados

La invención también proporciona inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo anti-HtrA1 en el presente documento conjugado a uno o más agentes citotóxicos, tales como agentes o fármacos quimioterápicos, agentes inhibidores del crecimiento, toxinas (por ejemplo, toxinas proteicas, toxinas activas enzimáticamente de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal o fragmentos de las mismas) o isótopos radiactivos.

En un modo de realización, un inmunoconjugado es un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) en el que un anticuerpo se conjuga a uno o más fármacos, que incluyen, pero no se limitan a, un maitansinoide (véanse las patentes de EE. UU. n.ºs 5.208.020, 5.416.064 y la patente europea EP 0 425 235 B1); una auristatina, tal como los restos del fármaco monometilauristatina DE y DF (MMAE y MMAF) (véanse las patentes de EE. UU. n.ºs 5.635.483 y 5.780.588 y 7.498.298.); una dolastatina; una caliqueamicina o derivado de la misma (véanse las patentes de EE. UU. n.ºs 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001 y 5.877.296; Hinman *et al.*, *Cancer Res.* 53:3336-3342 (1993); y Lode *et al.*, *Cancer Res.* 58:2925-2928 (1998)); una antraciclina, tal como daunomicina o doxorubicina (véase Kratz *et al.*, *Current Med. Chem.* 13:477-523 (2006); Jeffrey *et al.*, *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 16:358-362 (2006); Torgov *et al.*, *Bioconj. Chem.* 16:717-721 (2005); Nagy *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:829-834 (2000); Dubowchik *et al.*, *Bioorg. & Med. Chem. Letters* 12:1529-1532 (2002); King *et al.*, *J. Med. Chem.* 45:4336-4343 (2002); y la patente de EE. UU. n.º 6.630.579); metotrexato; vindesina; un taxano, tal como docetaxel, paclitaxel, larotaxel, tesetaxel y ortataxel; un tricoteceno; y CC1065.

En otro modo de realización, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo como se describe en el presente documento conjugado a una toxina enzimáticamente activa o fragmento de la misma, que incluye, pero no se limita a, la cadena A de difteria, fragmentos activos que no se unen de la toxina diftérica, la cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), la cadena A de ricina, la cadena A de abrina, la cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos.

En otro modo de realización, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo como se describe en el presente documento conjugado a un átomo radioactivo para formar un radioconjugado. Están disponibles una variedad de isótopos radioactivos para la producción de radioconjugados. Los ejemplos incluyen At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} e isótopos radioactivos de Lu. Cuando se usa el radioconjugado para la detección, puede comprender un átomo radioactivo para estudios gammagráficos, por ejemplo, Tc^{99m} o I^{123} , o un marcador de espín

para resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como resonancia magnética, RM), tal como yodo-123 de nuevo, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

Se pueden preparar conjugados de un anticuerpo y agente citotóxico usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales, tales como 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP), 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como clorhidrato de adipimidato de dimetilo), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como toluen-2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina como se describe en Vitetta *et al.*, *Science* 238:1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentriaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un agente quelante ejemplar para la conjugación del radionúclido al anticuerpo. Véase el documento WO94/11026. El conector puede ser un "conector escindible" que facilite la liberación de un fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, se puede usar un conector lábil en ácido, conector sensible a la peptidasa, conector fotolábil, conector de dimetilo o conector que contiene disulfuro (Chari *et al.*, *Cancer Res.* 52:127-131 (1992); patente de EE. UU. n.º 5.208.020).

Los inmunoconjugados o ADC en el presente documento contemplan expresamente, pero no se limitan a, dichos conjugados preparados con reactivos de reticulación, incluyendo, pero no limitados a, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC y sulfo-SMPB y SVSB ((4-vinilsulfona)benzoato de succinimidilo), que están disponibles comercialmente (por ejemplo, de Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., EE. UU.).

E. Procedimientos y composiciones para el diagnóstico y la detección

En determinados modos de realización, cualquiera de los anticuerpos anti-HtrA1 proporcionados en el presente documento es útil para detectar la presencia de HtrA1 en una muestra biológica. El término "detectar" como se usa en el presente documento abarca la detección cuantitativa o cualitativa. En determinados modos de realización, una muestra biológica comprende una célula o tejido, tal como una muestra que comprende células fotorreceptoras, células del epitelio pigmentario de la retina, células de la capa nuclear externa, de la capa nuclear interna, glías de Müller, epitelio ciliar o tejido de la retina.

En un modo de realización, se proporciona un anticuerpo anti-HtrA1 para su uso en un procedimiento de diagnóstico o detección. En otro aspecto, se proporciona un procedimiento de detección de la presencia de HtrA1 en una muestra biológica. En determinados modos de realización, el procedimiento comprende poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo anti-HtrA1 como se describe en el presente documento en condiciones que permitan la unión del anticuerpo anti-HtrA1 a HtrA1, y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo anti-HtrA1 y HtrA1. Dicho procedimiento puede ser un procedimiento *in vitro* o *in vivo*. En un modo de realización, se usa un anticuerpo anti-HtrA1 para seleccionar sujetos idóneos para su tratamiento con un anticuerpo anti-HtrA1, por ejemplo, cuando HtrA1 es un biomarcador para la selección de pacientes.

En determinados modos de realización, se puede identificar un paciente adecuado para su tratamiento con un anticuerpo anti-HtrA1 detectando uno o más polimorfismos en el gen HtrA1 o secuencia de control de HtrA1, tal como el polimorfismo en el promotor de HtrA1, rs11200638(G/A) (véase, por ejemplo, A. DeWan, *et al.*, *Science* 314: 989-992 (2006)).

Los trastornos ejemplares que se pueden diagnosticar usando un anticuerpo de la invención incluyen trastornos oculares, tales como, por ejemplo, degeneración macular senil (DMS) húmeda, degeneración macular senil seca, atrofia geográfica (AG), retinopatía diabética (RD), retinopatía de la prematuridad (RP) o vasculopatía coroidea polipoidea (VCP).

En determinados modos de realización, se proporcionan anticuerpos anti-HtrA1 marcados. Los marcadores incluyen, pero no se limitan a, marcadores o restos que se detectan directamente (tales como marcadores fluorescentes, cromóforos, electrodenso, quimioluminiscentes y radioactivos), así como restos, tales como enzimas o ligandos, que se detectan indirectamente, por ejemplo, a través de una reacción enzimática o interacción molecular. Los marcadores ejemplares incluyen, pero no se limitan a, los radioisótopos ³²P, ¹⁴C, ¹²⁵I, ³H y ¹³¹I, fluoróforos, tales como quelatos de tierras raras o fluorocena y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, luciferasas, por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana (patente de EE. UU. n.º 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazindionas, peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina, β-galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, oxidasas de sacáridos, por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, oxidasas heterocíclicas, tales como uricasa y xantina oxidasa, que se acoplan con una enzima que emplea peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor de tinte, tal como HRP, lactoperoxidasa o microperoxidasa, biotina/avidina, marcadores de espín, marcadores de bacteriófagos, radicales libres estables y similares.

F. Formulaciones farmacéuticas

Las formulaciones farmacéuticas de un anticuerpo anti-HtrA1 como se describe en el presente documento se preparan mezclando dicho anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables opcionales (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16.^a edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos farmacéuticamente aceptables, en general, no son tóxicos para los destinatarios a las dosificaciones y concentraciones empleadas e incluyen, pero no se limitan a: tampones, tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencilico; alquilparabenos, tales como metil- o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono, que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; glúcidos, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; complejos de metal (por ejemplo, complejos Zn-proteína) y/o tensioactivos no iónicos, tales como polietilenglicol (PEG). Los vehículos farmacéuticamente aceptables ejemplares en el presente documento incluyen además agentes de dispersión intersticial de fármacos, tales como glucoproteínas de hialuronidasa activa a pH neutro soluble (sHASEGP), por ejemplo, glucoproteínas de hialuronidasa PH-20 soluble humana, tales como rHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.). Se describen determinadas sHASEGP ejemplares y procedimientos de uso, incluyendo rHuPH20, en las publicaciones de patente de EE. UU. n.ºs 2005/0260186 y 2006/0104968. En un aspecto, se combina una sHASEGP con una o más glucosaminoglucanasas adicionales, tales como condroitinasas.

Se describen formulaciones de anticuerpos liofilizadas ejemplares en la patente de EE. UU. n.º 6.267.958. Las formulaciones de anticuerpos acuosas incluyen las descritas en la patente de EE. UU. n.º 6.171.586 y el documento WO 2006/044908, incluyendo las últimas formulaciones un tampón histidina-acetato.

La formulación en el presente documento también puede contener más de un ingrediente activo según sea necesario para la indicación particular que se trate, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no se ven afectadas de manera adversa entre sí. Por ejemplo, para tratar una neovascularización no deseada asociada a un trastorno ocular, tal como DMS húmeda, puede ser deseable proporcionar además un tratamiento antiangiogénico, tal como un tratamiento anti-VEGF como LUCENTIS™ (ranibizumab). Dichos ingredientes activos están presentes adecuadamente en combinación en cantidades que son eficaces para el fin pretendido. En otros modos de realización, el tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado a una neovascularización ocular no deseable puede implicar una combinación de un anticuerpo anti-HtrA1 y tratamiento fotodinámico (por ejemplo, con MACUGEN™ o VISUDYNE™).

Los ingredientes activos se pueden atrapar en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o de gelatina y microcápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se divulgan en *Remington's Pharmaceutical Sciences* 16.^a edición, Osol, A. Ed. (1980).

Se pueden preparar preparaciones de liberación mantenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación mantenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, estando dichas matrices en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas.

Las formulaciones que se van a usar para su administración *in vivo* son, en general, estériles. La esterilidad se puede conseguir fácilmente, por ejemplo, mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

G. Procedimientos y composiciones terapéuticos

Se puede usar cualquiera de los anticuerpos anti-HtrA1 proporcionados en el presente documento en procedimientos terapéuticos.

En determinados modos de realización, un anticuerpo anti-HtrA1 es útil para inhibir la degeneración de las células de la retina (tales como, por ejemplo, las células del epitelio pigmentario de la retina (EPR)) o células fotorreceptoras en un ojo de un paciente que padece o está en riesgo de desarrollar un trastorno ocular (por ejemplo, un paciente que tiene un polimorfismo en HtrA1, expresión de HtrA1 incrementada en el ojo o drusas en al menos un ojo). En determinados modos de realización, se puede usar un anticuerpo anti-HtrA1 para ralentizar la progresión a atrofia geográfica en etapa tardía o degeneración macular senil seca en un ojo de un paciente que tiene drusas en el ojo que se va a tratar. En determinados modos de realización, se puede identificar un paciente adecuado para su tratamiento con un anticuerpo anti-HtrA1 detectando la aparición de la enfermedad en al menos un ojo del paciente. Por ejemplo, se pueden seleccionar determinados pacientes detectando drusas, atrofia geográfica o neovascularización coroidea en un ojo, mientras que el otro ojo no presenta síntomas. Dichos pacientes pueden ser buenos candidatos para el tratamiento preventivo en el ojo sin síntomas, por ejemplo, para retrasar la aparición o reducir la gravedad de dichos

síntomas (por ejemplo, drusas, atrofia geográfica y/o neovascularización coroidea) en el ojo sin síntomas. De forma alternativa, se puede tratar el ojo sintomático, o tanto el ojo sintomático como el ojo sin síntomas se pueden tratar de acuerdo con los procedimientos descritos en el presente documento. En consecuencia, se puede usar un anticuerpo anti-HtrA1 para prevenir o inhibir la progresión de un trastorno ocular en un ojo del paciente, en el que el paciente ha desarrollado drusas, DMS húmeda o atrofia geográfica en el otro ojo, pero el ojo que se trata todavía no es sintomático. De forma alternativa, se trata el ojo sintomático, o se tratan tanto el ojo sintomático como el ojo sin síntomas.

En otro modo de realización, un anticuerpo anti-HtrA1 es útil para tratar la artritis.

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-HtrA1 para su uso como un medicamento. En otros aspectos, se proporciona un anticuerpo anti-HtrA1 para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno ocular, tal como, por ejemplo, DMS (húmeda o seca), AG, RD, VCP o RP. En determinados modos de realización, se proporciona un anticuerpo anti-HtrA1 para su uso en un procedimiento de tratamiento. En determinados modos de realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-HtrA1 para su uso en un procedimiento de tratamiento de un individuo que tiene una enfermedad o trastorno ocular, que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del anticuerpo anti-HtrA1. En uno de dichos modos de realización, el procedimiento comprende además administrar al individuo una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe a continuación. En otros modos de realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-HtrA1 para su uso en la inhibición de la degeneración de las células de la retina (tales como, por ejemplo, células del EPR) o de las células fotorreceptoras en un ojo de un paciente. En determinados modos de realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-HtrA1 para su uso en un procedimiento de inhibición de la degeneración de las células de la retina o fotorreceptoras en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del anticuerpo anti-HtrA1 para inhibir la degeneración de las células de la retina o fotorreceptoras. En otros modos de realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-HtrA1 para su uso en la inhibición de la actividad serina proteasa de HtrA1 en un ojo de un paciente. En determinados modos de realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-HtrA1 para su uso en un procedimiento de inhibición de la actividad serina proteasa de HtrA1 en un ojo de un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del anticuerpo anti-HtrA1 para inhibir la actividad serina proteasa de HtrA1 en el ojo. Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores es preferentemente un ser humano. En otros modos de realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-HtrA1 para su uso en la inhibición de la VCP en un paciente que lo necesita, por ejemplo, un paciente que tiene redes vasculares coroideas con dilataciones aneurismáticas similares a pólipo.

Un "individuo" de acuerdo con cualquiera de los modos de realización anteriores puede ser un ser humano.

Se puede medir la eficacia del tratamiento de un trastorno ocular usando un anticuerpo anti-HtrA1 mediante diversos criterios de valoración usados comúnmente en la evaluación de las enfermedades intraoculares, tales como, por ejemplo, realizar un examen ocular, medir la presión intraocular, evaluar la agudeza visual, medir la presión con lámpara de hendidura, evaluar la inflamación intraocular, medir el tamaño de la NVC, medir la extravasación de la NVC (por ejemplo, mediante angiografía con fluoresceína), medir la cantidad de drusas, medir la localización de las drusas, etc. En determinados modos de realización, se puede evaluar la pérdida de visión, por ejemplo, midiendo el cambio medio en la mejor agudeza visual corregida (MAVC) a partir del punto de referencia a un punto de tiempo deseado (por ejemplo, cuando la MAVC se basa en una tabla de agudeza visual según el estudio de retinopatía diabética de tratamiento temprano (ETDRS) y una evaluación a una distancia de prueba de 4 metros), midiendo la proporción de sujetos que pierden menos de 15 letras en agudeza visual en un punto de tiempo deseado en comparación con el punto de referencia, midiendo la proporción de sujetos que ganan más de o igual a 15 letras en agudeza visual en un punto de tiempo deseado en comparación con el punto de referencia, midiendo la proporción de sujetos con una agudeza visual de Snellen equivalente a 20/2000 o peor en un punto de tiempo deseado o midiendo el cuestionario de funcionamiento visual del NEI.

En otro aspecto, la invención proporciona formulaciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de los anticuerpos anti-HtrA1 proporcionados en el presente documento, por ejemplo, para su uso en cualquiera de los procedimientos terapéuticos anteriores. En un modo de realización, una formulación farmacéutica comprende cualquiera de los anticuerpos anti-HtrA1 proporcionados en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otro modo de realización, una formulación farmacéutica comprende cualquiera de los anticuerpos anti-HtrA1 proporcionados en el presente documento y al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe a continuación.

Los anticuerpos de la invención se pueden usar solos o bien en combinación con otros agentes en un tratamiento. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención se puede coadministrar con al menos un agente terapéutico adicional. En determinados modos de realización, un agente terapéutico adicional es un agente terapéutico adecuado para el tratamiento de un trastorno ocular asociado a neovascularización no deseable en el ojo, tal como, por ejemplo, DMS húmeda. Los agentes terapéuticos adecuados incluyen, por ejemplo, tratamientos antiangiogénicos, tales como un tratamiento anti-VEGF como LUCENTIS™ (ranibizumab).

Dichas politerapias indicadas anteriormente abarcan la administración combinada (en la que se incluyen dos o más agentes terapéuticos en la misma formulación o en formulaciones separadas) y la administración separada, en cuyo

caso, la administración del anticuerpo de la invención se puede producir antes, simultáneamente y/o después de la administración del agente terapéutico y/o adyuvante adicional. También se pueden usar los anticuerpos de la invención en combinación con un tratamiento fotodinámico (por ejemplo, con MACUGEN™ o VISUDYNE™).

Un anticuerpo de la invención (y cualquier agente terapéutico adicional) se puede administrar mediante cualquier medio adecuado, incluyendo administración parenteral, intrapulmonar e intranasal y, si se desea para el tratamiento local, intralesional. Las infusiones parenterales incluyen administración intramuscular, intravenosa, intrarterial, intraperitoneal o subcutánea. En un modo de realización ejemplar, se puede administrar un anticuerpo de la invención (y cualquier agente terapéutico adicional) mediante inyección intravítrea. La dosificación puede ser mediante cualquier vía adecuada, por ejemplo, mediante inyecciones, tales como inyecciones intravenosas, intravítreas o subcutáneas, dependiendo, en parte, de si la administración es breve o prolongada. En el presente documento se contemplan diversas pautas posológicas que incluyen, pero no se limitan a, administraciones únicas o múltiples en diversos puntos de tiempo, administración de inyección intravenosa rápida e infusión de inyección intravenosa con administración prolongada.

Los anticuerpos de la invención se formularán, dosificarán y administrarán de una forma consistente con las prácticas médicas correctas. Los factores que se deben tener en consideración en este contexto incluyen el trastorno particular que se trata, el mamífero particular que se trata, el estado clínico del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el procedimiento de administración, la pauta de administración y otros factores conocidos por los médicos. Aunque no se necesita, el anticuerpo se formula opcionalmente con uno o más agentes usados actualmente para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo presente en la formulación, del tipo de trastorno o tratamiento y de otros factores analizados anteriormente. Estos se usan, en general, en las mismas dosificaciones y por las vías de administración que se describen en el presente documento, o aproximadamente desde un 1 a un 99 % de las dosificaciones descritas en el presente documento, o en cualquier dosificación y mediante cualquier vía que se determine empíricamente/clínicamente que sea apropiada.

Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosificación apropiada de un anticuerpo de la invención (cuando se usa solo o en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos adicionales) dependerá del tipo de enfermedad que se va a tratar, del tipo de anticuerpo, de la gravedad y la evolución de la enfermedad, ya sea si el anticuerpo se administra para fines preventivos o terapéuticos, del tratamiento previo, de la anamnesis del paciente y de la respuesta al anticuerpo y del criterio del médico adjunto. El anticuerpo se administra adecuadamente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y de la gravedad de la enfermedad, de aproximadamente 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, de 0,1 mg/kg a 10 mg/kg) de anticuerpo puede ser una dosificación inicial candidata para su administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas o mediante infusión continua. Una dosificación diaria típica puede variar desde aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento, en general, se mantendrá hasta que se produzca una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Una dosificación ejemplar del anticuerpo estaría en el intervalo desde aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. Por tanto, se pueden administrar al paciente una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas). Dichas dosis se pueden administrar intermitentemente, por ejemplo, cada semana o cada tres semanas (por ejemplo, de tal manera que el paciente reciba desde aproximadamente dos a aproximadamente veinte o, por ejemplo, aproximadamente seis dosis del anticuerpo). Se puede administrar una dosis de carga inicial más alta, seguida de una o más dosis más bajas.

Se entiende que se puede llevar a cabo cualquiera de las formulaciones o procedimientos terapéuticos anteriores usando un inmunoconjugado de la invención en lugar de o además de un anticuerpo anti-HtrA1.

H. Artículos de fabricación

En otro aspecto de la invención, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento, la prevención y/o el diagnóstico de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto del envase en o asociado al recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas, bolsas de solución i.v., etc. Los recipientes se pueden formar a partir de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es, por sí misma o combinada con otra composición eficaz para tratar, prevenir y/o diagnosticar la afección y que puede tener un orificio de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tenga un tapón perforable mediante una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo de la composición es un anticuerpo de la invención. La etiqueta o prospecto del envase indica que la composición se usa para tratar la afección de elección. Además, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un anticuerpo de la invención; y (b) un segundo recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un agente citotóxico o de otro modo terapéutico adicional. El artículo de fabricación en este modo de realización de la invención puede comprender además un prospecto del envase que indique que las composiciones se pueden usar para tratar una afección particular. De forma alternativa, o adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender además

un segundo (o tercer) recipiente que comprenda un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyectables (BWF), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

Se entiende que cualquiera de los artículos de fabricación anteriores puede incluir un inmunoconjugado de la invención en lugar de o además de un anticuerpo anti-HtrA1.

Identificador de secuencias

HVR de la cadena ligera para anticuerpo anti-HtrA1 YW505.94

HVR L1: RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 1)

HVR L2: SASFLYS (SEQ ID NO: 2)

HVR L3: QQSYTTPPT (SEQ ID NO: 3)

HVR de la cadena pesada para anticuerpo anti-HtrA1 YW505.94

HVR H1: GFNISGYIYH (SEQ ID NO: 4)

HVR H2: WIDPYGGDTNYADSVKG (SEQ ID NO: 5)

HVR H3: GTFLTSWGHYFDY (SEQ ID NO: 6)

VR de la cadena ligera para anticuerpo anti-HtrA1 YW505.94

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVSTAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 7)

VR de la cadena pesada para anticuerpo anti-HtrA1 YW505.94

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNISGYYIHWVRQAPGKGLEWVGWIDPYGGD
TNYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGTFLTSWGHYFDYWG
QGT (SEQ ID NO: 8)

HtrA1 humana (secuencia de longitud completa en mayúsculas, el dominio proteasa está subrayado, los residuos N224 y K248 están sombreados)

mqipraallpllllllaapasaQLSRAGRSAPLAAGCPDRCEPARCPPQPEHCEGGRARDACGCCE
VCGAPEGAACGLQEGPCGEGQLQCVVPFGVPASATVRRRAQAGLCVCASSEPVCGSDA
NTYANLCQLRAASRRSERLHRPPVIVLQRGACGQGQEDPNSLRHKYNFIADVVEKIAP
AVVHIELFRKLPFSKREVPVASGSGFIVSEDGLIVTNAHVVTNKHVRVKVELKNGATYE
AKIKDVDEKADIALIKIDHQGKLPVLLLGRSSELRPGEFVVAIGSPFSLQNTVTTGIVSTT
QRGGKELGLRNSDMDYIQTDAIINYGNSGGPLVNLDGEVIGINTLKVTAGISFAIPSDKI
KKFLTESHDRQAKGKAITKKKYIGIRMMSLTSSKAKELKDRHRDFPDVISGAYIIEVIPD
TPAEAGGLKENDVIISINGQSVVSANDVSDVIKRESTLNMVVRRGNEDIMITVIPEEIDP
(SEQ ID NO: 13)

HtrA1 murina (secuencia de longitud completa en mayúsculas, el dominio proteasa está subrayado)

mqsrlrtllslilllllaapslalPSGTGRSAPAATVCPEHCDPTRCAPPTDCEGGRVRDACGCCEVC
GALEGAACGLQEGPCGEGQLQCVVPFGVPASATVRRRAQAGLCVCASSEPVCGSDAKT
YTNLCQLRAASRRSEKLRQPPVIVLQRGACGQGQEDPNSLRHKYNFIADVVEKIAPAV
VHIELYRKLFPFSKREVPVASGSGFIVSEDGLIVTNAHVVTNKNRVKVELKNGATYEAKI
KDVDEKADIALIKIDHQGKLPVLLLGRSSELRPGEFVVAIGSPFSLQNTVTTGIVSTTQR
GGKELGLRNSDMDYIQTDAIINYGNSGGPLVNLDGEVIGINTLKVTAGISFAIPSDKIKK
FLTESHDRQAKGKAVTKKKYIGIRMMSLTSSKAKELKDRHRDFPDVLSGAYIIEVIPDT
PAEAGGLKENDVIISINGQSVVTANDVSDVIKKENTLNMVVRRGNEDIVITVIPEEIDP
(SEQ ID NO: 14)

HtrA3 murina (el dominio proteasa está subrayado)

MQARALLPATLAILATLAVLALAREPPAAPCPARCDVSRCPSPRCPGGYVPDLCNCCL
VCAASEGEPGRPLDSPCGDSLECVRGVCRCRWTHTVCGTDGHTYADVCAALQAASR
RALQVSGTPVRQLQKGACPSGLHQLTSPRYKFNFIADVVEKIAPAVVHIELFLRHPLFG
RNVPLSSSGSFIMSEAGLIVTNAHVSSSSSTASGRQQLKVQLONGDAYEATIQDIDKKS
DIATIVIHPKKKLPLVLLLGHSADLRPGFEVVAIGSPFALQNTVTTGIVSTAQRDQKELGL
RDSDMDYIQTDAIINYGNSSGGPLVNLDGEVIGINTLKVAAGISFAIPSDRITRFLSEFQNK
HVKDWKKRFIGIRMRTITPSLVEELKAANPDFPAVSSGIYVQEVVPNSPSQRRGGIQDGD
IVKVNRPPLADSSSELQEAVLNESSLLLEVRRGNDDLFSIIEVVM (SEQ ID NO: 15)

HtrA4 murina (el dominio proteasa está subrayado)

MSFQRLWAVRTQFLLWLLLPAPVPVWAEARRSRVSLPCPDACDPTRCPTLPTCSAGL
APVPDRCGCCRVCAAAEGQECGGARGRPCAPRLRCGAPFSRDPSSGGAWLGTGCGAE
GAEDAVVCGSDGRTPSLCALRKENRAARQRGALPAVPVQKGACEEAGTTRAGRRLR
RKYNFIAAVVEKVAPSVVHLQLFRRSPLTNQEIPSSSGSGFVSEDGLIVTNAHVLTNQ
KIQVELQSGARYEATVKDIDHKLDLALIKIEPDTLPVLLGRSSDLRAGEFVVALGSPF
SLQNTVTAGIVSTTQRRGRELGLKNSDIDYIQTDAIINHGNSSGGPLVNLDGDVIGINTLK
VTAGISFAIPSDRIRQFLEDYHERQLKGKAPLQKKYLGLRMLPLTLNLLQEMKRQDPEF
PDVSSGVFVYEVIQGSAAASSGLRDHDVIVSINGQPVTTTTVDVIEAVKDNDFLSIIVLRG
SQTLFLTVPETIIN (SEQ ID NO: 16)

YW505.95 HC FR2

WVRQAPGKGLEWVG (SEQ ID NO: 17)

HVR de la cadena ligera para anticuerpo anti-HtrA1 YW505.94a.28

HVR L1: RASQSINTYLA (SEQ ID NO: 18)

HVR L2: SASFLYS (SEQ ID NO: 2)

HVR L3: QQSDDTPPT (SEQ ID NO: 19)

HVR de la cadena pesada para anticuerpo anti-HtrA1 YW505.94a.28

HVR H1: GFSISGYIYH (SEQ ID NO: 20)

HVR H2: WIDPYGGDTNYADSVKG (SEQ ID NO: 5)

HVR H3: GTFLTSGWHYFDY (SEQ ID NO: 6)

VR de la cadena ligera para anticuerpo anti-HtrA1 YW505.94a.28

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSINTYLAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPS
RFGSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQQSDDTPPTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 28)

VR de la cadena pesada para anticuerpo anti-HtrA1 YW505.94a.28

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSISGYIYHWVRQAPGKGLEWVGWIDPYGGD
TNYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGTFLTSGWHYFDYWG
QGT (SEQ ID NO: 29)

HVR de la cadena ligera para anticuerpo anti-HtrA1 YW505.94a.54

HVR L1: RASQVVGNYLA (SEQ ID NO: 21)

HVR L2: SASFLYS (SEQ ID NO: 2)

HVR L3: QQSDDHPPT (SEQ ID NO: 22)

HVR de la cadena pesada para anticuerpo anti-HtrA1 YW505.94a.54

HVR H1: GFSISGYYIH (SEQ ID NO: 20)

HVR H2: WIDPY GGDNYADSVKG (SEQ ID NO: 5)

HVR H3: GTFLT SWGHYFDY (SEQ ID NO: 6)

VR de la cadena ligera para anticuerpo anti-HtrA1 YW505.94a.54

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQVVGNYLAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGV
PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSDDHPPTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 30)

VR de la cadena pesada para anticuerpo anti-HtrA1 YW505.94a.54

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSISGYYIHWVRQAPGKGLEWVGVWIDPYGGD
TNYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGTFLTSWGHYFDYWG
QGT (SEQ ID NO: 29)

Secuencias consenso de HVR de la cadena ligera

HVR L1: RASQX_aX_bX_cX_dX_eX_fA, en la que X_a es D, S o V; X_b es V o I; X_c es S, N o G; X_d es T o N; X_e es A o Y; y X_f es V o L (SEQ ID NO: 23);

HVR L2: SASFLYS (SEQ ID NO: 2)

HVR L3: QQX_gX_hX_iX_jPX_kT, en la que X_g es S, V o D; X_h es Y, D o S; X_i es T, S, A, D o N; X_j es T, H, N, S, A, L o R; y X_k es P, T, A o S (SEQ ID NO: 24);

Secuencias consenso de HVR de la cadena pesada

HVR H1: GFX_mX_nYYIH, en la que X_i es N, S o T; X_m es S, D, Y o A; y X_n es G o D (SEQ ID NO: 25);

HVR H2: WIDPYGGDTX_oYADSVKG, en la que X_o es N o D (SEQ ID NO: 26);

HVR H3: GTFLT_pWGHYFDY, en la que X_p es S o T (SEQ ID NO: 27).

VR de la cadena ligera consenso

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQX_aX_bX_cX_dX_eX_fAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQX_gX_hX_iX_jPX_kTFGQGTKVEIKR,

en la que X_a es D, S o V; X_b es V o I; X_c es S, N o G; X_d es T o N; X_e es A o Y; X_f es V o L; X_g es S, V o D; X_h es Y, D o S; X_i es T, S, A, D o N; X_j es T, H, N, S, A, L o R; y X_k es P, T, A o S; (SEQ ID NO: 31)

VR de la cadena pesada consenso

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFX_iIX_mX_nYYIHWVRQAPGKGLEWVGVWIDPYG
GDTX_oYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARGTFLT_pWGHYFD
YWGQGT, en la que X_i es N, S o T; X_m es S, D, Y o A; X_n es G o D; X_o es N o D; y X_p es S o T (SEQ ID NO: 32)

YW505.94a.51 HVR L1: RASQDVGTyla (SEQ ID NO: 33)

YW505.94a.1 HVR L3: QQVYSHPPT (SEQ ID NO: 34)

YW505.94a.7 HVR L3: QQSYTNPPT (SEQ ID NO: 35)

YW505.94a.22 HVR L3: QQSYATPTT (SEQ ID NO: 36)

YW505.94a.37 HVR L3: QQSYSSPAT (SEQ ID NO: 37)

YW505.94a.39 HVR L3: QQVYTPPT (SEQ ID NO: 38)

YW505.94a.40 HVR L3: QQVYATPST (SEQ ID NO: 39)

YW505.94a.42 HVR L3: QQSYNSPAT (SEQ ID NO: 40)

YW505.94a.46 HVR L3: QQSYSTPAT (SEQ ID NO: 41)

ES 2 687 951 T3

- YW505.94a.50 HVR L3: QQSYTAPTT (SEQ ID NO: 42)
- 5 YW505.94a.51 HVR L3: QQDSTLPPT (SEQ ID NO: 43)
- YW505.94a.52 HVR L3: QQSDAAPPT (SEQ ID NO: 44)
- YW505.94a.78 HVR L3: QQSYSTPPT (SEQ ID NO: 45)
- 10 YW505.94a.89 HVR L3: QQSYTRPPT (SEQ ID NO: 46)
- YW505.94a.7 HVR H1: GFSISDYYIH (SEQ ID NO: 47)
- 15 YW505.94a.26 HVR H1: GFSIDGYIYH (SEQ ID NO: 48)
- YW505.94a.38 HVR H1: GFTIYDYYIH (SEQ ID NO: 49)
- YW505.94a.78 HVR H1: GFSIAGYYIH (SEQ ID NO: 50)
- 20 YW505.94a.82 HVR H1: GFTISDYYIH (SEQ ID NO: 51)
- YW505.94A.42 HVR H2: WIDPYGGDTDYADSVKG (SEQ ID NO: 52)
- 25 YW505.94A.46 HVR H3: GTFLTWTWGHYFDY (SEQ ID NO: 53)
- Tabla A. Secuencias de HVR y de dominio variable para el anticuerpo anti-HtrA1 YW505.94 y variantes mejoradas en afinidad del mismo.

	SEQ ID NO							
	H1	H2	H3	L1	L2	L3	VR de la HC	VR de la HC
Consenso	25	26	27	23	2	24	32	31
YW505.94	4	5	6	1	2	3	8	7
YW505.94a	20	5	6	1	2	3	29	7
YW505.94a.28	20	5	6	18	2	19	29	28
YW505.94a.54	20	5	6	21	2	22	29	30
YW505.94a.1	20	5	6	1	2	34		
YW505.94a.7	47	5	6	1	2	35		
YW505.94a.22	20	5	6	1	2	36		
YW505.94a.26	48	5	6	1	2	3		
YW505.94a.37	47	5	6	1	2	37		
YW505.94a.38	49	5	6	1	2	3		
YW505.94a.39	20	5	6	1	2	38		
YW505.94a.40	20	5	6	1	2	39		
YW505.94a.42	20	52	6	1	2	40		
YW505.94a.46	20	5	53	1	2	41		
YW505.94a.47	20	52	6	1	2	3		
YW505.94a.50	47	5	6	1	2	42		
YW505.94a.51	20	5	6	33	2	43		
YW505.94a.52	20	5	6	1	2	44		
YW505.94a.77	20	5	53	1	2	3		
YW505.94a.78	50	5	6	1	2	45		
YW505.94a.82	51	5	6	1	2	3		
YW505.94a.89	20	52	6	1	2	46		

III. Ejemplos

5 Ejemplo 1: Generación de anticuerpos anti-HtrA1

Presentación en fagos. Las colecciones de anticuerpos sintéticos presentaron fragmentos Fab bivalentes en el fago M13 y se generó la diversidad mediante el uso de mutagénesis dirigida por oligonucleótidos en tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada. Los detalles de las colecciones de Fab se describieron previamente (Lee, C.V., *et al.*, *J Mol Biol.* 340:1073-93 (2004); Lee, C.V., *et al.*, *J Immunol Methods.* 284:119-32 (2004)). Se recubrieron durante la noche inmunoplasmas Maxisorp de 96 pocillos de Nunc a 4° C con MuHtrA1_PD (10 µg/ml) y, entonces, se bloquearon durante 1 h a temperatura ambiente con tampón de bloqueo de fagos (PBS, BSA al 1% (p/v), Tween 20 al 0,05 % (v/v)). Las colecciones de anticuerpos en fagos se añadieron a las placas recubiertas con MuHtrA1_PD y se incubaron durante la noche a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con PBS, tampón Tween-20 al 0,05 % (v/v) y el fago unido se eluyó con HCl 50 mM-NaCl 500 mM durante 30 min y se neutralizó con un volumen equivalente de tris-HCl 1 M, pH 7,5. Se amplificó el fago recuperado en células de *E. coli* XL-1-Blue. Durante las tandas de selección posteriores, la incubación del anticuerpo en fago con las placas recubiertas con antígeno se redujo a 2-3 horas y la restricción del lavado de placa se incrementó gradualmente. Se reformatearon 13 clones identificados a IgG (como se describe a continuación para Fab94), se expresaron en 293 células y se purificaron mediante cromatografía de afinidad con proteína A. Las 13 IgG purificadas se unieron a MuHtrA1_PD en un ELISA de unión.

Expresión y purificación de anti-HtrA1 Fab94 e IgG94. Las regiones variables de tanto las cadenas pesada como ligera de Fab94 (YW505.94) se subclonaron en un vector de expresión de Fab de *E. coli* (AEP1). El plásmido resultante se transformó en la cepa 34B8 de *E. coli*. La única colonia se cultivó durante la noche a 37 °C en 30 ml de medio LB enriquecido con 50 µg/ml de carbenicilina. Se inocularon cinco ml del cultivo en 500 ml de medio C.R.A.P. completo (Simmons, L.C., *et al.*, *J Immunol Methods.* 263:133-47 (2002)) enriquecido con carbenicilina (50 µg/ml) y se cultivó a 30 °C durante 24 h. Se purificó la proteína Fab94 usando resina de agarosa de proteína A.

Los dominios variables de tanto la cadena ligera como de la cadena pesada de Fab94 se clonaron en un plásmido basado en pRK5 con el dominio constante de la cadena ligera o de la cadena pesada humana (IgG1 humana) para su expresión transitoria en células de ovario de hámster chino (CHO). La proteína IgG94 se purificó mediante el uso de cromatografía de agarosa con proteína A.

Las secuencias de aminoácidos para la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada para Fab94 (YW505.94) se muestran en las figs. 1A y 1B, respectivamente.

Ejemplo 2: Producción de proteínas HtrA1

Construcciones de proteínas. Se clonaron HtrA1 humana de longitud completa (HuHtrA1) (Q23-P480) y HtrA1 murina de longitud completa (MuHtrA1) (P24-P480) mediante amplificación por PCR a partir de clones de longitud completa usando Taq polimerasa. Los cebadores contenían los nucleótidos requeridos para añadir porciones de los sitios de restricción BamHI y EcoRI a los productos de PCR resultantes. Los fragmentos de PCR se fijaron a un vector de transferencia de baculovirus pAcGP67 (BD Pharmingen) modificado que contenía una secuencia His₆ (SEQ ID NO: 90) en dirección 5' del sitio de restricción BamHI, dando como resultado un marcador His₆ N terminal (SEQ ID NO: 90) en las proteínas HtrA1.

El dominio proteasa de HtrA1 humana (HtrA1_PD) que carece del dominio N y del dominio PDZ (por ejemplo, que contiene los residuos D161-K379) se clonó mediante amplificación por PCR. El ADN amplificado se insertó en un vector pET modificado, dando como resultado un marcador His₆ N terminal (SEQ ID NO: 90) y un sitio de escisión de trombina fusionado en dirección 5' del codón D161 de HtrA1. Los mutantes de HtrA1_PD Ala se generaron usando el kit de mutagénesis dirigida a sitio QuikChange XL de acuerdo con el protocolo del fabricante (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Las construcciones se verificaron mediante secuenciación de ADN. Los dominios proteasa de HtrA1 murina (MuHtrA1_PD) (G156-S367), HtrA3 murina (MuHtrA3_PD) (P133-F350) y HtrA4 murina (MuHtrA4_PD) (E159-Y371) se clonaron a partir de clones de longitud completa usando Pfu polimerasa (Agilent). Los cebadores contenían los nucleótidos requeridos para añadir los sitios de restricción Not I y Stu I a los productos de PCR resultantes. Los fragmentos de PCR se fijaron a pST23 de un vector de expresión con un promotor de phoA. Este vector de expresión contiene las secuencias de aminoácidos MK(HQ)₆MHQSTAA (SEQ ID NO: 11) en dirección 5' del sitio de restricción Not I, dando como resultado la fusión N terminal del marcador de unienzima a los dominios proteasa.

Como se describe en el presente documento, se preparan los residuos de aminoácido de huHtrA1, muHtrA1, muHtrA3 y muHtrA4 con referencia a las SEQ ID NO: 13-16, respectivamente. Las posiciones de aminoácidos se especifican mediante el código de aminoácidos de una letra seguido de su posición dentro de una de las SEQ ID NO: 13-16. Por ejemplo, huHtrA1 de longitud completa comprende una secuencia que comienza en glutamina en la posición 23 de SEQ ID NO: 13 y termina en prolina en la posición 480 de SEQ ID NO: 13, por ejemplo, Q23-P480. De forma similar, las mutaciones en una posición particular dentro de una proteína HtrA se designan por el aminoácido de partida,

seguido de la posición dentro de una de las SEQ ID NO: 13-16, seguido del aminoácido sustituido. Por ejemplo, una mutación de lisina en la posición 248 de HuHtrA1 (SEQ ID NO: 13) a alanina se denomina K248A.

Expresión y purificación de proteínas. HuHtrA1 y MuHtrA1 se expresaron en células de insecto *Trichoplusia ni* (Expression Systems LLC, Woodland, CA). Los medios de células de insecto obtenidos (después de que el pH se ajustara a 6,8) tenían NiCl₂, CaCl₂ y NaCl añadidos a las concentraciones finales de 1,0, 2,5 y 150 mM, respectivamente.

Las construcciones de HuHtrA1_PD (natural y S328A mutante) se expresaron en *E. coli* BL21 (Stratagene). Los cultivos de *E. coli* se cultivaron a 37 °C en medio LB que contenía 50 µg/ml de carbenicilina hasta que A₆₀₀ alcanzó de 0,8 a 1,0 y, entonces, se indujo con IPTG 0,4 mM y se cultivó a 16 °C durante 24 h. Los sedimentos de células bacterianas se resuspendieron en 1/10-ésimo de volumen de cultivo de tris 50 mM, pH 8,0, NaCl 500 mM y se rompieron usando un microfluidizador. Los lisados se centrifugaron a 30.000 x g durante 30 min.

HuHtrA1, MuHtrA1, HuHtrA1_PD y HuHtrA1_PD (S328A) se purificaron usando resina de níquel-nitrilo-ácido triacético (Qiagen). Después de cargar los medios de células de insecto o lisados de *E. coli*, las columnas se lavaron con 10 volúmenes de columna (VC) de tris 50 mM, pH 8,0, NaCl 500 mM seguido de 10 VC de tris 50 mM, pH 8,0, NaCl 1 M, imidazol 20 mM. Las proteínas se eluyeron con tris 50 mM, pH 8,0, NaCl 200 mM, glicerol al 10 %, CHAPS al 0,25 %, imidazol 300 mM. Las fracciones combinadas se purificaron adicionalmente mediante cromatografía de exclusión por tamaño en una columna S-200 (GE Healthcare) y se obtuvieron las fracciones de los picos correspondientes a las formas de proteína triméricas. La pureza de la proteína fue mayor de un 90 % como se evaluó mediante SDS-PAGE y las concentraciones de proteínas se determinaron usando el ensayo de proteínas BCA™ (Pierce, Rockford, IL).

Los mutantes de Ala de HuHtrA1_PD (panel de 15 mutantes excepto S328A) se expresaron como se describe para la forma natural de HuHtrA1_PD (véase anteriormente). Se añadió tampón de lisis (PopCulture, EMD Chemical, San Diego CA) a los sedimentos de células bacterianas a 50 ml de tampón de lisis/500 ml de sedimento. El sedimento se suspendió completamente en tampón de lisis con un politrón y se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. El lisado celular se centrifugó (Beckman, rotor LA-16.250) a 33.700 x g durante 30 min a 4° C y el sobrenadante resultante se filtró a través de una unidad de filtro de 0,22 µm (Nalgene). El sobrenadante filtrado se cargó en una columna de Ni-NTA (3 ml, Qiagen) preequilibrada con tris 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM, glicerol al 10 %, pH 8,0 (tampón A). Una vez cargada, la columna se lavó con 12 VC de tampón A seguido de 20 VC de tampón A + Triton X-114 al 0,1 %. La columna se lavó, de nuevo, con 15 VC de tampón A para eliminar el detergente. Las proteínas se eluyeron con tampón A + imidazol 200 mM, CHAPS al 0,25 %. Las fracciones combinadas se purificaron adicionalmente con Superdex 200 (Hi load 16/60, 120 ml, GE Healthcare) equilibrada con tris 50 mM, pH 8,0, NaCl 200 mM, glicerol al 10 %, CHAPS al 0,25 %. Las fracciones correspondientes al pico del trímero de HtrA1_PD se combinaron. La pureza de la proteína fue mayor de un 90 % como se evaluó mediante SDS-PAGE y las concentraciones de proteínas se determinaron mediante el uso del ensayo de proteínas BCA™ (Pierce, Rockford, IL).

MuHtrA1_PD, MuHtrA3_PD y MuHtrA4_PD se expresaron en *E. coli* 58F3 (Szeto, W., *et al.*, *Cancer Res.* 61:4197-205 (2001)). Los cultivos durante la noche de *E. coli*, cultivados a 30 °C en medio LB que contenía 50 µg/ml de carbenicilina se diluyeron (1/100 vol) para dar un cultivo más grande que contenía medio C.R.A.P. (Simmons, L.C., *et al.*, *J Immunol Methods.* 263:133-47 (2002)) enriquecido con carbenicilina 50 µg/ml de carbenicilina. Después de la inoculación, se cultivó *E. coli* durante aproximadamente 20 h a 30 °C. MuHtrA1_PD se purificó como se describe para HuHtrA1_PD (véase anteriormente). Para la purificación de MuHtrA3_PD y MuHtrA4_PD, se añadió tampón de lisis (tris 50 mM, pH 8,5, NaCl 500 mM, imidazol 10 mM, glicerol al 10 %) al sedimento de células bacterianas. El sedimento se homogeneizó en tampón de lisis con un politrón y las células se homogeneizaron con un microfluidizador. El lisado celular se centrifugó y el sobrenadante resultante se filtró a través de una unidad de filtro de 0,22 µm (Nalgene). El sobrenadante filtrado se cargó en una columna de 3 ml de Ni-NTA (Qiagen) preequilibrada con tris 25 mM, pH 8,5, NaCl 500 mM, imidazol 20 mM, glicerol al 10 % (tampón B). Después de su carga, la columna se lavó con 12 VC de tampón B seguido de 20 VC de tampón B + Triton X-114 al 0,1 %. La columna se lavó de nuevo con 15 VC de tampón B para eliminar el detergente. Las proteínas se eluyeron con tris 25 mM, pH 8,5, NaCl 500 mM, imidazol 250 mM, glicerol al 10 %, CHAPS al 0,25 %. Las fracciones combinadas se purificaron adicionalmente en una Superdex 75 de 120 ml (GE Healthcare) equilibrada con tris 25 mM, pH 8,5, glicerol al 10 %, TCEP 0,5 mM, CHAPS al 0,25 %. Las fracciones correspondientes al pico del trímero de proteasa se combinaron. La pureza de la proteína fue mayor de un 90 % como se evaluó mediante SDS-PAGE.

Ejemplo 3: Determinación de la actividad inhibidora de anticuerpos anti-HtrA1 usando un ensayo de FRET

Síntesis del sustrato peptídico. El péptido H2-Opt (Mca-IRRVSYSF(Dnp)KK) (SEQ ID NO: 12), descrito originalmente como un sustrato para HtrA2 (Martins, L.M., *et al.*, *J Biol Chem.* 278:49417-27 (2003)), se sintetizó en resina Fmoc-Lys(Boc)-wang usando procedimientos de acoplamiento estándar con HBTU. Se incorporó Fmoc-Lys(DNP)-OH (Anaspec) a la posición P5'. El péptido se sintetizó hasta P5 (Mca, 7-metoxi-cumarina, Aldrich) y, entonces, se escindió del soporte sólido usando ácido trifluoroacético, triisopropilsilano y agua durante 2 horas a temperatura ambiente. El péptido se precipitó a partir de éter etílico, se extrajo con ácido acético, acetonitrilo, agua y se liofilizó. El péptido marcado en bruto se disolvió y se purificó en una columna C18 de fase inversa preparativa usando acetonitrilo/agua. Las fracciones purificadas se combinaron, liofilizaron y analizaron mediante cromatografía de líquidos/espectrometría

de masas (Ph/Sciex) y se descubrió que eran consistentes con sus masas calculadas.

Ensayos enzimáticos con sustrato peptídico. Se incubó HtrA1 en placas de fondo óptico de color negro de 96 pocillos (Nalge Nunc Int., Rochester, NY) con IgG94 o Fab94 diluidos en serie en tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 200 mM, CHAPS al 0,25 % (tampón de ensayo) durante 20 min a 37 °C. Para las pruebas iniciales, se incubó un panel de 13 anticuerpos anti-HtrA1 derivados de fago, concentraciones únicas de IgG (concentraciones finales de 0,16 mg/ml-0,28 mg/ml) con HuHtrA1 o HuHtrA1_PD. Se diluyó una solución madre 10 mM del sustrato peptídico Mca-IRRVSYSF(Dnp)KK (SEQ ID NO: 12) (H2-Opt) en DMSO en agua a 12,5 µM, se precalentó a 37 °C y, entonces, se añadió a la mezcla de reacción. Las concentraciones finales de los reactivos fueron: HuHtrA1 o MuHtrA1 5 nM, IgG94 0,005-300 nM, Fab94 0,02-900 nM, H2-Opt 2,5 µM. El incremento de la señal de fluorescencia (excitación a 328 nm, emisión a 393 nm) se midió en un lector de microplacas SPECTRAmax M5 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) y se determinaron las tasas lineales de escisión de H2-Opt (mRFU/min). Se llevaron a cabo experimentos con inhibición por IgG94 de tripsina (Roche) y elastasa (MP Biomedicals) de manera idéntica, excepto en que las concentraciones de enzimas finales fueron de 1 nM, la concentración de IgG94 fue de 300 nM y el tiempo de incubación fue de 15 min.

Como se muestra en la fig. 2, se incubó un panel de 13 anticuerpos (IgG) derivados de fago con HuHtrA1 o HuHtrA1_PD y se midió la actividad enzimática. De los 13 anticuerpos sometidos a prueba, los anticuerpos YW503.57, YW504.57, YW504.61 e YW505.94 (también denominado Fab94, anticuerpo 94, Ab94 o IgG94) inhibieron fuertemente las actividades de tanto HuHtrA1 como de HuHtrA1_PD.

Como se muestra en la fig. 3, IgG94 inhibió la actividad enzimática de HuHtrA1 frente al sustrato H2-Opt de una forma dependiente de la concentración con un valor de CI_{50} de 1,8 nM. La inhibición completa se logró por encima de 30 nM de IgG94. Por el contrario, otros dos miembros de la familia de serina proteasas similares a tripsina, tripsina y elastasa, no se inhibieron por IgG94 a 300 nM, lo que indica que IgG94 tiene especificidad frente a HuHtrA1. Fab94 también inhibió HuHtrA1 de una manera dependiente de la concentración, pero de manera menos potente que IgG94 como se indica mediante el valor de CI_{50} de 29,1 nM. Estos resultados concuerdan de manera excelente con el valor de K_D de 31,1 nM determinado mediante experimentos de resonancia de plasmón superficial (véase la tabla 1 a continuación). Los resultados muestran que IgG94 y Fab94 pueden neutralizar completamente la actividad enzimática de HuHtrA1 frente a un sustrato peptídico sintético pequeño y que esta actividad es específica. Además, el incremento de aproximadamente 16 veces de la potencia de IgG94 frente a Fab94 es consistente con los efectos de avidéz predichos a partir del complejo IgG94:HtrA1 'similar a jaula' basándose en el análisis de masas (véanse, por ejemplo, la tabla 2 y la figura 9).

También se determinaron las potencias inhibitoras de las variantes mejoradas en afinidad del anticuerpo YW505.94a.28 usando el ensayo descrito anteriormente con el sustrato peptídico H2-Opt con extinción de fluorescencia y 1,0 nM de HuHtrA1 o 1,5 nM de HuHtrA1_PD. Los resultados se muestran a continuación.

Formato de YW505.94a.28	HuHtrA1_PD CI_{50} nM	HuHtrA1 CI_{50} nM
IgG	0,229	0,335
Fab	2,03	1,95

Ejemplo 4: Determinación de la actividad inhibitora de anticuerpos anti-HtrA1 usando sustratos macromoleculares

Se volvió a purificar la β -caseína bovina (Sigma-Aldrich) en una columna de intercambio iónico MonoQ para producir material altamente purificado. Se incubó HuHtrA1 en tubos Eppendorf junto con concentraciones crecientes de IgG94 en tampón de ensayo durante 15 min a 37 °C, después de lo cual se añadieron sustratos macromoleculares. Para la digestión con β -caseína, la concentración final de reactivos fue: HuHtrA1 10 nM, 50 µg/ml de β -caseína, IgG94 2,3-150 nM. Para la decorina, las concentraciones finales fueron: HuHtrA1 125 nM, 50 µg/ml de decorina (R & D Systems), IgG94 2-125 nM. Para biglucano, las concentraciones finales fueron: HuHtrA1 75 nM, 50 µg/ml de biglucano (R & D Systems), IgG94 2,3-150 nM. Después de la incubación a 37 °C (2 h para β -caseína, 14 h para decorina, 6 h para biglucano), se añadió tampón de muestra de SDS y las muestras se hirvieron y analizaron mediante SDS-PAGE (no reductora).

Se llevó a cabo la hidrólisis de caseína marcada con tinte fluorescente, BODIPY FL-caseína (Invitrogen), en placas de fondo óptico de color negro de 96 pocillos (Nalge Nunc Int., Rochester, NY). Se incubaron HuHtrA1 o MuHtrA1 con IgG94 diluido en serie en tampón de ensayo durante 15 min a 37 °C. Después de la adición de BODIPY FL en el tampón de ensayo, las concentraciones de reactivos fueron como sigue: HuHtrA1 30 nM, MuHtrA1 30 nM, 5 µg/ml de BODIPY FL, IgG94 0,24-250 nM. El incremento de la señal de fluorescencia (excitación a 484 nm, emisión a 535 nm) se midió en un lector de microplacas SPECTRAmax M5 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) y se determinaron las tasas lineales de escisión de BODIPY FL (mRFU/min) y se expresaron como un porcentaje de tasas no inhibidas (control).

Como se muestra en la fig. 6, HuHtrA1 degrada los sustratos macromoleculares β -caseína, decorina y biglucano (carril 2). En ausencia de HuHtrA1, los sustratos permanecieron inalterados durante el periodo experimental (fig. 6, carril 1). La preincubación de HuHtrA1 con concentraciones crecientes de IgG94 (fig. 6, carril 9-carril 3) dio como resultado una inhibición dependiente de la concentración de la degradación del sustrato. A las concentraciones de IgG94 más altas sometidas a prueba, se previno completamente la degradación de β -caseína, decorina y biglucano (fig. 6, carril 3). Los resultados muestran que IgG94 inhibió potente y eficazmente la actividad de HuHtrA1 frente a tres sustratos macromoleculares.

Como se muestra en la fig. 4, IgG94 inhibió de una manera dependiente de la concentración la hidrólisis de BODIPY FL mediante tanto HuHtrA1 como MuHtrA1 con valores de CI_{50} de 8,3 nM y 5,4 nM, respectivamente. Los resultados muestran que IgG94 reconoce y neutraliza completamente las actividades enzimáticas de tanto HuHtrA1 como de MuHtrA1 frente al sustrato macromolecular BODIPY FL.

Ejemplo 5: Determinación de la especificidad de los anticuerpos anti-Htra1 frente a Htra1

Se evaluó la especificidad de IgG94 midiendo su actividad para inhibir muHtrA1_PD en comparación con su capacidad de inhibir las proteasas relacionadas estructuralmente MuHtrA3_PD y MuHtrA4_PD (véase la fig. 5). Se determinó la especificidad usando el ensayo de FRET como se describe anteriormente en el ejemplo 3, excepto en que las concentraciones de MuHtrA1_PD, MuHtrA3_PD y MuHtrA4_PD fueron de 6 nM, 20 nM y 20 nM, respectivamente, y el intervalo de concentraciones de IgG94 fue de 0,2-400 nM. También se analizó la especificidad usando el sustrato BODIPY FL-caseína como se describe anteriormente en el ejemplo 4, excepto en que la concentración de MuHtrA1_PD, MuHtrA3_PD y MuHtrA4_PD fue de 50 nM y el intervalo de concentraciones de IgG94 fue de 1,4-1000 nM. IgG94 inhibió la escisión de H2-Opt (fig. 5, panel superior) y BODIPY FL (fig. 5, panel inferior) por MuHtrA1_PD, pero no inhibió la escisión de los mismos sustratos por MuHtrA3_PD y MuHtrA4_PD hasta concentraciones de 400 nM y 1000 nM para los sustratos H2-Opt y BODIPY FL, respectivamente. Los resultados sugieren que IgG94 tiene una especificidad excelente y no afecta a las actividades de las proteasas relacionadas.

Ejemplo 6: Determinación de la afinidad del anticuerpo mediante BIAcore

Para determinar la afinidad de unión de Fab94 mediante cinética de un solo ciclo, se usó la medición de resonancia de plasmón superficial (SRP) con un instrumento BIAcore™ T100. En resumen, se activó la matriz CM5 de sensor de la serie S con los reactivos EDC y NHS de acuerdo con las instrucciones del proveedor, y se acopló estreptavidina (Pierce) para lograr aproximadamente 2000 unidades de respuesta (UR), seguido de grupos de bloqueo sin reaccionar con etanolamina 1 M.

Para las mediciones cinéticas, se inyectaron en primer lugar HuHtrA1_PD o MuHtrA1_PD biotinilada a un caudal de 10 μ l/min para capturar aproximadamente 100 UR en 3 cubetas de lectura (CL) diferentes, excepto para CL1 (cubeta de referencia), y, entonces, se inyectaron diluciones en serie de 5 veces de Fab94 (0,48 nM-300 nM) en HEPES 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M, tensioactivo P20 al 0,005 % (caudal: 30 μ l/min) sin regeneración entre inyecciones. Los sensogramas se registraron y evaluaron mediante el programa informático de evaluación de BIAcore™ T100 (versión 2.0) después de restar la señal de la cubeta de referencia. Las tasas de asociación (k_{on}) y las tasas de disociación (k_{off}) se calcularon usando un simple modelo de unión uno a uno de Langmuir. La constante de disociación de equilibrio (K_D) se calculó como la proporción k_{off}/k_{on} (véase la tabla 1 a continuación). La cinética de unión de Fab94 a HuHtrA1_PD y a MuHtrA1_PD fue muy similar. Los valores de K_D fueron 31,1 nM y 28,9 nM, respectivamente.

Tabla 1. Afinidades de unión de Fab94 a HuHtrA1_PD y MuHtrA1_PD mediante resonancia de plasmón superficial.

	k_{on} ($10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	k_{off} (10^4 s^{-1})	K_D (nM)
HuHtrA1_PD	3,5	109,0	31,1
MuHtrA1_PD	4,5	129,0	28,9

Ejemplo 7: Cartografía de epítomos de IgG94 en HuHtrA1_PD

Para identificar el epítipo de unión funcional de IgG94, se generó un panel de mutantes de HuHtrA1_PD con mutaciones de alanina individuales para los experimentos de unión. La mayoría de los residuos mutados se localizan en bucles superficiales circundantes al sitio activo y también incluyen la serina catalítica (S328) y el aspartato (D250). Los mutantes se expresaron en *E. coli* y los trómeros se purificaron mediante cromatografía de exclusión por tamaño como se describe en el ejemplo 2. Se determinó la unión usando un ensayo de ELISA, que se realizó usando una placa de microvaloración MAXISORP™ recubierta con mutantes de HuHtrA1_PD a 2 μ g/ml en PBS durante 1 h, seguido de bloqueo con tampón PBST (BSA al 0,5 % y Tween 20 al 0,05 % en PBS) durante 1 h a temperatura ambiente. Se añadió Ig94 diluido en serie 5 veces (de 50 nM a 0,0006 nM) en tampón PBST y se incubó durante 30 min. Las placas se lavaron con tampón PBT (Tween 20 al 0,05 % en PBS) y se añadió anti-IgG humana de cabra conjugada a HRP (H+L) (Invitrogen) (1:5000 en tampón PBST) y se incubó durante 1 h. Las placas se lavaron con

tampón PBT y se desarrollaron añadiendo sustrato de tetrametilbencidina (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD). La absorbancia a 450 nm se representó como una función de la concentración de anticuerpos en solución para determinar los valores de CE_{50} . Entonces, se cartografió la localización de los mutantes que efectúan la unión en la estructura de HtrA1.

En el ELISA de unión, IgG94 mostró la mayor reducción en la unión a los mutantes de HuHtrA1_PD(N224A) y HuHtrA1_PD(K248A) (véase la fig. 7A). Tras la repetición del experimento usando una concentración más baja de HtrA1 para recubrir las placas (1 µg/ml) y un tiempo de incubación acortado (reducido desde 1 hora a 20 minutos de incubación), IgG94 también mostró al menos una reducción de 5 veces de la unión a los mutantes de HuHtrA1 V201A, H220A, T223A, K225A, K243A y E247A (véase la fig. 7A). Los resultados indican que IgG94 se une a un epítipo que incluye los residuos N224 y K248, que se localizan en el bucle B y bucle C (véanse las figs. 7B y 7C). En serina proteasas similares a tripsina, se sabe que estos bucles son parte de la región determinante de la especificidad que interacciona con sustratos. K248 (bucle C) está muy cerca del D250 catalítico y N224 del H220 catalítico. Por lo tanto, la unión de IgG94 a estos residuos puede afectar al acceso del sustrato a la hendidura catalítica mediante impedimento estérico directo o mediante un mecanismo alostérico indirecto como se descubrió para neutralizar anticuerpos anti-HGFA que también reconocen residuos en el bucle C (Ganesan, R., *et al.*, *Structure* 17:1614-1624 (2009); Wu, Y., *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 104:19784-9 (2007)). De forma alternativa, la unión al anticuerpo puede inhibir la catálisis influyendo directamente en los residuos de la tríada catalítica D250 y/o H220.

Ejemplo 8: Estequiometría de los complejos de HtrA1_PD con Fab94 e IgG94 mediante cromatografía de exclusión por tamaño-dispersión de luz de ángulo múltiple (SEC-MALLS)

Se usó una forma inactiva catalíticamente de HuHtrA1_PD(S328A) para la formación de complejos. Los complejos Fab94:HuHtrA1_PD(S328A) e IgG94:HuHtrA1_PD(S328A) se formaron en tampón tris (tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 200 mM, glicerol al 10 %, CHAPS al 0,25 %). Los complejos y los componentes individuales solos se incubaron a 4 °C durante la noche y, entonces, se inyectaron y resolvieron en una columna S200 Superdex 10/300 GL (GE Healthcare) en tampón tris con un caudal de 0,5 ml/min. Los datos se obtuvieron con un detector de dispersión de luz de 18 ángulos (Dawn Helios II con QELS) y un detector del índice de refracción (Optilab reX) de Wyatt Technologies. El análisis se hizo con el programa informático Astra 5 para producir la masa molar independientemente del tiempo de elución. La normalización se realizó con una IgG de control.

Los experimentos de SEC-MALLS muestran que Fab94 e IgG94 forman complejos con HuHtrA1_PD(S328A), que tienen masas distintas. Las masas determinadas y la estequiometría deducida de los complejos se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Estequiometría de HuHtrA1_PD(S328A) en complejo con Fab94 e IgG94 determinada mediante SEC-MALLS.

Componentes*	Masa mediante MALLS (Da)**	Estequiometría de mejor ajuste ^{&}	Masa esperada (Da)	Diferencia de masa (%)
HtrA1_PD	76.755	--	--	--
Fab94	47.400	--	--	--
IgG94	151.200	--	--	--
Fab94:HtrA1_PD	210.100	3:1	218.955	4,2
IgG94: HtrA1_PD	618.600	3:2	607.110	1,9

* HuHtrA1_PD era HuHtrA1_PD con la serina catalítica mutada a alanina (HuHtrA1_PD(S328A)); la masa representa el trímero

** Promedio de dos experimentos independientes

[&] Proporción de anticuerpo:trímero de proteasa

La masa determinada del complejo Fab94:HtrA1_PD(S328A) de 210.100 Da es consistente con un complejo de 3 Fab que se une a un trímero de HuHtrA1_PD(S328A) (complejo 3:1). La diferencia entre las masas experimentales y teóricas de dicho complejo 3:1 es solo de un 4,2 %. Por lo tanto, un Fab se puede unir a cada monómero de HuHtrA1_PD(S328A) dentro de un homotrímero de HtrA1.

La masa determinada del complejo IgG94:HtrA1_PD(S328A) de 618.600 Da se ajusta bien a una estequiometría 3:2, en la que 3 moléculas de IgG se unen a dos trímeros de HuHtrA1_PD(S328A). La diferencia entre la masa experimental

y teórica de dicho complejo 3:2 es solo de un 1,9 %.

Las estequiometrias explicadas concuerdan con los hallazgos de que Fab94 e IgG94 pueden inhibir completamente la actividad de HtrA1, en tanto que cada monómero dentro de un trímero de HtrA1 se une a un Fab o a un brazo Fab de una IgG. Por tanto, en estos complejos no hay monómero de HtrA1 'libre' disponible, concordando con la inhibición completa de la actividad enzimática de HtrA1 por Fab94 e IgG94. Se propone un modelo de 'jaula' para el complejo IgG94:HtrA1_PD(S328A) en el que los brazos Fab de las 3 IgG unen con puentes dos trímeros, uniéndose cada brazo Fab a un monómero (véase la fig. 9). El modelo también explica la potencia incrementada de aproximadamente 16 veces de IgG94 sobre Fab94 en ensayos enzimáticos (véase, por ejemplo, la fig. 3) en tanto que IgG94 se beneficia fuertemente de los efectos de avididad en su unión a los trímeros de HtrA1_PD.

Ejemplo 9: Maduración de la afinidad de YW505.94

Colecciones de construcciones para la maduración de la afinidad de anti-HtrA1. El clon YW505.94a se derivó de YW505.94 [Ab94] cambiando el residuo de Kabat N28 a serina dentro de H1 de CDR a fin de eliminar un sitio de glucosilación enlazado a N potencial. El fagémido pW0703, derivado del fagémido pV0350-2b (Lee *et al.*, *J Mol. Biol.* **340**, 1073-1093 (2004)), que contiene un codón finalizador (TAA) en todas las posiciones de CDR-L3 y presenta un Fab monovalente en la superficie del bacteriófago M13, sirvió como molde de colección para injertar el dominio variable de la cadena pesada (V_H) del clon YW505.94a para la maduración de la afinidad. Se usaron estrategias de aleatorización tanto completa como parcial para la maduración de la afinidad. Para la aleatorización completa, se aleatorizó una colección de la cadena ligera (L1/L2/L3 completa) con posiciones seleccionadas en tres CDR de la cadena ligera usando aminoácidos diseñados para imitar a un anticuerpo humano natural y la redundancia de ADN diseñada fue como se describe (Lee *et al.*, 2004). Para la aleatorización parcial, se seleccionaron como diana para la aleatorización los residuos seleccionados en las posiciones de Kabat 91, 92, 93, 94 y 96 de CDR-L3, 28-35 de CDR-H1, 50-58 de CDR-H2 y 95-100 de CDR-H3 con dos combinaciones diferentes de bucles CDR, L3/H1 parcial, L3/H2 parcial y L3/H3 parcial. Para lograr las condiciones de aleatorización parcial, que introducen una tasa de mutación de aproximadamente un 50 % en las posiciones seleccionadas, se sintetizó el ADN mutágeno con mezclas 70-10-10-10 de bases que favorecen a los nucleótidos naturales (Gallop *et al.*, *J. of Med. Chem.* **37**, 1233-1251 (1994)).

Estrategia de clasificación de fagos para aislar variantes mejoradas en afinidad. Para la selección de la mejora en afinidad, las colecciones de fagos se sometieron a clasificación de placas para la primera tanda, seguida de cuatro tandas de clasificación de soluciones. Para la primera tanda de clasificación de placas, se clasificaron por separado cuatro colecciones (L1/L2/L3 completa, L3/H1 parcial, L3/H2 parcial y L3/H3 parcial) frente a una placa recubierta con HtrA1 humana (HuHtrA1) (placa Maxisorp de NUNC) con entrada de fagos de aproximadamente 3 DO/ml en BSA al 1 % y Tween 20 al 0,05 % durante 1 hora a temperatura ambiente (TA). Después de la primera tanda de clasificación de placas, se realizaron cuatro tandas de clasificación de soluciones para incrementar la restricción de la selección. Para la clasificación de soluciones, se incubaron 1 DO/ml de fago propagado de la primera tanda de clasificación de placas con 500 nM de HuHtrA1 biotinilada en 100 µl de tampón que contenía Superblock (Pierce biotechnology) al 1 % y Tween20 al 0,05 % durante al menos 1 hora a temperatura ambiente (TA). La mezcla se diluyó adicionalmente 10X con Superblock al 1 % y se aplicó 100 µl/pocillo a pocillos recubiertos con neutravidina (10 µg/ml) durante 15 min a TA con agitación suave para que la HuHtrA1 biotinilada se pudiera unir al fago. Los pocillos se lavaron diez veces con PBS-Tween20 al 0,05 %. Para determinar la unión de fondo, se capturaron pocillos de control que contenían fago sin selección de HuHtrA1 biotinilada en placas recubiertas con neutravidina. El fago unido se eluyó con HCl 0,1 N durante 20 min, se neutralizó mediante 1/10 de volumen de tris 1 M, pH 11, se valoró y se propagó para la siguiente tanda. Luego se llevaron a cabo simultáneamente tres tandas más de clasificación de soluciones usando dos procedimientos de incremento de la restricción de la selección. El primer procedimiento, que es para la selección de tasa de asociación, disminuye la concentración de proteínas diana biotiniladas desde 10 nM a 0,1 nM. El segundo procedimiento, que es para la selección de tasa de disociación, añade cantidades en exceso de proteína HuHtrA1 no biotinilada (100~1000 veces más) para competir frente a los aglutinantes más débiles. Además, se disminuyó la entrada de fagos (0,1~0,5 DO/ml) para reducir la unión a fago de fondo.

ELISA de cribado de afinidades de alto rendimiento (competición en un único punto). Las colonias se recogieron de la quinta tanda de cribado y se cultivaron durante la noche a 37 °C en 350 µl/pocillo de medios 2YT con carbenicilina 50 µg/ml y K07 1e 10/ml en bloque de 96 pocillos (QIAgene). De la misma placa, se escogió una colonia de fago original infectado en XL-1 como control. Se recubrieron placas Maxisorp de Nunc de 96 pocillos con 100 µl/pocillo de proteína HuHtrA1 (2 µg/ml) en PBS a TA durante 2 horas. Las placas se bloquearon con 100 µl de BSA al 0,5 % y Tween al 0,05 % en PBS (tampón PBST) durante una hora.

El sobrenadante de fago se diluyó 1:5 en tampón PBST con o sin HuHtrA1 5 nM en 100 µl de volumen total y se incubó al menos 1 hora a TA. Entonces, se transfirieron 75 µl de mezcla a placas recubiertas con HuHtrA1. La placa se agitó suavemente durante 15 min para permitir la captura del fago no unido a la placa recubierta con HuHtrA1. La placa se lavó cinco veces con Tween20 al 0,05 % en PBS (tampón PBT). La unión se cuantificó añadiendo anticuerpo anti-M13 conjugado a peroxidasa de rábano picante (HRP) en tampón de ELISA (1:5000) y se incubó durante 30 min a TA. Las placas se lavaron cinco veces con tampón PBT. A continuación, se añadieron 100 µl/pocillo de una proporción 1:1 de sustrato de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) para peroxidasa y solución de peroxidasa B (H₂O₂) (Kirkegaard-Perry Laboratories (Gaithersburg, MD)) al pocillo y se incubó durante 5 minutos a TA. La reacción se detuvo añadiendo

100 µl de ácido fosfórico 1 M (H₃PO₄) a cada pocillo y se dejó incubar durante 5 minutos a TA. Se determinó la DO de cada pocillo usando un lector de placas para ELISA estándar a 450 nm. Se calculó la reducción de DO (%) mediante la siguiente ecuación:

$$5 \quad \text{reducción de DO}_{450 \text{ nm}} (\%) = [(DO_{450 \text{ nm}} \text{ de pocillos con competidor}) / (DO_{450 \text{ nm}} \text{ de pocillo sin competidor})] * 100$$

En comparación con la reducción de la DO_{450 nm} (%) del pocillo del fago original (100 %), se escogieron clones que tenían una reducción de DO_{450 nm} (%) más baja que un 50 % para el análisis de secuencias (véanse las figs. 15 y 16). Se seleccionaron clones únicos para la preparación de fagos para determinar la afinidad de unión (Cl₅₀ de fago) mediante ELISA de competición con fago (véanse las figs. 17 y 18). Entonces, se reformatearon los clones más mejorados en afinidad (YW505.94a.28 e YW505.94a.54) a IgG1 humana para la producción de anticuerpos y posterior análisis cinético de unión por BIAcore.

ELISA de competición con fago para determinar la Cl₅₀. Se recubrieron placas de microvaloración MAXISORP™ con HuHtrA1 a 2 µg/ml en PBS durante 2 h a TA y, entonces, se bloquearon con tampón PBST durante otra hora a TA. Se incubó el fago purificado a partir de los sobrenadantes de cultivo con HuHtrA1 o MuHtrA1 diluido en serie en tampón PBST en una placa de microvaloración de cultivo de tejidos durante una hora, después de lo cual se transfirieron 80 µl de la mezcla a los pocillos recubiertos con HuHtrA1 durante 15 minutos para capturar el fago no unido. La placa se lavó con tampón PBT y se añadió anti-M13 conjugado a HRP (Amersham Pharmacia Biotech) (1:5000 en tampón PBST) durante una hora. La placa se lavó con tampón PBT y se desarrolló añadiendo sustrato de tetrametilbencidina (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD). La absorbancia a 450 nm se representó como una función de la concentración de HuHtrA1 o MuHtrA1 en solución para determinar la Cl₅₀ de fago. Esto se usó como una estimación de la afinidad para el clon Lab que se presenta en la superficie del fago. La fig. 17 muestra los resultados de un ensayo de competición con fago que demuestra la unión de variantes mejoradas en afinidad de YW505.94a frente a HuHtrA1. La fig. 18 muestra los resultados de un ensayo de competición con fago que demuestra la unión de variantes mejoradas en afinidad de YW505.94a frente a MuHtrA1.

Determinaciones de la afinidad del anticuerpo mediante BIAcore. Para determinar la afinidad de unión de los anticuerpos frente a HtrA1 mediante cinética de un solo ciclo, se usó la medición de resonancia de plasmón superficial (SRP) con un instrumento BIAcore™ T100. En resumen, se activó una matriz CM5 de sensor de la serie S con los reactivos EDC y NHS de acuerdo con las instrucciones del proveedor, y se acopló estreptavidina (Pierce) para lograr aproximadamente 2000 unidades de respuesta (UR), seguido de grupos de bloqueo sin reaccionar con etanolamina 1 M.

Para las mediciones cinéticas, se inyectó en primer lugar HtrA1 humana o murina biotinilada a un caudal de 10 µl/min para capturar aproximadamente 100 UR en 3 cubetas de lectura (CL) diferentes, excepto para CL1 (referencia), y, entonces, se inyectaron diluciones en serie de 5 veces de Fab anti-HtrA1 en tampón HBS-P (HEPES 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M, tensioactivo P20 al 0,005 %) desde baja (0,48 nM) a alta (300 nM) [5 puntos] (caudal: 30 µl/min) una después de la otra en el mismo ciclo sin regeneración entre inyecciones. El sensograma se registró y se sometió a la resta de la referencia y el tampón antes de la evaluación mediante el programa informático de evaluación de BIAcore™ T100 (versión 2.0). Las tasas de asociación (k_{on}) y las tasas de disociación (k_{off}) se calcularon usando un simple modelo de unión uno a uno de Langmuir. La constante de disociación en equilibrio (K_d) se calculó como la proporción k_{off}/k_{on}. Los resultados se muestran en la tabla 3 a continuación.

Tabla 3. Afinidades de unión de Fab con maduración de la afinidad en comparación con el Fab original.

Fab	HuHtrA1			MuHtrA1		
	k _{on} (M ⁻¹ s ⁻¹)	k _{off} (s ⁻¹)	K _D (nM)	k _{on} (M ⁻¹ s ⁻¹)	k _{off} (s ⁻¹)	K _D (nM)
YW505.94	3,51e5	109e-4	31,1	4,47e5	129e-4	28,9
YW505.94a	8,13e5	4,48e-2	55	1,48e6	8,56e-2	58
YW505.94a.28	1,69e6	5,74e-3	3,4	2,02e6	9,3e-3	4,6
YW505.94a.54	2,97e6	7,84e-3	2,6	2,82e6	4,55e-3	1,6

Ejemplo 10: Preservación de fotorreceptores, capa nuclear externa (CNE) y respuestas funcionales en ausencia de HtrA1 después de la exposición a la luz constante

Construcción de ratón con genes inactivados de HtrA1. Para generar células madre embrionarias de HtrA1(+/-), el ADN del vector de selección de dianas linealizado se insertó por electroporación en embriocitoblastos de fondo Balb/c para introducir sitios Flox en la región 5' del exón 1 y 3' del exón 1 y un gen de resistencia a neomicina introducido (Neo). Se seleccionaron clones de embriocitoblastos resistentes a neomicina y se escindió el exón 1 más el casete de

neomicina mediante electroporación de los embriocitoblastos con un plásmido de expresión que expresaba cre recombinasa. La recombinación homóloga se confirmó mediante la secuenciación del locus de HtrA1 completo y la región promotora en dirección 5' en el embriocitoblasto seleccionado como diana. Los clones seleccionados como diana se inyectaron en blastocistos C57BL/6 para generar ratones quiméricos machos de transmisión en estirpe germinal. El entrecruzamiento de ratones +/- hembra y +/- macho se realizó para generar ratones con HtrA1 +/- hembra o +/- macho en un fondo Balb/c. La delección con éxito de HtrA1 se confirmó mediante RT-PCR de ovarios de ratones con HtrA1 wt y ko.

Modelo de exposición a la luz constante. Los ratones macho con HtrA1 wt/wt o ko/ko en Balb/c, de 8-13 semanas de edad, están en un alojamiento normal (<100 lux en la jaula) hasta el inicio de la exposición a la luz constante (ELC). Para iniciar la ELC, los ratones se alojan individualmente en jaulas normales cubiertas solo con una rejilla de alambre, sin un filtro superior. Los granos de alimento e hidrogeles se disponen en la parte inferior de la jaula, y no en la parte superior con alambre, para la nutrición, a fin de no impedir que la luz penetre en la jaula. Se disponen diez jaulas en una rejilla Metro equipada con luces fluorescentes y encerrada en paneles blancos para suministrar ~1200 lux a los ratones durante hasta 14 días. Las jaulas se giran diariamente en sentido antihorario alrededor de la rejilla durante la ELC para garantizar la misma exposición a la luz. Si se usan múltiples estantes, las jaulas también se giran entre estantes para garantizar la misma exposición a la luz.

Tomografía de coherencia óptica. La tomografía de coherencia óptica (TCO) se realiza 4-7 días antes de la exposición a la luz para proporcionar una medición en el punto de referencia del grosor de la retina. La TCO se realiza usando una cámara Spectralis HRA+OCT de Heidelberg. Los animales se anestesian con 70-80 mg/kg de cetamina/15 mg/kg de xilacina en 150-300 ul de solución salina estéril, los ojos se dilatan con gotas de tropicamida al 1 % y se mide el grosor de la retina mediante TCO. Se usan lágrimas artificiales para mantener los ojos húmedos para prevenir las cataratas. Después de la TCO, se deja que los animales se recuperen de la anestesia y regresen a sus jaulas y rejilla iluminada.

Electrorretinograma. Se realizan electroretinogramas (ERG) 7 días antes de la exposición a la luz y a los 15 días tras la ELC. Los ERG se realizan y registran usando un sistema de electrofisiología visual Diagnosys LLC Espion 2 y un Colordome de escritorio Ganzfeld como fuente de luz. Los ratones se adaptan a la oscuridad durante la noche en una habitación oscura para equilibrar los fotorreceptores. Una vez que están adaptados a la oscuridad, todos los procedimientos posteriores se realizan en la oscuridad con solo una luz roja para la iluminación. Los animales se anestesian con cetamina, 75-80 mg/kg y xilacina, 7,5-15 mg/kg, IP en 200-300 ul de PBS. La temperatura corporal del ratón se mantiene a 37 °C usando una placa homeotérmica conectada a su unidad de control. Las pupilas se dilatan con tropicamida al 1 %. Los ERG de ambos ojos se registrarán simultáneamente con electrodos Burian-Allen de bucle de alambre de plata o platino. Los ratones se disponen en una plataforma, un electrodo de referencia se inserta por vía subcutánea a través de la frente, y un electrodo de tierra se inserta por vía subcutánea en la base de la cola. Se dispone solución de hipermelosa de Gonak en la córnea para establecer un contacto eléctrico entre la córnea y el electrodo y proteger a los ojos del secado durante el experimento. Los electrodos se disponen en los ojos izquierdo y derecho y el ratón se inserta en un estimulador de luz ColorDome. Los ojos se estimularán con luz blanca (7 intensidades de destello 4e-5, 2e-5, 0,5, 2, 5, 10, 20 cd.s/m²) y las señales se filtrarán con paso de banda a 0,15-1000 Hz y se tomarán muestras a 2 kHz.

Determinación de los niveles de ARNm de HtrA en la retina y ovario de ratón. Se enuclearon los ojos enteros, se eliminó la retina y se dispuso en tampón RLT (Qiagen) y se congeló a -80 °C hasta su homogeneización. Las retinas se homogeneizaron y trituraron mediante tubos gentleMACS M (Miltenyi Biotec). De manera similar a la retina, se aislaron los ovarios de ratones hembra wt, het y ko con HtrA1 y se homogeneizaron como se describe para la retina. Se aisló ARN usando el kit Plus RNeasy de Qiagen; se generó ADNc con un kit de High Capacity cDNA (Applied Biosystem); se realizó Taqman qPCR usando 20 ug de ADNc, Taqman Gene Expression Master Mix (Applied Biosystem), y cebadores de Taqman Gene Expression Assay (Applied Biosystem) para el exón 1-2 (retina y ovario), exón 3-4 (ovario) y exón 5-6 (ovario) y se efectuó en un sistema de PCR en tiempo real ABI 7500 (Applied Biosystem). La expresión de HtrA se normalizó a la expresión de 18s (cebador de Applied Biosystem).

Como se muestra en la fig. 11, la expresión de ARNm de HtrA1 se incrementa en un modelo murino de exposición a la luz constante. Sin embargo, en el mismo modelo, los niveles de HtrA2 no se incrementan en la retina. Además, los niveles de HtrA1 son significativamente más altos que los niveles de HtrA2, HtrA3 y HtrA4 en la retina de un ratón no expuesto.

Además, se descubrió que los ratones que carecían de la expresión de HtrA1 muestran una preservación de los fotorreceptores (fig. 13), la capa nuclear externa (CNE) (fig. 14) y respuestas funcionales (ERG) (fig. 12) en un modelo murino de degeneración inducida por la luz.

Ejemplo 11: Efectos de un anticuerpo anti-HtrA1 en un modelo de rata de exposición a la luz constante

Las ratas se someterán a una exposición a la luz constante como se describe anteriormente para los ratones. Se evaluará la eficacia de un anticuerpo anti-HtrA1 para proteger al ojo de la rata de la degeneración provocada por la exposición a la luz. Los ojos de la rata se someterán a inyecciones intravítreas de un anticuerpo anti-HtrA1 a una dosis

y frecuencia adecuadas para mantener una concentración eficaz del anticuerpo anti-HtrA1 en el ojo durante el transcurso del experimento. Los ojos de la rata se supervisarán después de la exposición a la luz para determinar el grosor de la retina mediante TCO y la funcionalidad mediante ERG, como se describe anteriormente para el modelo murino.

5

Ejemplo 12: La expresión de HtrA1 es abundante en el humor vítreo de rata y se acumula en el líquido ocular y tejido ocular de ratón tras la agresión por la luz

10 *Ensayo de ELISA.* Para el análisis de los tejidos de rata, se diluyó un anticuerpo policlonal anti-muHtrA1 de conejo (Genentech) a 125 ng/ml, mientras que para el análisis del líquido ocular y el tejido de retina de ratón, se diluyó un anticuerpo monoclonal anti-huHtrA1 de ratón (Genentech) a 250 ng/ml, ambos en PBS, y se recubrieron sobre placas de ELISA de 384 pocillos (Nunc; Neptune, NJ) durante una incubación durante la noche a 4 °C. Las placas se lavaron con PBS más Tween-20 al 0,05 % y se bloquearon durante una incubación de dos horas con PBS más seroalbúmina bovina al 0,5 % (BSA). Esta y todas las incubaciones posteriores se realizaron a temperatura ambiente con agitación suave. Se diluyeron el patrón de HtrA1 murina recombinante (Genentech) y muestras de tejidos murinos o de rata en 15 tampón de dilución de muestra/patrón (PBS, BSA al 0,5 %, 15 ppm de Proclin, Tween 20 al 0,05 %, CHAPS al 0,25 %, BgG al 0,2 %, EDTA 5 mM, NaCl al 0,35 M, (pH 7,4)), se añadieron a las placas lavadas y se incubaron durante 1,5-2 horas. Se detectó HtrA1 unida a placa durante una incubación de 1 hora con un anticuerpo policlonal anti-muHtrA1 de conejo biotinilado (Genentech) diluido a 100 ng/ml para tejidos de rata, y para el líquido ocular y el tejido de retina 20 de ratón, se diluyó el anticuerpo monoclonal anti-huHtrA1 de ratón biotinilado (Genentech) a 200 ng/ml, ambos en tampón de ensayo (PBS, BSA al 0,5 %, 15 ppm de Proclin, Tween 20 al 0,05 %), seguido de una etapa de lavado y una incubación de 30 minutos con estreptavidina-HRP (GE Healthcare; Piscataway, NJ), también diluidas en tampón de ensayo (1:20.000). Después de un lavado final, se añadió tetrametilbencidina (KPL, Gaithersburg, MD), se desarrolló el color durante 10-15 minutos y la reacción se detuvo con ácido fosfórico 1 M. Las placas se leyeron a 25 450 nm con una referencia de 620 nm usando un lector de microplacas. Las concentraciones de HtrA1 de rata o murina se calcularon a partir de un ajuste de cuatro parámetros de la curva patrón de muHtrA1.

Como se muestra en la fig. 19A, la expresión de HtrA1 fue baja en el ovario, cerebro, bazo y tejido ocular total de rata en comparación con los niveles de expresión de HtrA1 en el humor vítreo de rata. Como se muestra en la fig. 19B, el 30 nivel de HtrA1 en el líquido ocular de ratón se incrementó en un modelo de exposición a la luz constante en comparación con un control. Como se muestra en la fig. 19C, el nivel de HtrA1 en el tejido de retina de ratón se incrementó en un modelo de exposición a la luz constante en comparación con un control.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> GENENTECH, INC. *ET AL.*

5 <120> ANTICUERPOS ANTI-HTRA1 Y PROCEDIMIENTOS DE USO

<130> P4761R1-WO

10 <140>
<141>

<150> 61/547.649
<151> 14-10-2011

15 <160> 90

<170> PatentIn versión 3.5

20 <210> 1
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
25 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 1
Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
1 5 10

30 <210> 2
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 2
Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
1 5

40 <210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 3
Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr
1 5

50 <210> 4
<211> 10
<212> PRT
55 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

60 <400> 4

Gly Phe Asn Ile Ser Gly Tyr Tyr Ile His
1 5 10

<210> 5
<211> 17
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

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

Gly

15 <210> 6
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
20 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 6
Gly Thr Phe Leu Thr Ser Trp Gly His Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

25 <210> 7
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 7
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

ES 2 687 951 T3

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

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

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

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

<210> 8
<211> 116
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 8
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Thr Phe Leu Thr Ser Trp Gly His Tyr Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr
115

<210> 9
15 <211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 9

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

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

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

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

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

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

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

5

<210> 10

<211> 107

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

15 <400> 10

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105

<210> 11
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 11
Met Lys His Gln His Gln His Gln His Gln His Gln His Gln Met His
1 5 10 15

Gln Ser Thr Ala Ala
20

<210> 12
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<220>
<223> Mca N term

<220>
<221> MOD_RES

<222> (9)..(9)
<223> Lys (DNP)

<400> 12
Ile Arg Arg Val Ser Tyr Ser Phe Lys Lys
1 5 10

<210> 13
<211> 480
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13
Met Gln Ile Pro Arg Ala Ala Leu Leu Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15

Ala Ala Pro Ala Ser Ala Gln Leu Ser Arg Ala Gly Arg Ser Ala Pro
20 25 30

Leu Ala Ala Gly Cys Pro Asp Arg Cys Glu Pro Ala Arg Cys Pro Pro
 35 40 45

Gln Pro Glu His Cys Glu Gly Gly Arg Ala Arg Asp Ala Cys Gly Cys
 50 55 60

Cys Glu Val Cys Gly Ala Pro Glu Gly Ala Ala Cys Gly Leu Gln Glu
 65 70 75 80

Gly Pro Cys Gly Glu Gly Leu Gln Cys Val Val Pro Phe Gly Val Pro
 85 90 95

Ala Ser Ala Thr Val Arg Arg Arg Ala Gln Ala Gly Leu Cys Val Cys
 100 105 110

Ala Ser Ser Glu Pro Val Cys Gly Ser Asp Ala Asn Thr Tyr Ala Asn
 115 120 125

Leu Cys Gln Leu Arg Ala Ala Ser Arg Arg Ser Glu Arg Leu His Arg
 130 135 140

Pro Pro Val Ile Val Leu Gln Arg Gly Ala Cys Gly Gln Gly Gln Glu
 145 150 155 160

Asp Pro Asn Ser Leu Arg His Lys Tyr Asn Phe Ile Ala Asp Val Val
 165 170 175

Glu Lys Ile Ala Pro Ala Val Val His Ile Glu Leu Phe Arg Lys Leu
 180 185 190

Pro Phe Ser Lys Arg Glu Val Pro Val Ala Ser Gly Ser Gly Phe Ile
 195 200 205

Val Ser Glu Asp Gly Leu Ile Val Thr Asn Ala His Val Val Thr Asn
 210 215 220

Lys His Arg Val Lys Val Glu Leu Lys Asn Gly Ala Thr Tyr Glu Ala
 225 230 235 240

Lys Ile Lys Asp Val Asp Glu Lys Ala Asp Ile Ala Leu Ile Lys Ile
 245 250 255

Asp His Gln Gly Lys Leu Pro Val Leu Leu Leu Gly Arg Ser Ser Glu
 260 265 270

Leu Arg Pro Gly Glu Phe Val Val Ala Ile Gly Ser Pro Phe Ser Leu

275		280		285											
Gln	Asn	Thr	Val	Thr	Thr	Gly	Ile	Val	Ser	Thr	Thr	Gln	Arg	Gly	Gly
	290					295					300				
Lys	Glu	Leu	Gly	Leu	Arg	Asn	Ser	Asp	Met	Asp	Tyr	Ile	Gln	Thr	Asp
305					310					315					320
Ala	Ile	Ile	Asn	Tyr	Gly	Asn	Ser	Gly	Gly	Pro	Leu	Val	Asn	Leu	Asp
			325						330					335	
Gly	Glu	Val	Ile	Gly	Ile	Asn	Thr	Leu	Lys	Val	Thr	Ala	Gly	Ile	Ser
			340					345					350		
Phe	Ala	Ile	Pro	Ser	Asp	Lys	Ile	Lys	Lys	Phe	Leu	Thr	Glu	Ser	His
	355						360					365			
Asp	Arg	Gln	Ala	Lys	Gly	Lys	Ala	Ile	Thr	Lys	Lys	Lys	Tyr	Ile	Gly
	370					375					380				
Ile	Arg	Met	Met	Ser	Leu	Thr	Ser	Ser	Lys	Ala	Lys	Glu	Leu	Lys	Asp
385					390					395					400
Arg	His	Arg	Asp	Phe	Pro	Asp	Val	Ile	Ser	Gly	Ala	Tyr	Ile	Ile	Glu
			405						410					415	
Val	Ile	Pro	Asp	Thr	Pro	Ala	Glu	Ala	Gly	Gly	Leu	Lys	Glu	Asn	Asp
			420					425					430		
Val	Ile	Ile	Ser	Ile	Asn	Gly	Gln	Ser	Val	Val	Ser	Ala	Asn	Asp	Val
	435						440					445			
Ser	Asp	Val	Ile	Lys	Arg	Glu	Ser	Thr	Leu	Asn	Met	Val	Val	Arg	Arg
	450					455					460				
Gly	Asn	Glu	Asp	Ile	Met	Ile	Thr	Val	Ile	Pro	Glu	Glu	Ile	Asp	Pro
465					470					475					480

<210> 14
 <211> 480
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 14

Met Gln Ser Leu Arg Thr Thr Leu Leu Ser Leu Leu Leu Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 Ala Ala Pro Ser Leu Ala Leu Pro Ser Gly Thr Gly Arg Ser Ala Pro
 20 25 30
 Ala Ala Thr Val Cys Pro Glu His Cys Asp Pro Thr Arg Cys Ala Pro
 35 40 45
 Pro Pro Thr Asp Cys Glu Gly Gly Arg Val Arg Asp Ala Cys Gly Cys
 50 55 60
 Cys Glu Val Cys Gly Ala Leu Glu Gly Ala Ala Cys Gly Leu Gln Glu
 65 70 75 80
 Gly Pro Cys Gly Glu Gly Leu Gln Cys Val Val Pro Phe Gly Val Pro
 85 90 95
 Ala Ser Ala Thr Val Arg Arg Arg Ala Gln Ala Gly Leu Cys Val Cys
 100 105 110
 Ala Ser Ser Glu Pro Val Cys Gly Ser Asp Ala Lys Thr Tyr Thr Asn
 115 120 125
 Leu Cys Gln Leu Arg Ala Ala Ser Arg Arg Ser Glu Lys Leu Arg Gln
 130 135 140
 Pro Pro Val Ile Val Leu Gln Arg Gly Ala Cys Gly Gln Gly Gln Glu
 145 150 155 160
 Asp Pro Asn Ser Leu Arg His Lys Tyr Asn Phe Ile Ala Asp Val Val
 165 170 175
 Glu Lys Ile Ala Pro Ala Val Val His Ile Glu Leu Tyr Arg Lys Leu
 180 185 190
 Pro Phe Ser Lys Arg Glu Val Pro Val Ala Ser Gly Ser Gly Phe Ile
 195 200 205
 Val Ser Glu Asp Gly Leu Ile Val Thr Asn Ala His Val Val Thr Asn
 210 215 220
 Lys Asn Arg Val Lys Val Glu Leu Lys Asn Gly Ala Thr Tyr Glu Ala
 225 230 235 240

ES 2 687 951 T3

Lys Ile Lys Asp Val Asp Glu Lys Ala Asp Ile Ala Leu Ile Lys Ile
245 250 255

Asp His Gln Gly Lys Leu Pro Val Leu Leu Leu Gly Arg Ser Ser Glu
260 265 270

Leu Arg Pro Gly Glu Phe Val Val Ala Ile Gly Ser Pro Phe Ser Leu
275 280 285

Gln Asn Thr Val Thr Thr Gly Ile Val Ser Thr Thr Gln Arg Gly Gly
290 295 300

Lys Glu Leu Gly Leu Arg Asn Ser Asp Met Asp Tyr Ile Gln Thr Asp
305 310 315 320

Ala Ile Ile Asn Tyr Gly Asn Ser Gly Gly Pro Leu Val Asn Leu Asp
325 330 335

Gly Glu Val Ile Gly Ile Asn Thr Leu Lys Val Thr Ala Gly Ile Ser
340 345 350

Phe Ala Ile Pro Ser Asp Lys Ile Lys Lys Phe Leu Thr Glu Ser His
355 360 365

Asp Arg Gln Ala Lys Gly Lys Ala Val Thr Lys Lys Lys Tyr Ile Gly
370 375 380

Ile Arg Met Met Ser Leu Thr Ser Ser Lys Ala Lys Glu Leu Lys Asp
385 390 395 400

Arg His Arg Asp Phe Pro Asp Val Leu Ser Gly Ala Tyr Ile Ile Glu
405 410 415

Val Ile Pro Asp Thr Pro Ala Glu Ala Gly Gly Leu Lys Glu Asn Asp
420 425 430

Val Ile Ile Ser Ile Asn Gly Gln Ser Val Val Thr Ala Asn Asp Val
435 440 445

Ser Asp Val Ile Lys Lys Glu Asn Thr Leu Asn Met Val Val Arg Arg
450 455 460

Gly Asn Glu Asp Ile Val Ile Thr Val Ile Pro Glu Glu Ile Asp Pro
465 470 475 480

<210> 15
 <211> 459
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5

<400> 15
 Met Gln Ala Arg Ala Leu Leu Pro Ala Thr Leu Ala Ile Leu Ala Thr
 1 5 10 15
 Leu Ala Val Leu Ala Leu Ala Arg Glu Pro Pro Ala Ala Pro Cys Pro
 20 25 30
 Ala Arg Cys Asp Val Ser Arg Cys Pro Ser Pro Arg Cys Pro Gly Gly
 35 40 45
 Tyr Val Pro Asp Leu Cys Asn Cys Cys Leu Val Cys Ala Ala Ser Glu
 50 55 60
 Gly Glu Pro Cys Gly Arg Pro Leu Asp Ser Pro Cys Gly Asp Ser Leu
 65 70 75 80
 Glu Cys Val Arg Gly Val Cys Arg Cys Arg Trp Thr His Thr Val Cys
 85 90 95
 Gly Thr Asp Gly His Thr Tyr Ala Asp Val Cys Ala Leu Gln Ala Ala
 100 105 110
 Ser Arg Arg Ala Leu Gln Val Ser Gly Thr Pro Val Arg Gln Leu Gln
 115 120 125
 Lys Gly Ala Cys Pro Ser Gly Leu His Gln Leu Thr Ser Pro Arg Tyr
 130 135 140
 Lys Phe Asn Phe Ile Ala Asp Val Val Glu Lys Ile Ala Pro Ala Val
 145 150 155 160
 Val His Ile Glu Leu Phe Leu Arg His Pro Leu Phe Gly Arg Asn Val
 165 170 175
 Pro Leu Ser Ser Gly Ser Gly Phe Ile Met Ser Glu Ala Gly Leu Ile
 180 185 190
 Val Thr Asn Ala His Val Val Ser Ser Ser Ser Thr Ala Ser Gly Arg
 195 200 205
 Gln Gln Leu Lys Val Gln Leu Gln Asn Gly Asp Ala Tyr Glu Ala Thr
 210 215 220

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

<210> 16
 <211> 483
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5

<400> 16
 Met Ser Phe Gln Arg Leu Trp Ala Val Arg Thr Gln Phe Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 Trp Leu Leu Leu Pro Ala Val Pro Val Pro Trp Ala Glu Ala Arg Arg
 20 25 30
 Ser Arg Val Ser Leu Pro Cys Pro Asp Ala Cys Asp Pro Thr Arg Cys
 35 40 45
 Pro Thr Leu Pro Thr Cys Ser Ala Gly Leu Ala Pro Val Pro Asp Arg
 50 55 60
 Cys Gly Cys Cys Arg Val Cys Ala Ala Ala Glu Gly Gln Glu Cys Gly
 65 70 75 80
 Gly Ala Arg Gly Arg Pro Cys Ala Pro Arg Leu Arg Cys Gly Ala Pro
 85 90 95
 Phe Ser Arg Asp Pro Ser Gly Gly Ala Trp Leu Gly Thr Cys Gly Cys
 100 105 110
 Ala Glu Gly Ala Glu Asp Ala Val Val Cys Gly Ser Asp Gly Arg Thr
 115 120 125
 Tyr Pro Ser Leu Cys Ala Leu Arg Lys Glu Asn Arg Ala Ala Arg Gln
 130 135 140
 Arg Gly Ala Leu Pro Ala Val Pro Val Gln Lys Gly Ala Cys Glu Glu
 145 150 155 160
 Ala Gly Thr Thr Arg Ala Gly Arg Leu Arg Arg Lys Tyr Asn Phe Ile
 165 170 175
 Ala Ala Val Val Glu Lys Val Ala Pro Ser Val Val His Leu Gln Leu
 180 185 190
 Phe Arg Arg Ser Pro Leu Thr Asn Gln Glu Ile Pro Ser Ser Ser Gly
 195 200 205
 Ser Gly Phe Ile Val Ser Glu Asp Gly Leu Ile Val Thr Asn Ala His
 210 215 220

Val Leu Thr Asn Gln Gln Lys Ile Gln Val Glu Leu Gln Ser Gly Ala
 225 230 235 240

Arg Tyr Glu Ala Thr Val Lys Asp Ile Asp His Lys Leu Asp Leu Ala
 245 250 255

Leu Ile Lys Ile Glu Pro Asp Thr Glu Leu Pro Val Leu Leu Leu Gly
 260 265 270

Arg Ser Ser Asp Leu Arg Ala Gly Glu Phe Val Val Ala Leu Gly Ser
 275 280 285

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

Gln Arg Gly Gly Arg Glu Leu Gly Leu Lys Asn Ser Asp Ile Asp Tyr
 305 310 315 320

Ile Gln Thr Asp Ala Ile Ile Asn His Gly Asn Ser Gly Gly Pro Leu
 325 330 335

Val Asn Leu Asp Gly Asp Val Ile Gly Ile Asn Thr Leu Lys Val Thr
 340 345 350

Ala Gly Ile Ser Phe Ala Ile Pro Ser Asp Arg Ile Arg Gln Phe Leu
 355 360 365

Glu Asp Tyr His Glu Arg Gln Leu Lys Gly Lys Ala Pro Leu Gln Lys
 370 375 380

Lys Tyr Leu Gly Leu Arg Met Leu Pro Leu Thr Leu Asn Leu Leu Gln
 385 390 395 400

Glu Met Lys Arg Gln Asp Pro Glu Phe Pro Asp Val Ser Ser Gly Val
 405 410 415

Phe Val Tyr Glu Val Ile Gln Gly Ser Ala Ala Ala Ser Ser Gly Leu
 420 425 430

Arg Asp His Asp Val Ile Val Ser Ile Asn Gly Gln Pro Val Thr Thr
 435 440 445

Thr Thr Asp Val Ile Glu Ala Val Lys Asp Asn Asp Phe Leu Ser Ile
 450 455 460

Ile Val Leu Arg Gly Ser Gln Thr Leu Phe Leu Thr Val Thr Pro Glu
465 470 475 480

Ile Ile Asn

- 5 <210> 17
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 10 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
- <400> 17
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
1 5 10
- 15 <210> 18
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 20 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
- <400> 18
Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn Thr Tyr Leu Ala
1 5 10
- 25 <210> 19
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 30 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
- <400> 19
Gln Gln Ser Asp Asp Thr Pro Pro Thr
1 5
- 35 <210> 20
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 40 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
- <400> 20
Gly Phe Ser Ile Ser Gly Tyr Tyr Ile His
1 5 10
- 45 <210> 21
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 50 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 21
Arg Ala Ser Gln Val Val Gly Asn Tyr Leu Ala
1 5 10

5 <210> 22
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 22
Gln Gln Ser Asp Asp His Pro Pro Thr
1 5

15 <210> 23
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido consenso sintético

25 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> Asp, Ser o Val

30 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> Val o Ile

35 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> Ser, Asn o Gly

40 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> Thr o Asn

45 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (9)..(9)
 <223> Ala o Tyr

50 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10)..(10)
 <223> Val o Leu

<400> 23
Arg Ala Ser Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ala
1 5 10

55 <210> 24
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido consenso sintético

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 5 <223> Ser, Val o Asp

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 10 <223> Tyr, Asp o Ser

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 15 <223> Thr, Ser, Ala, Asp o Asn

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 20 <223> Thr, His, Asn, Ser, Ala, Leu o Arg

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 25 <223> Pro, Thr, Ala o Ser

<400> 24
 Gln Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Thr
 1 5

30 <210> 25
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido consenso sintético

<220>
 <221> MOD_RES
 40 <222> (3)..(3)
 <223> Asn, Ser o Thr

<220>
 <221> MOD_RES
 45 <222> (5)..(5)
 <223> Ser, Asp, Tyr o Ala

<220>
 <221> MOD_RES
 50 <222> (6)..(6)
 <223> Gly o Asp

<400> 25
 Gly Phe Xaa Ile Xaa Xaa Tyr Tyr Ile His
 1 5 10

55 <210> 26
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido consenso sintético

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10)..(10)
 <223> Asn o Asp

5

<400> 26
 Trp Ile Asp Pro Tyr Gly Gly Asp Thr Xaa Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

<210> 27
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido consenso sintético

15

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> Ser o Thr

20

<400> 27
 Gly Thr Phe Leu Thr Xaa Trp Gly His Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

25

<210> 28
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 28
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

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

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

35

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

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

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

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

<210> 29

<211> 116
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 29
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Ile Ser Gly Tyr
 20 25 30
 Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asp Pro Tyr Gly Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Thr Phe Leu Thr Ser Trp Gly His Tyr Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr
 115

10 <210> 30
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético
 <400> 30

ES 2 687 951 T3

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

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

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

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

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

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

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

<210> 31

<211> 108

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido consenso sintético

<220>

<221> MOD_RES

<222> (28)..(28)

15 <223> Asp, Ser o Val

<220>

<221> MOD_RES

<222> (29)..(29)

20 <223> Val o Ile

<220>

<221> MOD_RES

<222> (30)..(30)

25 <223> Ser, Asn o Gly

<220>

<221> MOD_RES

<222> (31)..(31)

30 <223> Thr o Asn

<220>

<221> MOD_RES

<222> (32)..(32)

35 <223> Ala o Tyr

<220>

<221> MOD_RES

<222> (33)..(33)

<223> Val o Leu

<220>
 <221> MOD_RES
 5 <222> (91)..(91)
 <223> Ser, Val o Asp

<220>
 <221> MOD_RES
 10 <222> (92)..(92)
 <223> Tyr, Asp o Ser

<220>
 <221> MOD_RES
 15 <222> (93)..(93)
 <223> Thr, Ser, Ala, Asp o Asn

<220>
 <221> MOD_RES
 20 <222> (94)..(94)
 <223> Thr, His, Asn, Ser, Ala, Leu o Arg

<220>
 <221> MOD_RES
 25 <222> (96)..(96)
 <223> Pro, Thr, Ala o Ser

<400> 31
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa
 85 90 95

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

30

<210> 32
 <211> 116
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido consenso sintético

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (28)..(28)
 <223> Asn, Ser o Thr
 5
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (30)..(30)
 <223> Ser, Asp, Tyr o Ala
 10
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (31)..(31)
 <223> Gly o Asp
 15
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (59)..(59)
 <223> Asn o Asp
 20
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (104)..(104)
 <223> Ser o Thr
 25
 <400> 32
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Xaa Ile Xaa Xaa Tyr
 20 25 30
 Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asp Pro Tyr Gly Gly Asp Thr Xaa Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Thr Phe Leu Thr Xaa Trp Gly His Tyr Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr
 115
 30
 <210> 33
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 33
Arg Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Tyr Leu Ala
1 5 10

5
 <210> 34
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 34
Gln Gln Val Tyr Ser His Pro Pro Thr
1 5

15
 <210> 35
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 35
Gln Gln Ser Tyr Thr Asn Pro Pro Thr
1 5

25
 <210> 36
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

35
 <400> 36
Gln Gln Ser Tyr Ala Thr Pro Thr Thr
1 5

40
 <210> 37
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 37
Gln Gln Ser Tyr Ser Ser Pro Ala Thr
1 5

50
 <210> 38
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 38
Gln Gln Val Tyr Thr Thr Pro Pro Thr
1 5

5 <210> 39
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 10 <400> 39
 Gln Gln Val Tyr Thr Thr Pro Pro Thr
 1 5

 15 <210> 40
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 20 <400> 40
 Gln Gln Val Tyr Ala Thr Pro Ser Thr
 1 5

 25 <210> 41
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 30 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 41
 Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Ala Thr
 1 5

 35 <210> 42
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 40 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 42
 Gln Gln Ser Tyr Thr Ala Pro Thr Thr
 1 5

 45 <210> 43
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 50 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 43
 Gln Gln Asp Ser Thr Leu Pro Pro Thr
 1 5

 55 <210> 44
 <211> 9
 <212> PRT
 60 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

5 <400> 44
Gln Gln Ser Asp Ala Ala Pro Pro Thr
 1 5

<210> 45
 <211> 9
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

15 <400> 45
Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro Thr
 1 5

<210> 46
 <211> 9
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

25 <400> 46
Gln Gln Ser Tyr Thr Arg Pro Pro Thr
 1 5

<210> 47
 <211> 10
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

35 <400> 47
Gly Phe Ser Ile Ser Asp Tyr Tyr Ile His
 1 5 10

40 <210> 48
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 48
Gly Phe Ser Ile Asp Gly Tyr Tyr Ile His
 50 1 5 10

<210> 49
 <211> 10
 <212> PRT
 55 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 49
Gly Phe Thr Ile Tyr Asp Tyr Tyr Ile His
 1 5 10

5 <210> 50
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 50
Gly Phe Ser Ile Ala Gly Tyr Tyr Ile His
 1 5 10

15 <210> 51
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 51
Gly Phe Thr Ile Ser Asp Tyr Tyr Ile His
 1 5 10

25 <210> 52
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 52
Trp Ile Asp Pro Tyr Gly Gly Asp Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

35 **Gly**

<210> 53
 <211> 13
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

45 <400> 53
Gly Thr Phe Leu Thr Thr Trp Gly His Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 54
 <211> 6
 50 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

55

<400> 54
Asp Val Ser Thr Ala Val
 1 5

5 <210> 55
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 55
Ser Ile Asn Thr Tyr Leu
 1 5

15 <210> 56
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 56
Asp Val Gly Thr Tyr Leu
 1 5

25 <210> 57
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 57
Val Val Gly Asn Tyr Leu
 1 5

35 <210> 58
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

45 <400> 58
Ser Ala Ser Phe Leu Tyr
 1 5

<210> 59
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

55 <400> 59
Ser Tyr Thr Thr Pro Pro
 1 5

5
 <210> 60
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 60
Val Tyr Ser His Pro Pro
 1 5

10
 <210> 61
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

20
 <400> 61
Ser Tyr Thr Asn Pro Pro
 1 5

25
 <210> 62
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 62
Ser Tyr Ala Thr Pro Thr
 1 5

35
 <210> 63
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 63
Ser Asp Asp Thr Pro Pro
 1 5

45
 <210> 64
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 64
Ser Tyr Ser Ser Pro Ala
 1 5

55
 <210> 65
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

5 <400> 65
Val Tyr Thr Thr Pro Pro
 1 5

<210> 66
 <211> 6
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

15 <400> 66
Val Tyr Ala Thr Pro Ser
 1 5

<210> 67
 <211> 6
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

25 <400> 67
Ser Tyr Asn Ser Pro Ala
 1 5

<210> 68
 <211> 6
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

35 <400> 68
Ser Tyr Ser Thr Pro Ala
 1 5

<210> 69
 <211> 6
 40 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

45 <400> 69
Ser Tyr Thr Ala Pro Thr
 1 5

<210> 70
 <211> 6
 50 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

55 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 70
Asp Ser Thr Leu Pro Pro
 1 5

5 <210> 71
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 71
Ser Asp Ala Ala Pro Pro
 1 5

15 <210> 72
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 72
Ser Asp Asp His Pro Pro
 1 5

25 <210> 73
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 73
Ser Tyr Ser Thr Pro Pro
 1 5

35 <210> 74
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

45 <400> 74
Ser Tyr Thr Arg Pro Pro
 1 5

50 <210> 75
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 75
Gly Phe Ser Ile Ser Gly Tyr Tyr
 1 5

5 <210> 76
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 76
Gly Phe Ser Ile Ser Asp Tyr Tyr
 1 5
 10
 <210> 77
 <211> 8
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 20 <400> 77
Gly Phe Ser Ile Asp Gly Tyr Tyr
 1 5
 <210> 78
 <211> 8
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 30 <400> 78
Gly Phe Thr Ile Tyr Asp Tyr Tyr
 1 5
 <210> 79
 <211> 8
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 40 <400> 79
Gly Phe Ser Ile Ala Gly Tyr Tyr
 1 5
 <210> 80
 <211> 8
 45 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 50 <400> 80
Gly Phe Thr Ile Ser Asp Tyr Tyr
 1 5
 55 <210> 81
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

5 <400> 81
Trp Ile Asp Pro Tyr Gly Gly Asp Thr Asn
1 5 10

<210> 82
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

15 <400> 82
Trp Ile Asp Pro Tyr Gly Gly Asp Thr Asp
1 5 10

<210> 83
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

25 <400> 83
Gly Thr Phe Leu Thr Ser Trp Gly His Tyr
1 5 10

30 <210> 84
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

40 <400> 84
Gly Thr Phe Leu Thr Thr Trp Gly His Tyr
1 5 10

45 <210> 85
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Asp, Ser o Val

55 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Val o Ile

60 <220>
 <221> MOD_RES

<222> (3)..(3)
 <223> Ser, Asn o Gly

 <220>
 5 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> Thr o Asn

 <220>
 10 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> Ala o Tyr

 <220>
 15 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> Val o Leu

 <400> 85
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 1 5

 <210> 86
 <211> 6
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 <220>
 30 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Ser, Val o Asp

 <220>
 35 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Tyr, Asp o Ser

 <220>
 40 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> Thr, Ser, Ala, Asp o Asn

 <220>
 45 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> Thr, His, Asn, Ser, Ala, Leu o Arg

 <220>
 50 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> Pro, Thr, Ala o Ser

 <400> 86
Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa
 55 1 5

 <210> 87
 <211> 8
 <212> PRT
 60 <213> Secuencia artificial

 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<220>
 <221> MOD_RES
 5 <222> (3)..(3)
 <223> Asn, Ser o Thr

<220>
 <221> MOD_RES
 10 <222> (5)..(5)
 <223> Ser, Asp, Tyr o Ala

<220>
 <221> MOD_RES
 15 <222> (6)..(6)
 <223> Gly o Asp

<400> 87
Gly Phe Xaa Ile Xaa Xaa Tyr Tyr
 1 5

20 <210> 88
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

30 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10)..(10)
 <223> Asn o Asp

<400> 88
Trp Ile Asp Pro Tyr Gly Gly Asp Thr Xaa
 1 5 10

35 <210> 89
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

45 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> Ser o Thr

50 <400> 89
Gly Thr Phe Leu Thr Xaa Trp Gly His Tyr
 1 5 10

55 <210> 90
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: marcador 6xHis sintético
 <400> 90

His His His His His His
1 5

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal aislado que se une a HtrA1 e inhibe su actividad serina proteasa para uno o más sustratos para HtrA1, en el que el anticuerpo comprende una secuencia de VH que comprende la SEQ ID NO: 32 y una secuencia de VL que comprende la SEQ ID NO: 31.
2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo se une a un epítipo que comprende uno o ambos de los aminoácidos N224 o K248 de SEQ ID NO: 13.
3. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo comprende además una o más de las siguientes propiedades: (i) se une a HtrA1 con una proporción de 1 dominio variable a una subunidad de un trímero de HtrA1 o (ii) no previene la formación de trímeros de HtrA1.
4. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el anticuerpo no reacciona de manera cruzada con uno o más de HtrA2, HtrA3 y HtrA4.
5. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el anticuerpo tiene una constante de disociación de ≤ 500 nM como se determina mediante BIAcore usando un Fab a 25 °C.
6. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que es un anticuerpo humano, humanizado o quimérico, o un fragmento de anticuerpo que se une a HtrA1.
7. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el anticuerpo comprende (a) HVR-H1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; (b) HVR-H2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; y (c) HVR-H3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; (d) HVR-L1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; (e) HVR-L2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y (f) HVR-L3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.
8. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el anticuerpo comprende (a) HVR-H1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20; (b) HVR-H2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; y (c) HVR-H3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; (d) HVR-L1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18; (e) HVR-L2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y (f) HVR-L3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19.
9. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el anticuerpo comprende (a) HVR-H1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20; (b) HVR-H2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; y (c) HVR-H3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; (d) HVR-L1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21; (e) HVR-L2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y (f) HVR-L3, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22.
10. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que comprende una secuencia de VH que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 y una secuencia de VL que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.
11. El anticuerpo de la reivindicación 1, que comprende una secuencia de VH de SEQ ID NO: 8 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 7, una secuencia de VH de SEQ ID NO: 29 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 28 o una secuencia de VL de SEQ ID NO: 30 y una secuencia de VH de SEQ ID NO: 29.
12. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, que es un anticuerpo IgG1 o IgG4 de longitud completa.
13. Un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12.
14. Una célula huésped que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 13.
15. Un procedimiento de producción de un anticuerpo que comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 14 en condiciones adecuadas para la expresión del ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-HtrA1.
16. El procedimiento de la reivindicación 15, que comprende además recuperar el anticuerpo anti-HtrA1 del cultivo de células huésped.
17. Un inmunconjugado que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12 y un agente

citotóxico.

- 5
18. Una formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
19. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12 para su uso como un medicamento.
- 10
20. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12 para su uso en el tratamiento de la degeneración macular senil, atrofia geográfica, retinopatía diabética, retinopatía de la prematuridad o vasculopatía coroidea polipoidea.
21. El anticuerpo de la reivindicación 20, para su uso en el tratamiento de la degeneración macular senil seca.
- 15
22. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12 para su uso en la inhibición de la degeneración de las células de la retina o fotorreceptoras.
23. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-17 para su uso en la inhibición de la actividad proteasa de HtrA1 en un ojo.

Kabat n.º	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74											
huKI														Kabat - CDR L2																																		
														Choithia - CDR L2																																		
														Contacto - CDR L2																																		
														A A S S L E S																	G	V	P	S	R	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L
YW505.94	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	S	A	S	P	L	Y	S	G	V	P	S	R	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T										

Kabat n.º	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108
	Kabat - CDR L3																																	
	Chothia - CDR L3																																	
	Contacto - CDR L3																																	
huK1	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	N	S	L	P	W	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R
YW505.94	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	S	S	E	E	T	P	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R

FIG. 1A

Kabat n.º	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	
hum III	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	S	Y	A	M	S	W	V	R	Q	A	
YW505.94	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	W	I	S	G	Y	I	I	I	I	W	V	R	Q	A
Kabat n.º	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	A	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	
hum III	P	G	K	G	L	E	W	V	S	V	I	S	G	D	G	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	
YW505.94	P	G	K	G	L	E	W	V	G	W	I	D	P	I	G	G	D	T	N	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	
Kabat n.º	80	81	82	A	B	C	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	A	B	C	D	E	F	G	101	102	103	104	105	106	107			
hum III	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G																						
YW505.94	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	T	F	L	T	S	W	G	H	I	-	-	-	F	D	Y	W	G	Q	G	T		

FIG. 1B

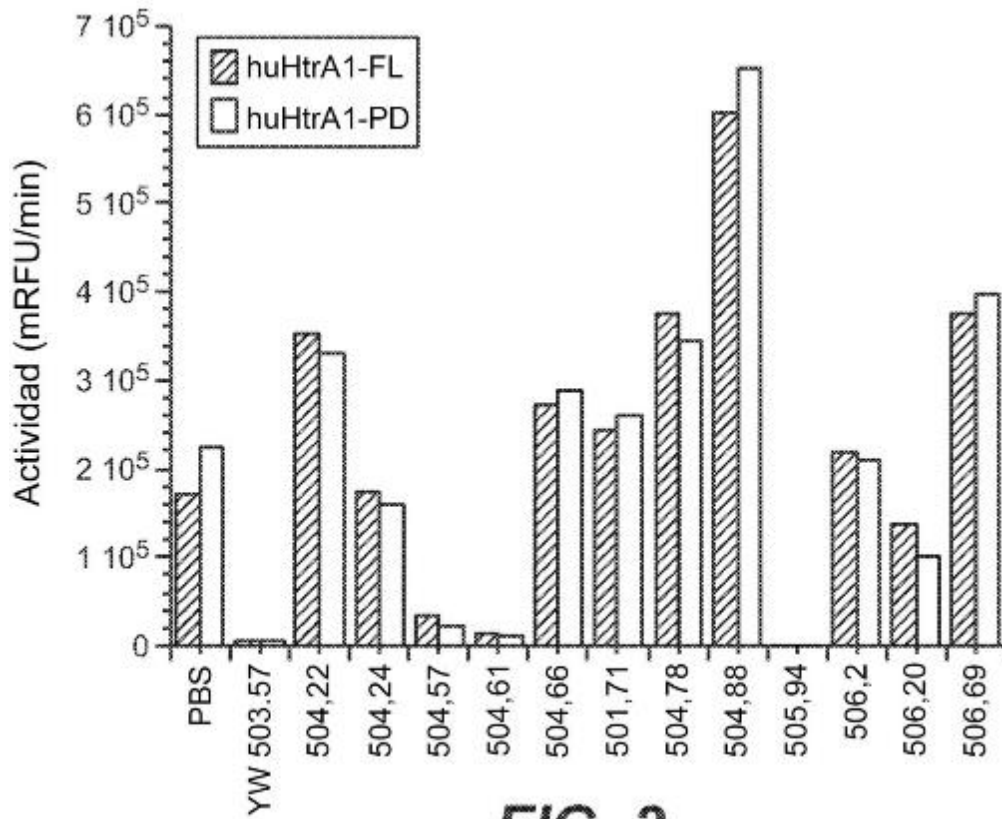


FIG. 2

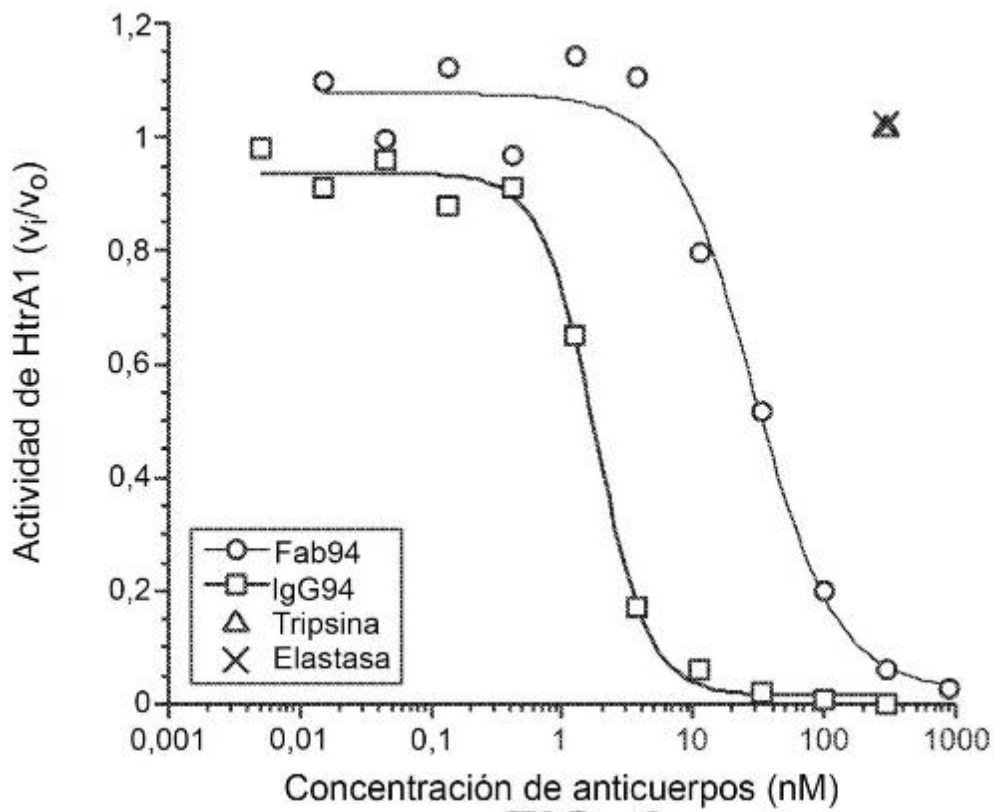


FIG. 3

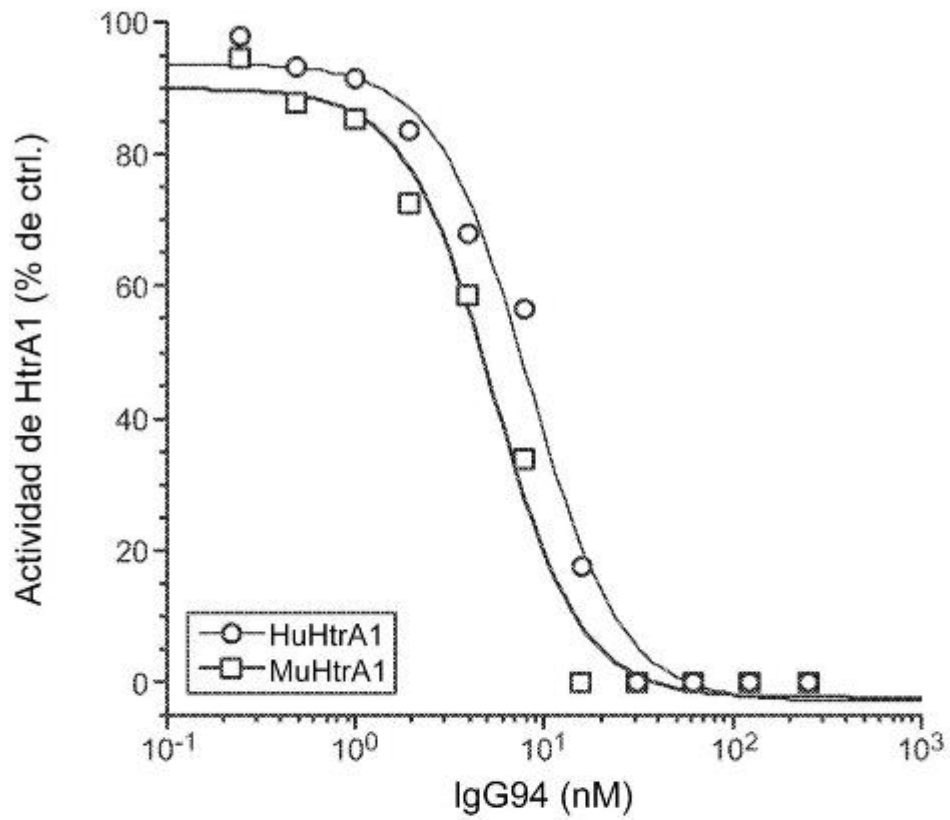


FIG. 4

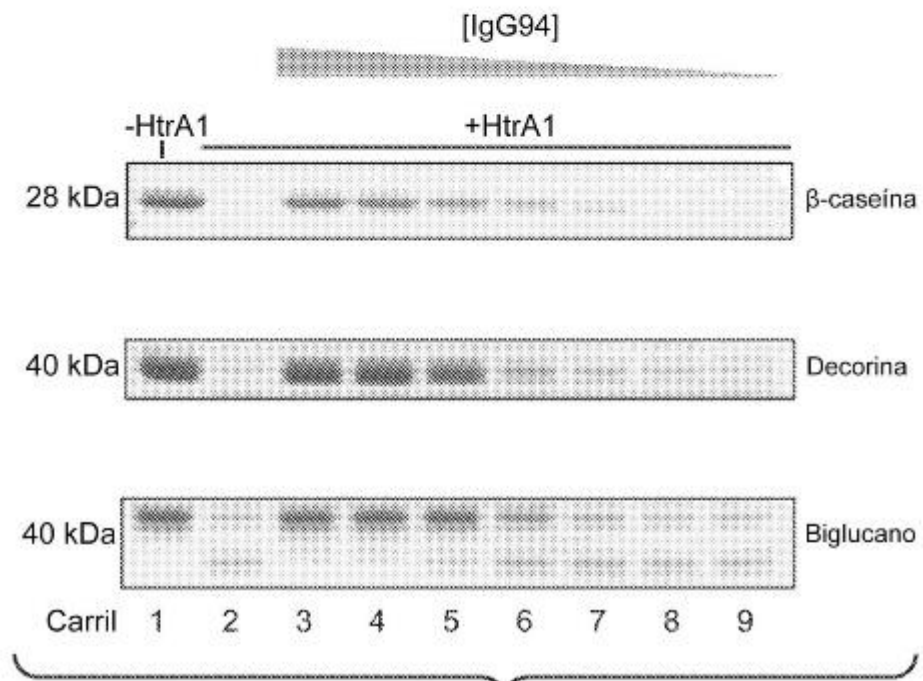
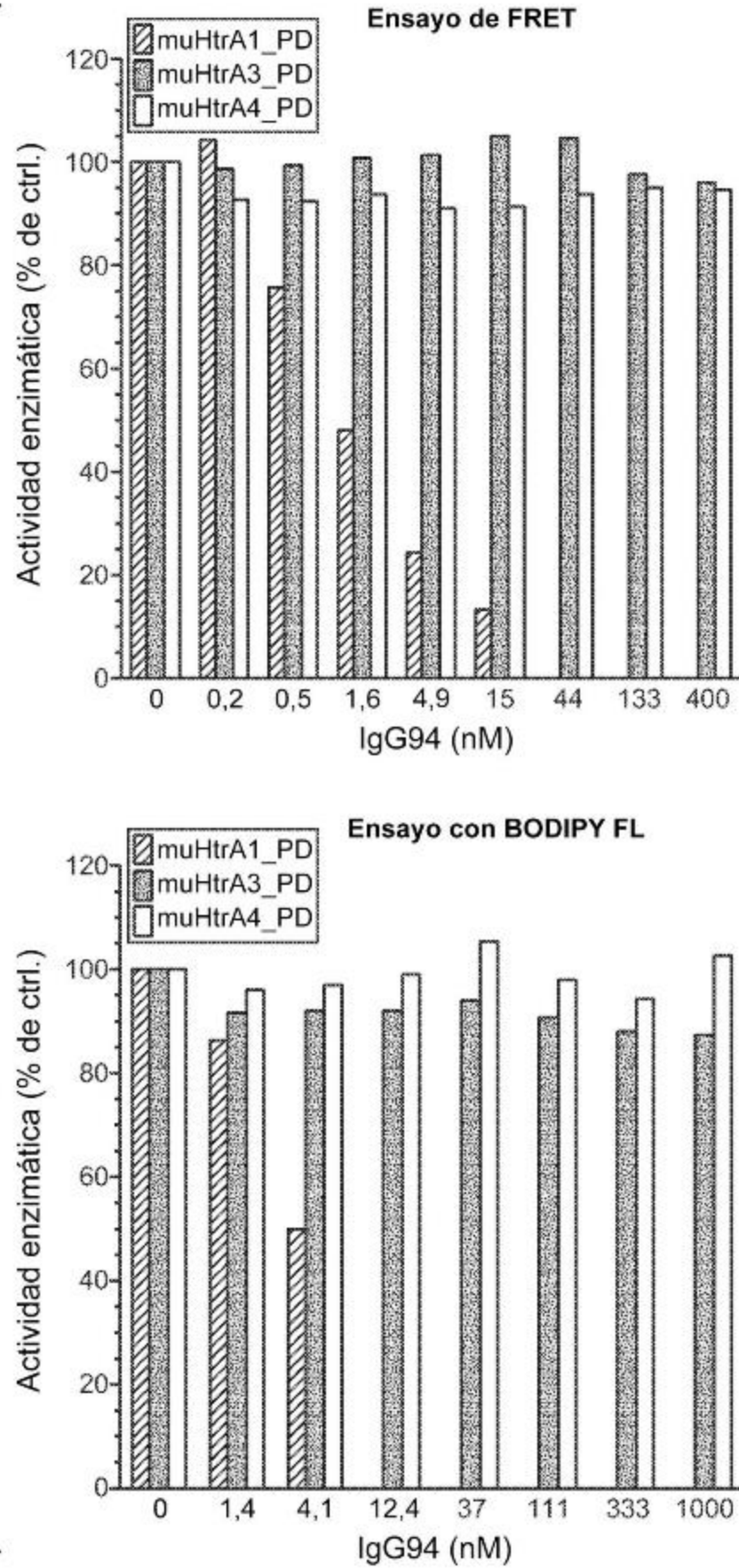


FIG. 6

FIG. 5



Número de residuo de HtrA1	Fab YW505.94 [CE50 (nM)] Media $\pm$ DE	En relación con disminución en número de veces de CE50 WT
R190A	---	---
K191A	14,0 $\pm$ 3,3	2,5
V201A	112,5 $\pm$ 16,4	20
H220A	32,0 $\pm$ 1,4	5,7
T223A	62,9 $\pm$ 2,2	11,2
N224A	134,6 $\pm$ 12,3	24
K225A	52,2 $\pm$ 1,3	9,3
R227A	25,9 $\pm$ 0,2	4,6
E239A	5,4 $\pm$ 0,2	0,9
K241A	23,0 $\pm$ 0,5	4,1
K243A	64,9 $\pm$ 4,2	11,6
D244A	4,7 $\pm$ 0,3	0,8
E247A	41,7 $\pm$ 0,9	7,4
K248A	195,8 $\pm$ 21,9	35
D250A	9,4 $\pm$ 3,5	1,7
Y325A	7,7 $\pm$ 0,6	1,4
S328A	2,3 $\pm$ 0,3	0,4
L345A	—	—
WT	5,6 $\pm$ 0,9	1

FIG. 7A

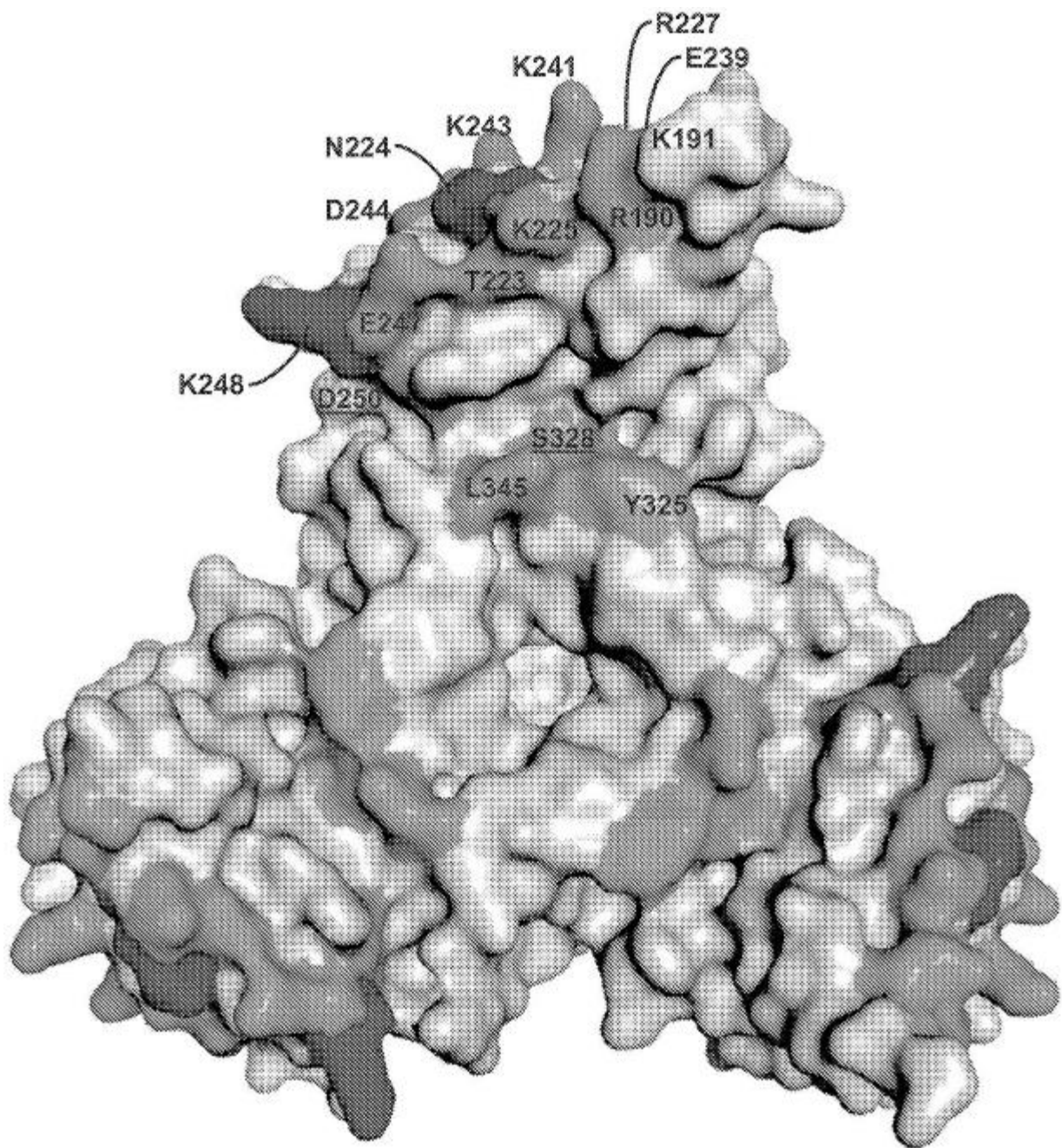


FIG. 7B

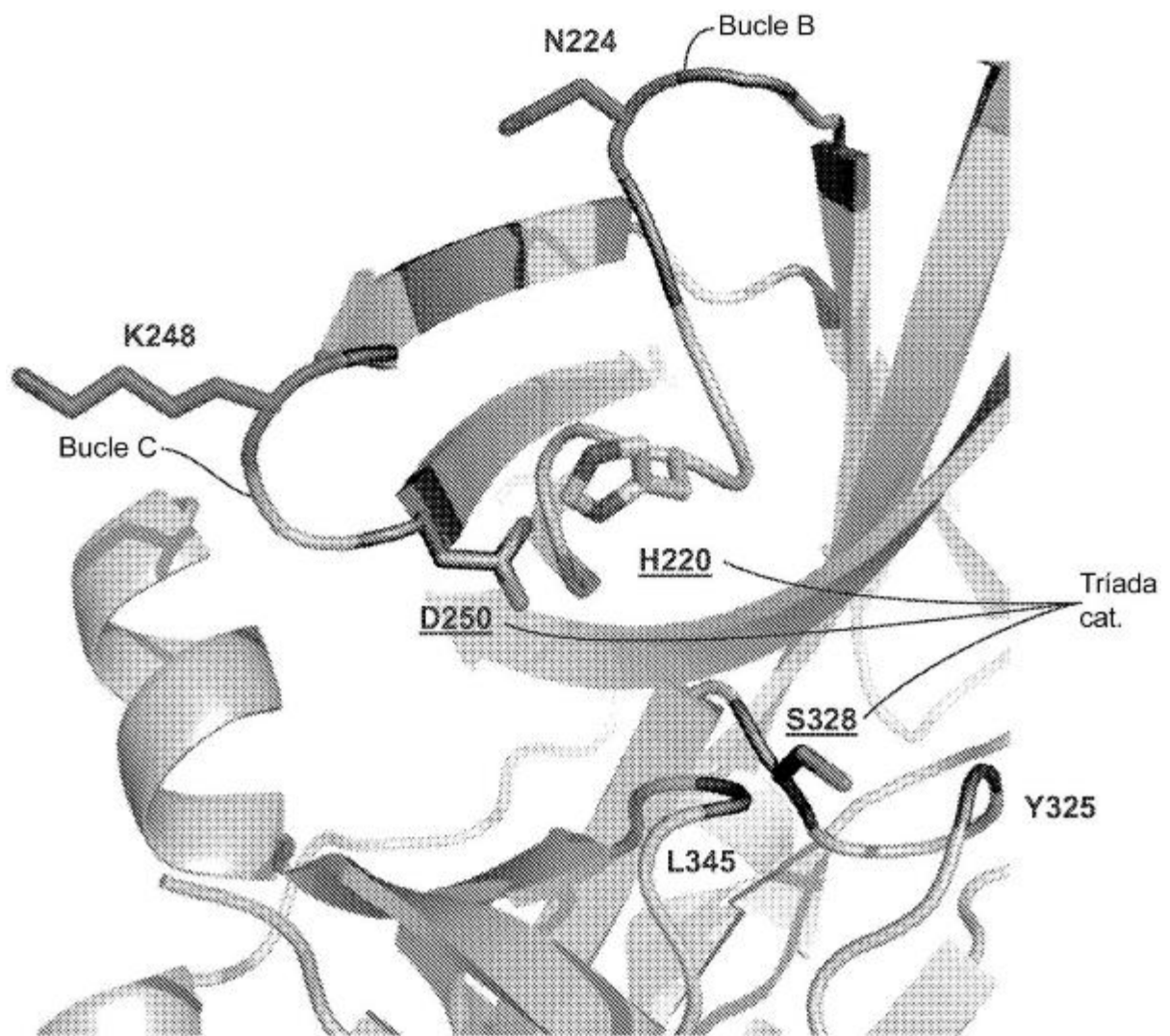


FIG. 7C

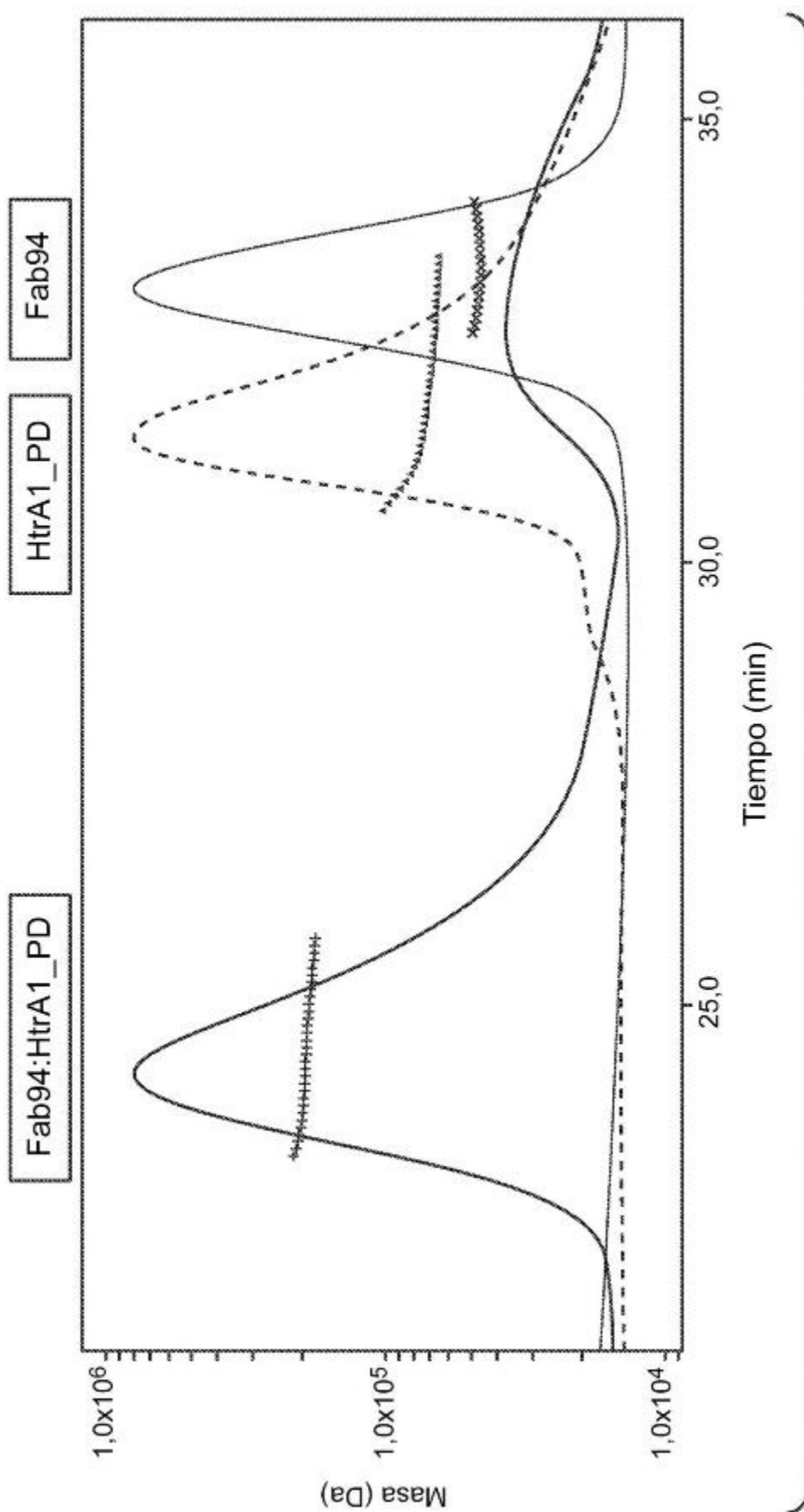


FIG. 8A

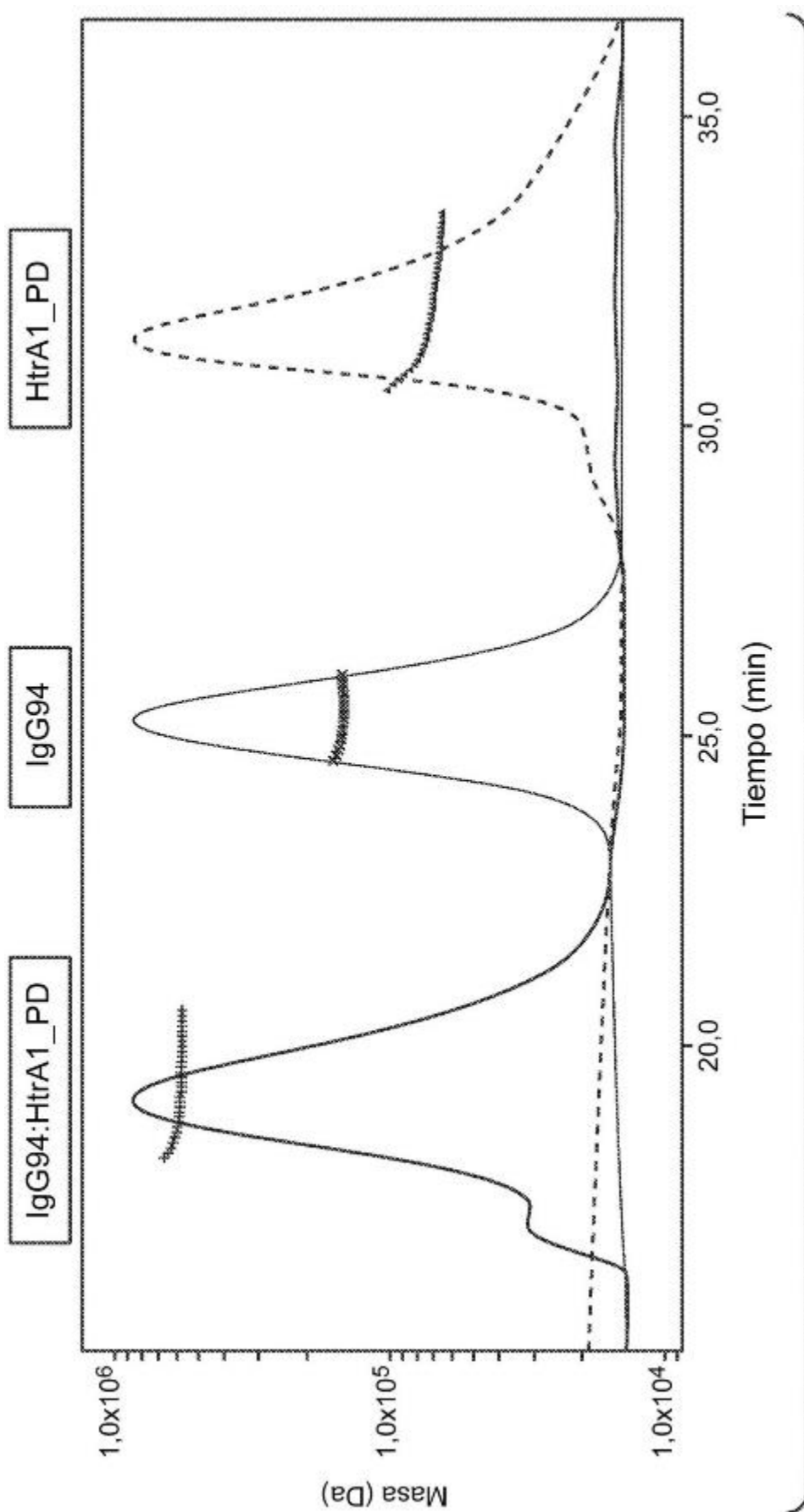


FIG. 8B

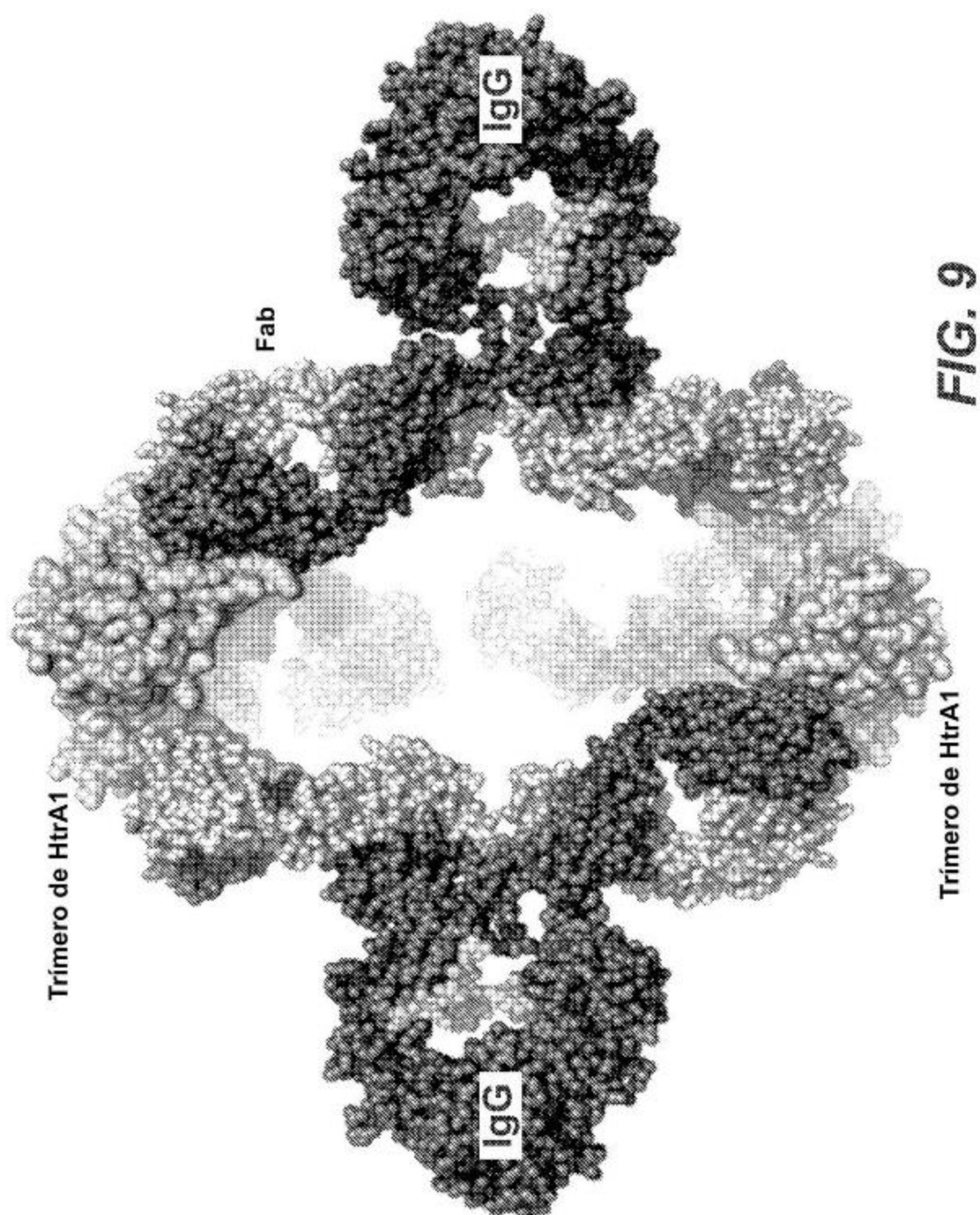


FIG. 9

```

huHtrA1      --MQIPRAALLPLLLLLAAPASQAQLSRAGRSAPLAAGCPDRCEPARCPPQPEHCEGGR-- 57
muHtrA1      --MQSLRTTLLSLLLLLAAPSLALPSGTGRSAPAAATVCPEHCDPTTRCAPPPTDCEGGR-- 57
muHtrA3      --MQAR--ALLPATLAILATLAVLALARE---PPAAPCPARCDVSRCPSP--RCPGGY-- 49
muHtrA4      MSFQRLWAVRTQFLLLWLLLPVAVPVPWAEARRSRVSLPCPDACDPTTRCPTLPTCSAGLAP 60
              :*      .      *      *      :      :      *      *      :      :      :      :      *
              :      *      *      :      :      *      *      :      :      :      :      *

huHtrA1      ARDAGCCEVCGAPEGAACG-LQEGPCGEGLOCVVPFGVPASATVRRRAQAAGLCVCAS-- 114
muHtrA1      VRDAGCCEVCGALEGAACG-LQEGPCGEGLOCVVPFGVPASATVRRRAQAAGLCVCAS-- 114
muHtrA3      VPDLCNCCLVCAASEGEPCCGRPLDSPCGDSLECVR-----GVCRCRW-- 91
muHtrA4      VPDRCGCCRCVCAAAEGQECGGARGRPCAPRLRCGAPFSRDPG-----GAWLGTCCGAEGA 116
              .      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
              *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *

huHtrA1      -SEPVCGSDANTYANLCQLRAASRRSERLHRPPVIVLQRGACGQ-GQEDPNSLRHKYNFI 172
muHtrA1      -SEPVCGSDAKTYTNLCQLRAASRRSEKLRQPPVIVLQRGACGQ-GQEDPNSLRHKYNFI 172
muHtrA3      -THTVCGTDGHTYADVICALQAASRRALQVSGTPVRLOKGCAPS-GLHQLTSPRYKFNFI 149
muHtrA4      EDVAVCGSDGRTYPSLCAALRKENRAARQORGALPAVPVQKGACEEAGTTAGRLRRKYNFI 176
              ***:*.***.***:*. *      :      :      *      :      :      *      :      :      *      :      :      *
              *      :      :      *      :      :      *      :      :      *      :      :      *      :      :      *

huHtrA1      ADVVEKIAPAVVVHIELFRKLPFSKREVVPVASGSGFIVSEDLIVTNAHVVTN-----KH 226
muHtrA1      ADVVEKIAPAVVVHIELYRKLPFSKREVVPVASGSGFIVSEDLIVTNAHVVTN-----KN 226
muHtrA3      ADVVEKIAPAVVVHIELFLRHPLFGRNVPLSSGSGFIMSEAGLIVTNAHVVSSTASGRQ 209
muHtrA4      AAVVEKVAPSVVHLQLFRRSPLTNQEIPISSSGSGFIVSEDLIVTNAHVLTN-----QQ 230
              *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
              *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
              *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *

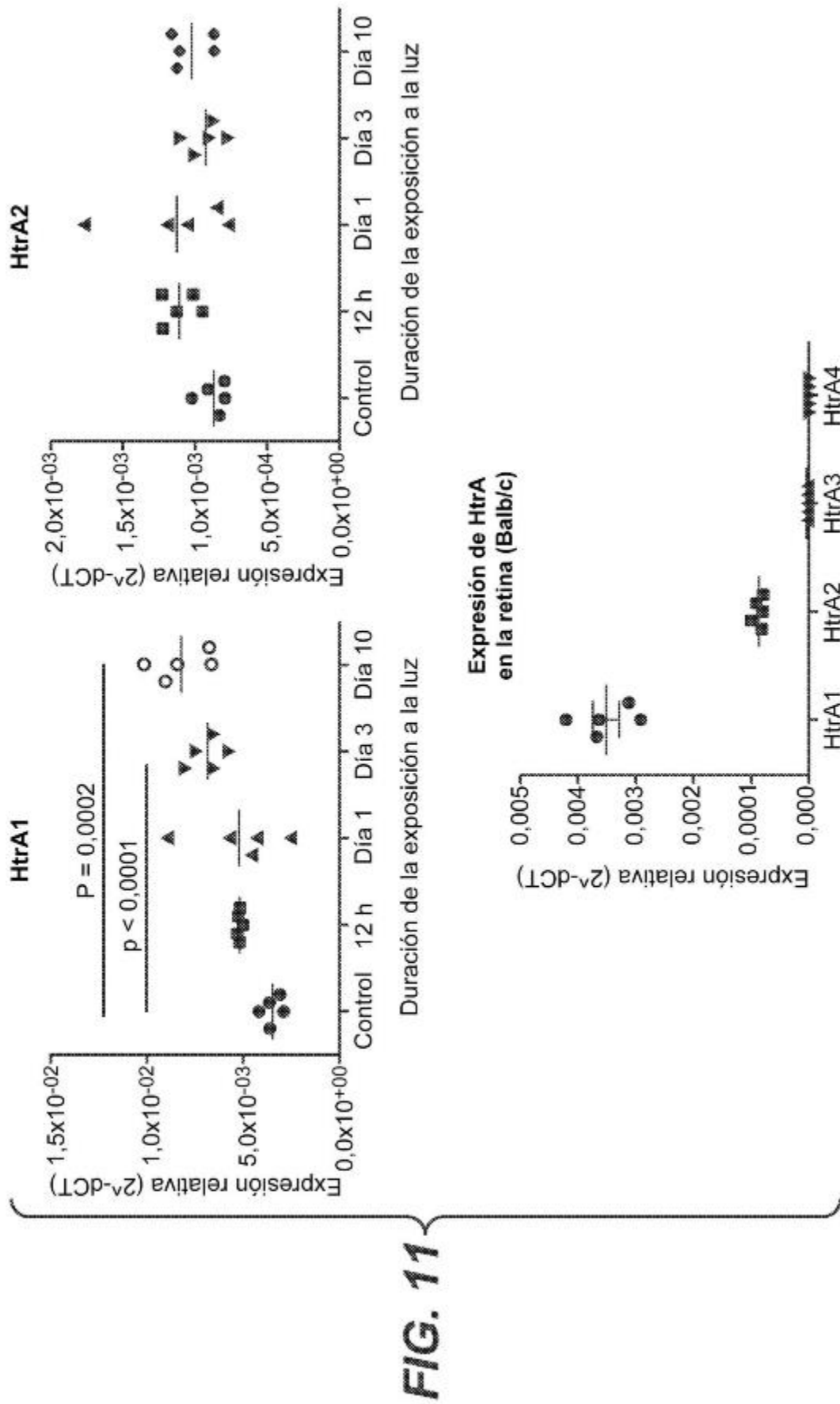
huHtrA1      RVKVELKNGATYEAKIKDVDEKADIALIKIDHQKLPVLLGRSSSELRPGEFVVAIGSPF 286
muHtrA1      RVKVELKNGATYEAKIKDVDEKADIALIKIDHQKLPVLLGRSSSELRPGEFVVAIGSPF 286
muHtrA3      QLKVQLONGDAYEATIQIDIDKKSDIATIVIHPPKKLPVLLGHSAADLRPGEFVVAIGSPF 269
muHtrA4      KIQVELQSGARYEATVKDIDHKLDLALIKIEPDTELPVLLGRSSDLRAGEFVVALGSPF 290
              :      :      :      :      :      :      :      :      :      :      :      :      :
              :      :      :      :      :      :      :      :      :      :      :      :      :
              :      :      :      :      :      :      :      :      :      :      :      :      :

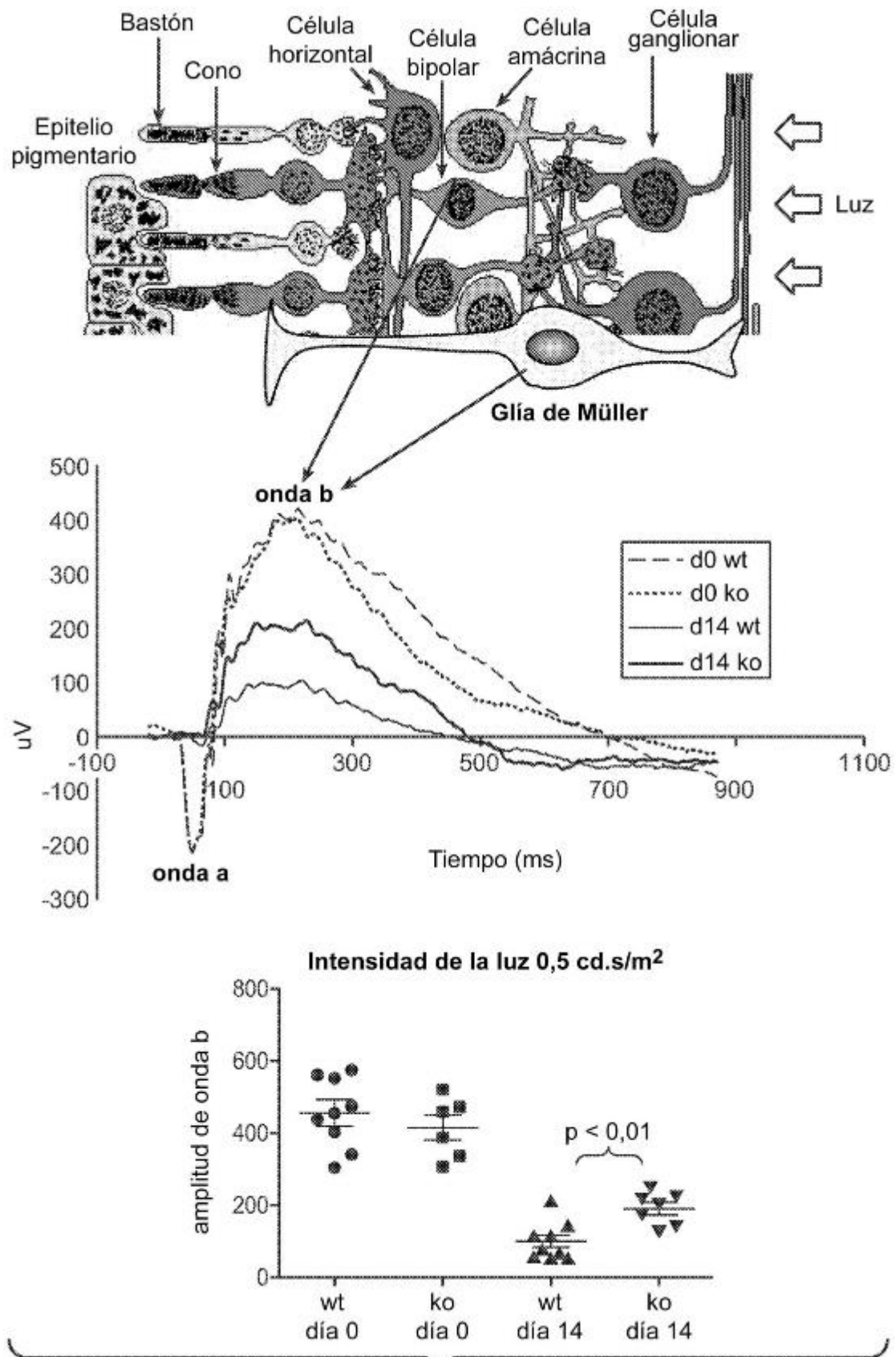
```

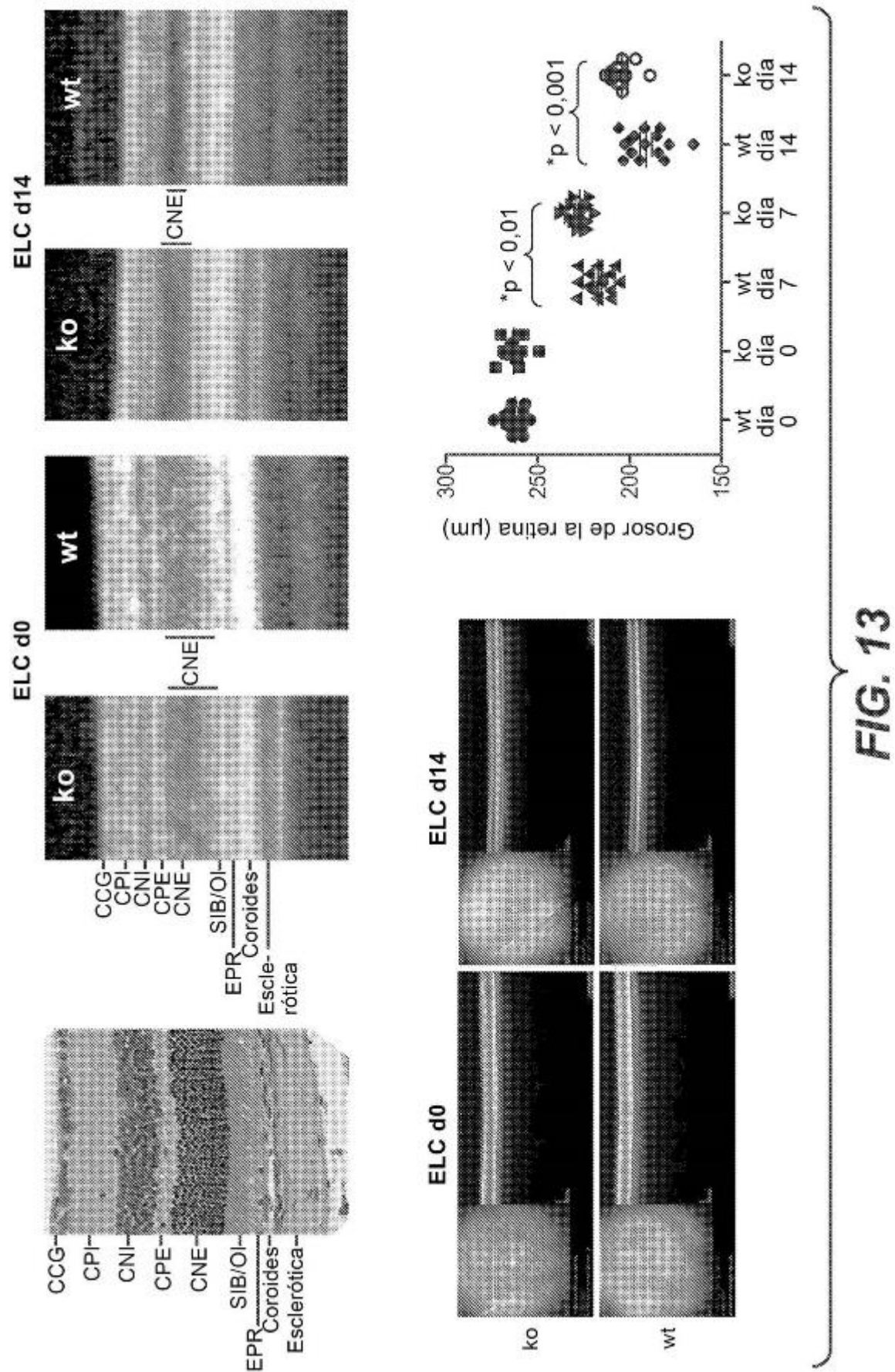
FIG. 10A

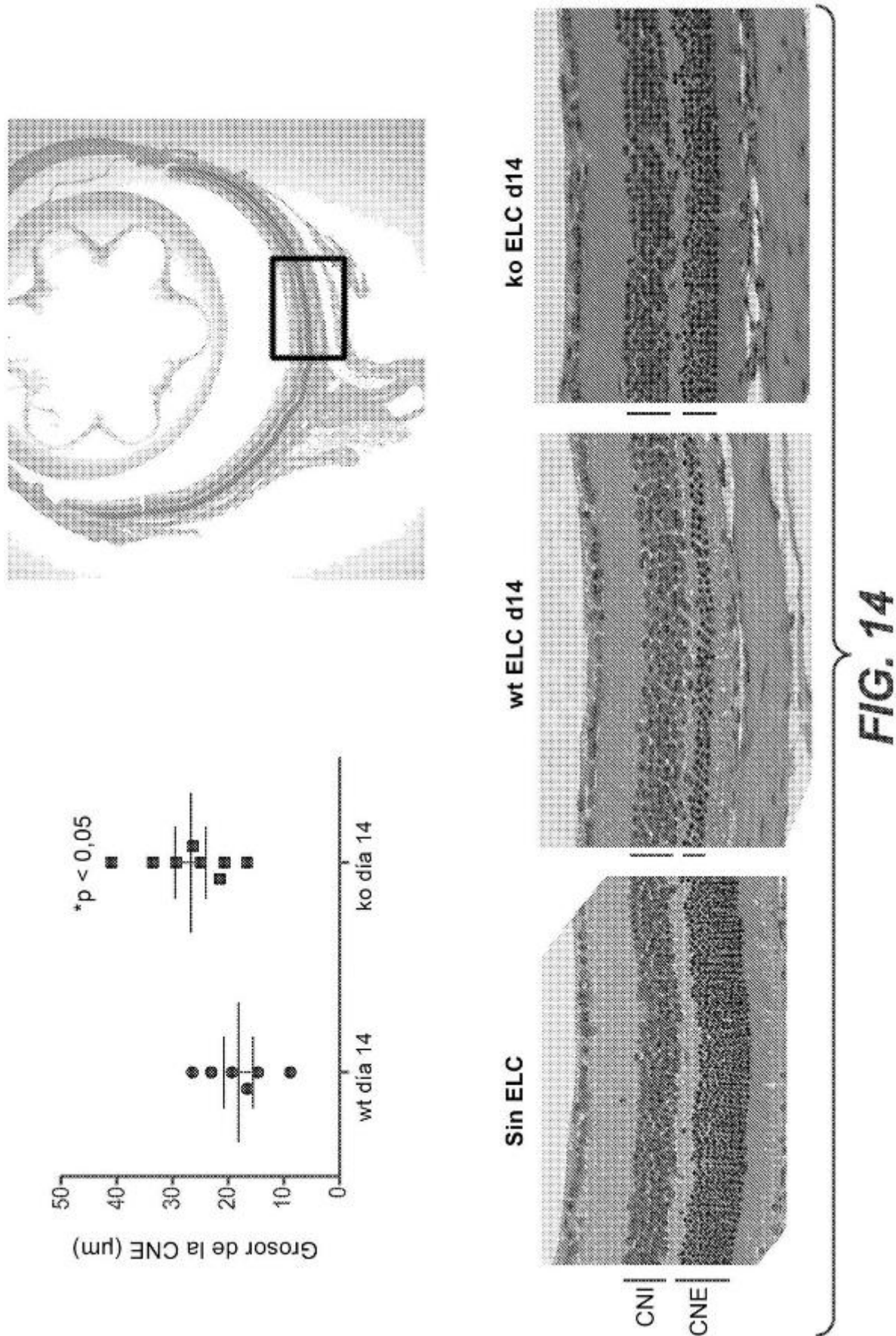
huHtrA1	SLQNTVTTGIVSTTQRGKELGLRNSDMDYIQTDAIINYNSGGPLVNL DGEVIGINTLK	346
muHtrA1	SLQNTVTTGIVSTTQRGKELGLRNSDMDYIQTDAIINYNSGGPLVNL DGEVIGINTLK	346
muHtrA3	ALQNTVTTGIVSTAQRDQKELGLRSDMDYIQTDAIINYNSGGPLVNL DGEVIGINTLK	329
muHtrA4	SLQNTVTVAGIVSTTQRGRELGLKNSDIDYIQTDAIINHNSGGPLVNL DGDVIGINTLK	350
	:*****:***.***:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
huHtrA1	VTAGISFAIPSDKIKKFLTESHDRQAKGKAITKKKYIGIRMSLTSSKAKELKDRHRDFF	406
muHtrA1	VTAGISFAIPSDKIKKFLTESHDRQAKGKAIVTKKKYIGIRMSLTSSKAKELKDRHRDFF	406
muHtrA3	VAAGISFAIPSDRITRFLSEFQNKHVKD---WKKRFIGIRMRITTPSLVEELKAANPDFF	386
muHtrA4	VTAGISFAIPSDRIRQFLEDYHERQLKGKAPLQKKYLGLRMLPLTLNLLQEMKRQDPFF	410
	*:*****:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***	
huHtrA1	DVISGAYIIIEVIPDTPAEAGGLKENDVIIISINGQSVVSANDVSDVIKRESTLNMVVRRGN	466
muHtrA1	DVLSGAYIIIEVIPDTPAEAGGLKENDVIIISINGQSVVTANDVSDVIKENTLNMVVRRGN	466
muHtrA3	AVSSGIYVQEVVNPSPSQRGGIQDGIIVKVNGRPLADSSSELQEAVLNESSLLLEVRRGN	446
muHtrA4	DVSSGVFVYVEVIQGSAAASSGLRDHDVIVSINGQPVTTTDDVIEAVKDNDFLSIIVLRGS	470
	* ** **:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***	
huHtrA1	EDIMITVPIEEDP	480
muHtrA1	EDIVITVPIEEDP	480
muHtrA3	DDLFSIIPVVM-	459
muHtrA4	QTLFLTPTPEIIN-	483
	: : : : : ** :	

FIG. 10B









Clon	CDR-L1							CDR-L2							CDR-L3						
	28	29	30	31	32	33	SEQ	50	51	52	53	54	55	SEQ	91	92	93	94	95	96	SEQ
YW505.94a (WT)	D	V	S	T	A	V	54	S	A	S	F	L	Y	58	S	Y	T	T	P	P	59
YW505.94a.1	D	V	S	T	A	V	54	S	A	S	F	L	Y	58	V	Y	S	E	P	P	60
YW505.94a.7	D	V	S	T	A	V	54	S	A	S	F	L	Y	58	S	Y	T	N	P	P	61
YW505.94a.22	D	V	S	T	A	V	54	S	A	S	F	L	Y	58	S	Y	A	T	P	T	62
YW505.94a.26	D	V	S	T	A	V	54	S	A	S	F	L	Y	58	S	Y	T	T	P	P	59
YW505.94a.28	S	I	N	T	Y	L	55	S	A	S	F	L	Y	58	S	D	D	T	P	P	63
YW505.94a.37	D	V	S	T	A	V	54	S	A	S	F	L	Y	58	S	Y	S	S	P	A	64
YW505.94a.38	D	V	S	T	A	V	54	S	A	S	F	L	Y	58	S	Y	T	T	P	P	59
YW505.94a.39	D	V	S	T	A	V	54	S	A	S	F	L	Y	58	V	Y	T	T	P	P	65
YW505.94a.40	D	V	S	T	A	V	54	S	A	S	F	L	Y	58	V	Y	A	T	P	S	66
YW505.94a.42	D	V	S	T	A	V	54	S	A	S	F	L	Y	58	S	Y	N	S	P	A	67
YW505.94a.46	D	V	S	T	A	V	54	S	A	S	F	L	Y	58	S	Y	S	T	P	A	68
YW505.94a.47	D	V	S	T	A	V	54	S	A	S	F	L	Y	58	S	Y	T	T	P	P	59
YW505.94a.50	D	V	S	T	A	V	54	S	A	S	F	L	Y	58	S	Y	T	A	P	T	69
YW505.94a.51	D	V	G	T	Y	L	56	S	A	S	F	L	Y	58	D	S	T	L	P	P	70
YW505.94a.52	D	V	S	T	A	V	54	S	A	S	F	L	Y	58	S	D	A	A	P	P	71
YW505.94a.54	V	V	G	N	Y	L	57	S	A	S	F	L	Y	58	S	D	D	E	P	P	72
YW505.94a.77	D	V	S	T	A	V	54	S	A	S	F	L	Y	58	S	Y	T	T	P	P	59
YW505.94a.78	D	V	S	T	A	V	54	S	A	S	F	L	Y	58	S	Y	S	T	P	P	73
YW505.94a.82	D	V	S	T	A	V	54	S	A	S	F	L	Y	58	S	Y	T	T	P	P	59
YW505.94a.89	D	V	S	T	A	V	54	S	A	S	F	L	Y	58	S	Y	T	R	P	P	74

FIG. 15

Clon	CDR-H1										CDR-H2										CDR-H3										
	26	27	28	29	30	31	32	33	SEQ	50	51	52	A	53	54	55	56	57	58	SEQ	95	96	97	98	99	100	A	B	C	D	SEQ
YW505.94a.(WT)	G	F	S	I	S	G	Y	Y	75	W	I	D	P	Y	G	G	D	T	N	81	G	T	F	L	T	S	W	G	H	Y	83
YW505.94a.1	G	F	S	I	S	G	Y	Y	75	W	I	D	P	Y	G	G	D	T	N	81	G	T	F	L	T	S	W	G	H	Y	83
YW505.94a.7	G	F	S	I	S	D	Y	Y	76	W	I	D	P	Y	G	G	D	T	N	81	G	T	F	L	T	S	W	G	H	Y	83
YW505.94a.22	G	F	S	I	S	G	Y	Y	75	W	I	D	P	Y	G	G	D	T	N	81	G	T	F	L	T	S	W	G	H	Y	83
YW505.94a.26	G	F	S	I	D	G	Y	Y	77	W	I	D	P	Y	G	G	D	T	N	81	G	T	F	L	T	S	W	G	H	Y	83
YW505.94a.28	G	F	S	I	S	G	Y	Y	75	W	I	D	P	Y	G	G	D	T	N	81	G	T	F	L	T	S	W	G	H	Y	83
YW505.94a.37	G	F	S	I	S	D	Y	Y	76	W	I	D	P	Y	G	G	D	T	N	81	G	T	F	L	T	S	W	G	H	Y	83
YW505.94a.38	G	F	T	I	Y	D	Y	Y	78	W	I	D	P	Y	G	G	D	T	N	81	G	T	F	L	T	S	W	G	H	Y	83
YW505.94a.39	G	F	S	I	S	G	Y	Y	75	W	I	D	P	Y	G	G	D	T	N	81	G	T	F	L	T	S	W	G	H	Y	83
YW505.94a.40	G	F	S	I	S	G	Y	Y	75	W	I	D	P	Y	G	G	D	T	N	81	G	T	F	L	T	S	W	G	H	Y	83
YW505.94a.42	G	F	S	I	S	G	Y	Y	75	W	I	D	P	Y	G	G	D	T	D	82	G	T	F	L	T	S	W	G	H	Y	83
YW505.94a.46	G	F	S	I	S	G	Y	Y	75	W	I	D	P	Y	G	G	D	T	N	81	G	T	F	L	T	T	W	G	H	Y	84
YW505.94a.47	G	F	S	I	S	G	Y	Y	75	W	I	D	P	Y	G	G	D	T	D	82	G	T	F	L	T	S	W	G	H	Y	83
YW505.94a.50	G	F	S	I	S	D	Y	Y	76	W	I	D	P	Y	G	G	D	T	N	81	G	T	F	L	T	S	W	G	H	Y	83
YW505.94a.51	G	F	S	I	S	G	Y	Y	75	W	I	D	P	Y	G	G	D	T	N	81	G	T	F	L	T	S	W	G	H	Y	83
YW505.94a.52	G	F	S	I	S	G	Y	Y	75	W	I	D	P	Y	G	G	D	T	N	81	G	T	F	L	T	S	W	G	H	Y	83
YW505.94a.54	G	F	S	I	S	G	Y	Y	75	W	I	D	P	Y	G	G	D	T	N	81	G	T	F	L	T	S	W	G	H	Y	83
YW505.94a.77	G	F	S	I	S	G	Y	Y	75	W	I	D	P	Y	G	G	D	T	N	81	G	T	F	L	T	T	W	G	H	Y	84
YW505.94a.78	G	F	S	I	A	G	Y	Y	79	W	I	D	P	Y	G	G	D	T	N	81	G	T	F	L	T	S	W	G	H	Y	83
YW505.94a.82	G	F	T	I	S	D	Y	Y	80	W	I	D	P	Y	G	G	D	T	N	81	G	T	F	L	T	S	W	G	H	Y	83
YW505.94a.89	G	F	S	I	S	G	Y	Y	75	W	I	D	P	Y	G	G	D	T	D	82	G	T	F	L	T	S	W	G	H	Y	83

FIG. 16

CI50 de fago con maduración de la afinidad de YW505.94a
(diana: HtrA1 humana)

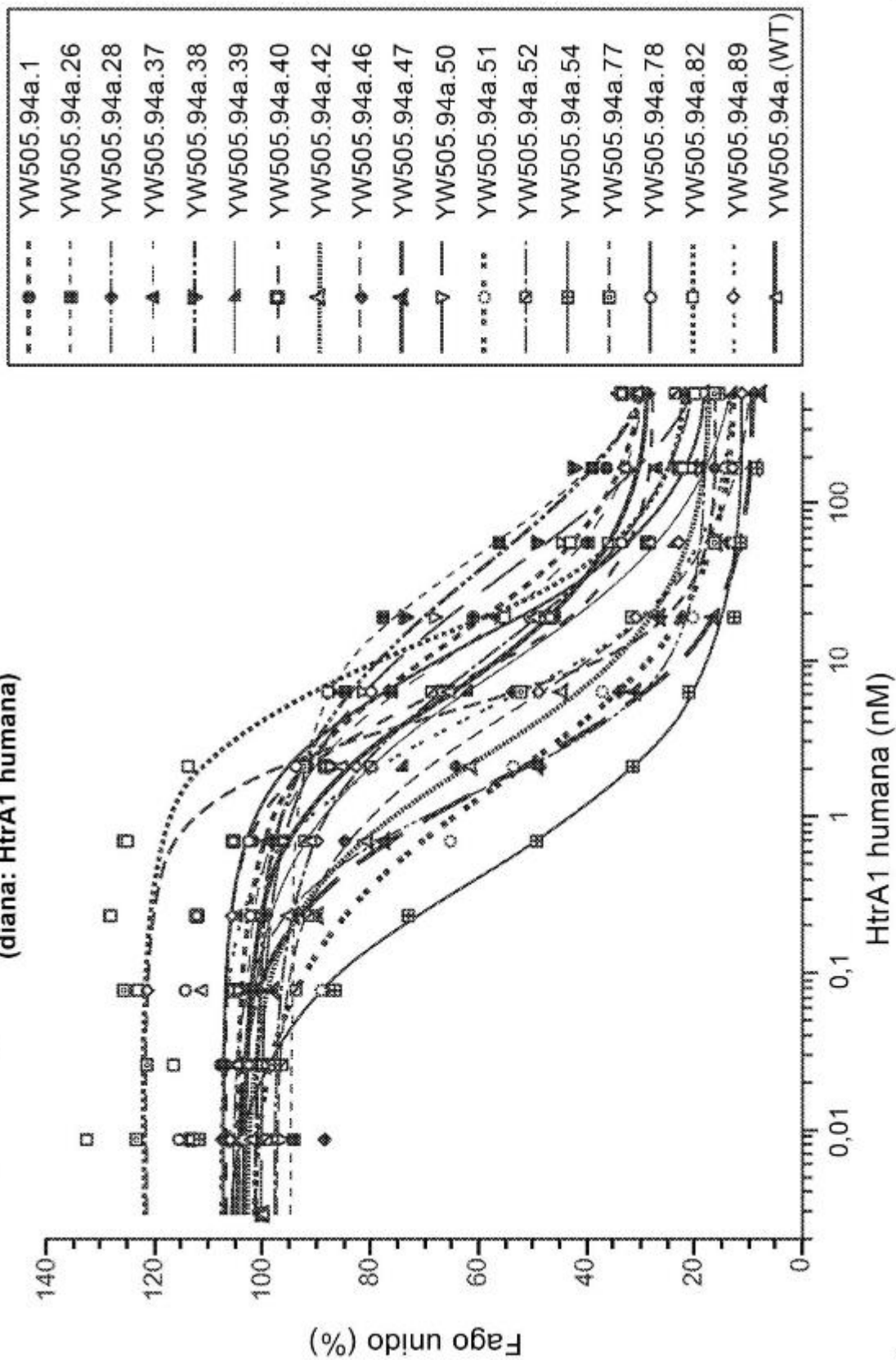


FIG. 17

CI50 de fago con maduración de la afinidad de YW505.94a
(diana: HtrA1 murina)

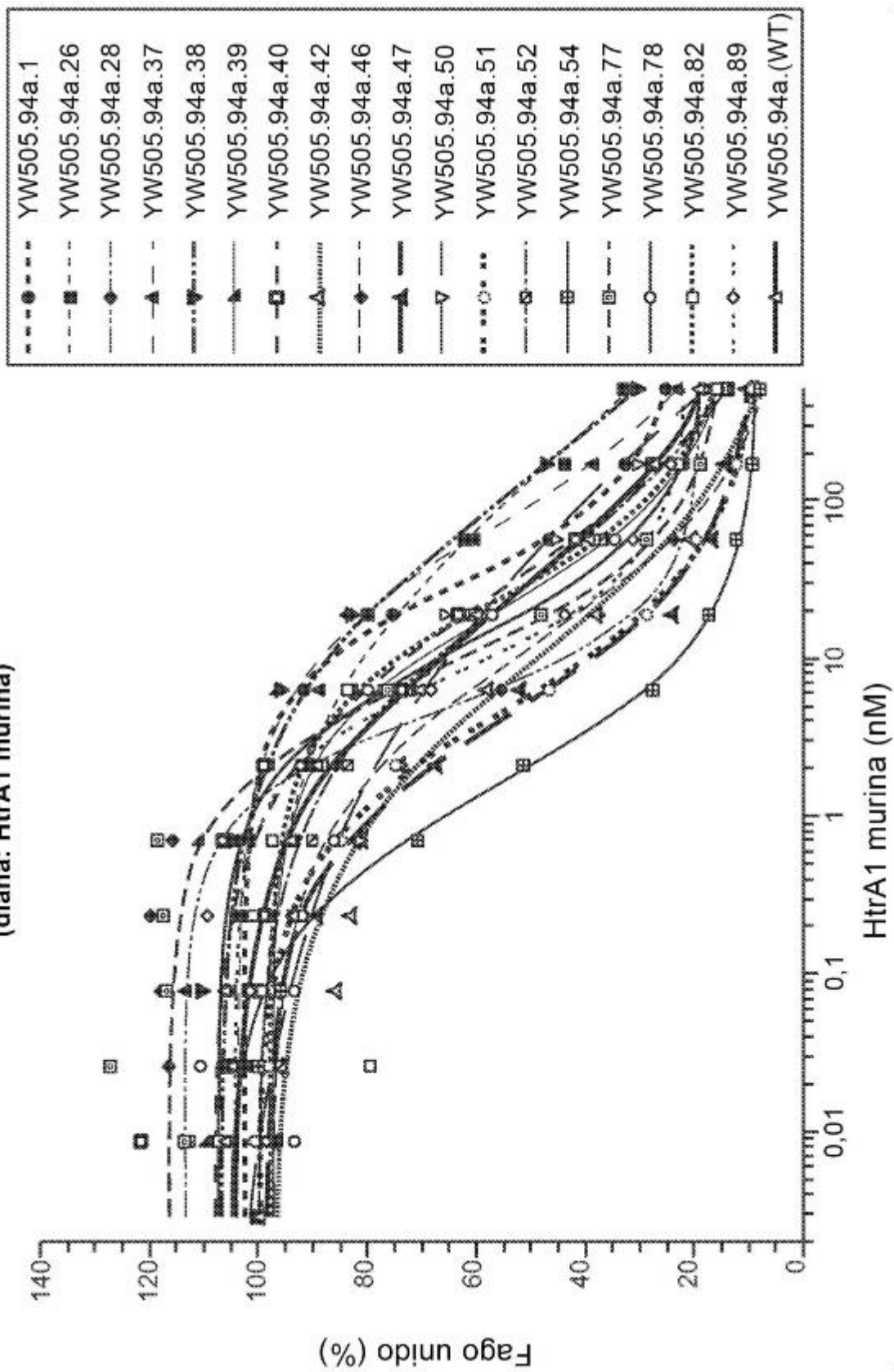


FIG. 18

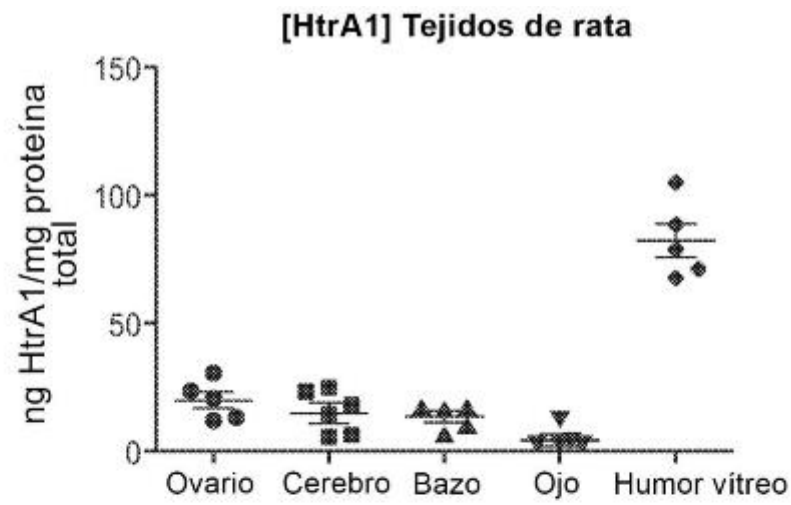


FIG. 19A

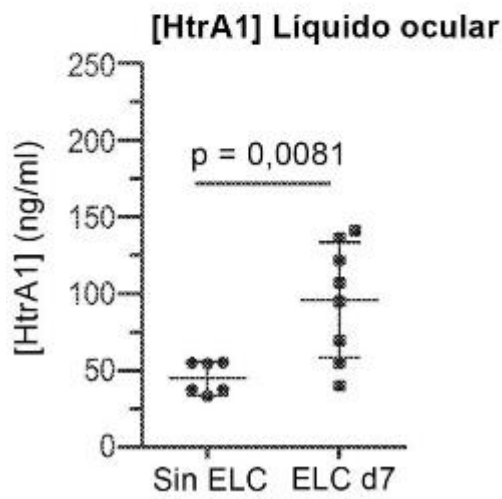


FIG. 19B

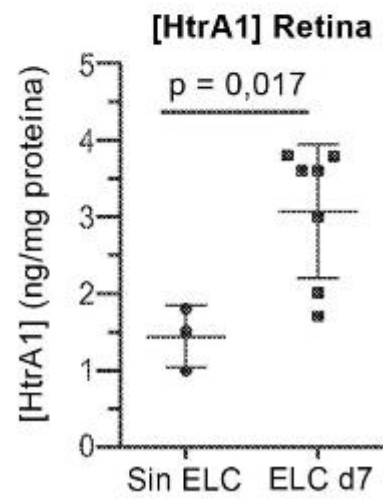


FIG. 19C