

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 698 389**

51 Int. Cl.:

C07K 16/24	(2006.01)	C12P 21/08	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01)		
A61P 1/04	(2006.01)		
A61P 37/06	(2006.01)		
C07K 16/46	(2006.01)		
C12N 1/15	(2006.01)		
C12N 1/19	(2006.01)		
C12N 1/21	(2006.01)		
C12N 5/10	(2006.01)		
C12N 15/09	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.10.2010 PCT/JP2010/069653**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **05.05.2011 WO11052799**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.10.2010 E 10826929 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.09.2018 EP 2493930**

54 Título: **Anticuerpos anti-fractalcina humana mejorados y sus usos**

30 Prioridad:

30.10.2009 US 256521 P

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

04.02.2019

73 Titular/es:

**EISAI R&D MANAGEMENT CO., LTD. (100.0%)
6-10, Koishikawa 4-chome Bunkyo-ku
Tokyo 112-8088, JP**

72 Inventor/es:

**NISHIMURA, MIYUKI;
SAKAMOTO, YOSHIMASA;
KAWANO, TETSU y
IMAI, TOSHIO**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 698 389 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-fractalcina humana mejorados y sus usos

Campo de la invención

La presente invención caracteriza composiciones y métodos relacionados con anticuerpos que se unen a fractalcina.

5 Antecedentes de la invención

La fractalcina (FKN) es una quimiocina transmembranaria que se expresa sobre la superficie de células endoteliales activadas y se une al receptor CX3CR1. La unión de FKN unida a la membrana al CX3CR1 unido a la membrana media en la fuerte adhesión célula-célula sin la participación de selectinas o integrinas. La FKN secretada, que se desprende de la FKN unida a la membrana, también se une a CX3CR1 e induce la activación de integrina y la quimiotaxia celular.

La expresión de FKN se induce sobre la superficie de células endoteliales por citocinas proinflamatorias. Se ha informado de la elevada expresión de FKN y la acumulación de linfocitos efectores citotóxicos CX3CR1⁺ y macrófagos en sujetos con numerosos trastornos, que incluyen trastornos inflamatorios y autoinmunitarios, que incluyen colitis ulcerosa (CU), enfermedad de Crohn (EC), artritis reumatoide (AR), hepatitis autoinmune (HAI), esclerosis múltiple (EM) y diabetes mellitus. Umehara et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24:34-40 (2004) describe la función de FKN en aterosclerosis y lesión vascular. Nishimura et al., *Ann. NY Acad. Sci.* 1173:350-356 (2009) trata FKN como una posible diana terapéutica para enfermedad inflamatoria del intestino tal como CU y EC.

Los anticuerpos y fragmentos de unión a FKN de anticuerpos son agentes terapéuticos deseables debido a su especificidad. Los anticuerpos y fragmentos de unión a FKN se pueden usar para dirigir células o tejidos específicos, minimizando así los posibles efectos secundarios del direccionamiento no específico. Existe una necesidad de identificar y caracterizar anticuerpos terapéuticos útiles en el tratamiento de trastornos inflamatorios, que incluyen los que se describen en el presente documento.

Los documentos US 2002/192212, Nanki T. et al. ("Inhibition of fractalkine ameliorates murine collagen-induced arthritis", *THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGISTS*, US vol. 173, Nº 11, 1 de diciembre de 2004, páginas 7010-7016, EP 1 806 145 y US 6.043.086 desvelan todos anticuerpos anti-FKN, pero ninguno es según la presente invención.

Sumario de la invención

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas y cualquier otro aspecto o realización expuesta en el presente documento es solo para información.

30 En un primer aspecto, la invención caracteriza un anticuerpo anti-FKN o su fragmento de unión a FKN, en el que el anticuerpo o su fragmento comprende una cadena pesada y una cadena ligera,

en el que la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26 y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de NO: 27,

35 la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36 y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de NO: 38,

la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36 y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de NO: 44,

la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37 y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de NO: 38,

40 la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37 y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de NO: 44, o

la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37 y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de NO: 45.

El anticuerpo puede ser un anticuerpo intacto. En un ejemplo, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.

45 En un ejemplo, el anticuerpo es un anticuerpo anti-fractalcina o su fragmento de unión a FKN, en el que el anticuerpo o su fragmento incluye una cadena pesada con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37 y una cadena ligera con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 44.

50 El anticuerpo también puede ser un anticuerpo quimérico. En un ejemplo, el dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo quimérico incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26 y el dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo quimérico incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27.

También se contemplan los fragmentos de unión a FKN de un anticuerpo. El fragmento de unión a FKN puede ser un fragmento Fab, Fab', F(ab')₂ o Fv que retiene la especificidad de unión a FKN.

5 En ciertos ejemplos, cuando el anticuerpo o su fragmento de unión a FKN incluye una región constante humana, la región constante es del isotipo IgG (por ejemplo, el isotipo IgG2). En otros ejemplos, el anticuerpo o fragmento de unión a FKN incluye una región Fc mutada de forma que el anticuerpo tiene ADCC y/o activación del complemento reducidas con respecto a la región Fc que carece de la mutación. Por ejemplo, la región Fc se puede mutar en uno o más de los restos de aminoácidos V234, G237, C131 o C219.

10 Deseablemente, el anticuerpo o fragmento de unión a FKN reduce o inhibe sustancialmente la unión de FKN a su receptor, CX3CR1, al menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, o más, o sustancialmente inhibe hFKN neutralizada en un ensayo de quimiotaxia tal como el descrito en el presente documento.

La invención también caracteriza una composición farmacéutica que incluye el anticuerpo o fragmento de unión a FKN de la presente invención y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones, la composición incluye uno o más agentes terapéuticos adicionales, tales como los descritos a continuación.

15 También se contempla un ácido nucleico que codifica un anticuerpo o fragmento de unión a FKN descrito anteriormente. En una realización, el ácido nucleico codifica toda o una porción de la cadena pesada del anticuerpo o su fragmento de unión a FKN. En otra realización, el ácido nucleico codifica toda o una porción de la cadena ligera del anticuerpo o su fragmento de unión a FKN. El ácido nucleico puede estar en un vector (por ejemplo, un vector de expresión).

20 La invención también caracteriza una célula hospedadora que incluye uno o más vectores de la invención. En un ejemplo, la célula hospedadora incluye dos vectores, incluyendo el primer vector un ácido nucleico que codifica una cadena pesada e incluyendo el segundo vector un ácido nucleico que codifica una cadena ligera de un anticuerpo o fragmento de unión a FKN descrito en el presente documento. La expresión de la cadena pesada y ligera en la célula hospedadora produce un anticuerpo o fragmento de unión a FKN. En una realización, la célula hospedadora es procariota. En otra realización, la célula hospedadora es eucariota. Células de mamífero a modo de ejemplo útiles para producir anticuerpos y fragmentos de unión a FKN son células CHO y células NSO.

25 La invención también caracteriza un método de preparación de un anticuerpo anti-FKN o su fragmento de unión a FKN. El método incluye (a) expresar un vector de la invención en una célula hospedadora adecuada, y (b) recuperar el anticuerpo. El anticuerpo o fragmento de unión a FKN se puede secretar por la célula hospedadora en medios de cultivo. En un ejemplo, el anticuerpo o su fragmento de unión a FKN se purifica retirando al menos 95 % o mayor pureza de los materiales distintos de anticuerpo.

30 También se contempla el uso de un anticuerpo anti-FKN o fragmento de unión a FKN según la invención en la preparación de un medicamento para su uso en el tratamiento de un trastorno inflamatorio. Los trastornos inflamatorios a modo de ejemplo son enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa. Para estos trastornos, el uso puede incluir además administrar uno o más agentes terapéuticos adicionales. Los agentes terapéuticos a modo de ejemplo son opiáceos, ácido 5-aminosalicílico, 6-mercaptopurina, azatioprina, glucocorticoides, metotrexato, ciclosporina y metronidazol. Otros agentes terapéuticos adecuados se describen a continuación.

35 Los trastornos inflamatorios que se pueden tratar administrando una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-FKN o fragmento de unión a FKN según la invención también incluyen enfermedades hepatobiliares autoinmunitarias (por ejemplo, hepatitis autoinmunitaria, cirrosis biliar primaria o colangitis esclerosante primaria). Para estos trastornos, el método puede incluir además administrar 6-mercaptopurina, ácido ursodesoxicólico, azatioprina, un glucocorticoide, un diurético de tiazida, un diurético de antialdosterona, ciclosporina, albúmina o espironolactona.

40 La artritis reumatoide (AR) también se puede tratar administrando una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-FKN o fragmento de unión a FKN según la invención. En el tratamiento de AR, el método puede incluir además administrar un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE), metotrexato, leflunomida, bucillamina, ácido 5-aminosalicílico, un glucocorticoide, hidrocloroquina, vitamina D, calcio o alendronato.

45 También se puede tratar lupus eritematoso sistémico (por ejemplo, lupus del sistema nervioso central o nefritis lúpica) administrando una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-FKN o fragmento de unión a FKN, tanto solo como en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales. Los agentes terapéuticos adicionales a modo de ejemplo son glucocorticoides, ciclofosfamida, metotrexato, ciclosporina y tacrolimus.

También se puede tratar esclerosis múltiple y neuromielitis óptica administrando una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-FKN o fragmento de unión a FKN. El tratamiento puede incluir además administrar uno o más agentes terapéuticos adicionales, tales como un glucocorticoide, interferón-β o Copaxone®.

55 También se puede tratar polirradiculopatía desmielinizante (por ejemplo, síndrome de Guillain-Barré o polirradiculopatía desmielinizante inflamatoria crónica) administrando una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-FKN o fragmento de unión a FKN. Otra vez, también se contempla la coterapia, y el tratamiento puede incluir además

administrar uno o más agentes terapéuticos adicionales, tales como un glucocorticoide o una inmunoglobulina intravenosa.

5 La administración de una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-FKN o fragmento de unión a FKN también puede ser útil para el tratamiento de dolor neuropático, tanto solo como en combinación con un agente terapéutico adicional. Agentes adicionales a modo de ejemplo para el tratamiento de dolor neuropático son lamotrigina, topiramato, oxcarbazepina, levetiracetam, fentanilo, tramadol, capsaicina, cloridina, un AINE, amitriptilina, pregabalina, lidocaína, duloxetine y carbamazepina.

10 También se puede tratar enfermedad de Alzheimer administrando una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-FKN o fragmento de unión a FKN. El método puede incluir además administrar uno o más agentes terapéuticos adicionales, tales como clorhidrato de tacrina, clorhidrato de donepezilo, tartrato de rivastigmina, bromhidrato de galantamina, clorhidrato de memantina, paroxetina, risperidona, quetiapina o perospirona.

También se puede tratar dolor visceral asociado al cáncer administrando una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-FKN o fragmento de unión a FKN, tanto solo como en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales, tales como morfina, un AINE, fentanilo, lidocaína, pentazocina o clonidina.

15 También se puede tratar aterosclerosis administrando una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-FKN o fragmento de unión a FKN. El método puede incluir además administrar uno o más agentes terapéuticos adicionales, tales como prostaciclina, aspirina, clopidogrel, ticlopidina, limaprost, prostaglandina E1, un inhibidor de HMG CoA reductasa, bezafibrato, lidocaína, mexiletina, un diurético, digitalis, dopamina, un agonista de receptores P-adrenérgicos, dinitrato de isosorbida, nitroglicerina, un péptido natriurético, warfarina, heparina, activador tisular del plasminógeno, urocinasa o procainamida.

20 También se pueden tratar vasculopatías (por ejemplo, degeneración macular senil, enfermedad de Behcet, enfermedad de Harada y uveítis originada por sarcoidosis) administrando una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-FKN o fragmento de unión a FKN según la invención. El método puede incluir además administrar uno o más agentes terapéuticos adicionales seleccionados de glucocorticoides, ciclofosfamida, pegaptanib, ranibizumab, AINE, colchicina, clorambucilo, talidomida y verteporfina.

25 Las nefropatías (por ejemplo, nefritis lúpica, glomerulonefritis o nefropatía diabética) también se pueden tratar administrando una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-FKN o fragmento de unión a FKN según la invención. Se pueden incluir en los métodos de tratamiento glucocorticoides, sulfonilurea, ciclofosfamida, glinidas, ciclosporina, tacrolimus, micofenolato mofetilo, mizoribina, diuréticos, insulina, biguanida, inhibidores de α -glucosidasa, bloqueantes de receptores de angiotensina, tiazolidindiona, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE), bloqueantes de los canales de calcio, o inhibidores de receptores p-adrenérgicos, se pueden incluir en los métodos de tratamiento inhibidores de los receptores adrenérgicos.

La invención también se refiere a un anticuerpo anti-FKN o fragmento de unión a FKN según la invención para su uso en el tratamiento de cualquiera de los trastornos inflamatorios descritos en el presente documento.

35 También se puede usar una estrategia *ex vivo* para aplicaciones terapéuticas. Las estrategias *ex vivo* implican transfectar o transducir células obtenidas del sujeto con un polinucleótido que codifica un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Las células transfectadas o transducidas se devuelven entonces al sujeto. Las células pueden ser cualquiera de un amplio intervalo de tipos que incluyen, sin limitación, células hemopoyéticas (por ejemplo, células de la médula ósea, macrófagos, monocitos, células dendríticas, linfocitos T o linfocitos B), fibroblastos, células epiteliales, células endoteliales, queratinocitos o células musculares.

40 Con el fin de la presente invención, se definen a continuación las siguientes abreviaturas y términos.

45 El término "anticuerpo" (usado en el presente documento indistintamente con "inmunoglobulina") incluye anticuerpos monoclonales y policlonales intactos, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpos que presentan la actividad biológica deseada (por ejemplo, la capacidad de unirse a FKN y modular la interacción entre FKN y CX3CR1). Los "anticuerpos intactos" son glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 dáltones, compuestos de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera se une a una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente, mientras que el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro regularmente separados entre las cadenas. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (VH) seguido por varios dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (VL) y un dominio constante en su otro extremo. El dominio constante de la cadena ligera se alinea con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera se alinea con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que restos de aminoácidos particulares forman una interfase entre los dominios variables de la cadena ligera y cadena pesada.

55 Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de éstas se pueden dividir además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂. Un anticuerpo puede ser parte de una molécula de fusión mayor, formada por la asociación covalente o no covalente del anticuerpo con una o varias

de otras proteínas o péptidos. Un anticuerpo también puede ser parte de un inmunocombinado, en el que el anticuerpo se conjuga con una segunda molécula (por ejemplo, una toxina, radioisótopo o marca).

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 homogénea, es decir, los anticuerpos individuales son idénticos, excepto por posibles mutaciones que pueden estar presentes en cantidades menores.

Formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos son anticuerpos o sus fragmentos que contienen una región estructural (FR) que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana y una región determinante de la complementariedad (CDR) que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina no humana (es decir, la secuencia de "importación"). En algunos casos, los restos de la región estructural de la inmunoglobulina humana se sustituyen por restos no humanos correspondientes. Se pueden hacer modificaciones adicionales del anticuerpo humanizado para refinar el rendimiento del anticuerpo.

Por "región determinante de la complementariedad" o "CDR" se indica una de las tres secuencias hipervariables en las regiones variables dentro de cada una de las cadenas ligeras y pesadas de la inmunoglobulina.

Por "región estructural" o "FR" se indica las secuencias de aminoácidos localizadas en cualquier lado de las tres CDR de las cadenas ligeras y pesadas de la inmunoglobulina.

No se necesita que las FR y CDR de un anticuerpo humanizado correspondan con precisión a las secuencias parentales, por ejemplo, las CDR de importación o las FR consenso se pueden mutagenizar por sustitución, inserción o delección de al menos un resto de manera que el resto de CDR o FR en ese sitio no corresponda a ninguna de la secuencia consenso o de importación. Dichas mutaciones, sin embargo, generalmente no serán amplias. Normalmente, al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % de los restos de anticuerpo humanizado corresponderán a los restos de las secuencias parentales.

Se indica que el término "aproximadamente", como se usa en el presente documento, cuando se refiere a un valor medible tal como una cantidad, una duración temporal, y similares, engloba variaciones de hasta $\pm 20\%$, preferentemente $\pm 10\%$, más preferentemente $\pm 5\%$, incluso más preferentemente $\pm 2\%$ desde el valor especificado, ya que dichas variaciones son apropiadas para realizar los métodos desvelados. A menos que se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades de componentes, propiedades tales como peso molecular, condiciones de reacción, etc., usadas en la memoria descriptiva e reivindicaciones se deben entender como que están modificadas en todos los casos por el término "aproximadamente". Por consiguiente, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos expuestos en la siguiente memoria descriptiva y reivindicaciones adjuntas son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se busca obtener por la presente invención. Por lo menos, y no como un intento por limitar la aplicación de la doctrina de equivalentes al alcance de las reivindicaciones, cada parámetro numérico se debe interpretar al menos en vista del número de dígitos significativos informados y aplicando técnicas habituales de redondeo.

Por "una cantidad suficiente" o "cantidad eficaz" se indica la cantidad de un anticuerpo terapéutico o su composición farmacéutica requerido para tratar o mejorar un trastorno, tal como un trastorno inflamatorio, en un modo clínicamente relevante. Una cantidad suficiente de un anticuerpo anti-FKN terapéutico, fragmento de unión a FKN o su composición farmacéutica usada para poner en práctica la presente invención para el tratamiento terapéutico de, por ejemplo, un trastorno inflamatorio varía dependiendo del modo de administración, edad y salud general del paciente.

"Afinidad de unión" se refiere generalmente a la intensidad de la suma total de las interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su componente de unión (por ejemplo, un antígeno). La afinidad de unión se puede representar por la constante de disociación (Kd). La afinidad se puede medir por métodos conocidos en la técnica, que incluyen ensayos de unión a FKN radiomarcado (RIA) o por ensayos de resonancia de plasmones superficiales (por ejemplo, BIACORE®).

Anticuerpos "quiméricos" o "quimerizados" (es decir, inmunoglobulinas) se refiere a anticuerpos en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica a u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenece a una clase o subclase particular de anticuerpo, mientras que el resto de la(s) cadena(s) sea idéntico u homólogo a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de tales anticuerpos, mientras que presenten la actividad biológica deseada (Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:6851-6855, 1984).

Por "epítotope" o "determinante antigénico" se indica una secuencia de aminoácidos que, ya sea como resultado de la estructura lineal o conformación tridimensional, forma el sitio de unión para un anticuerpo. Un epítotope conformacional, que puede incluir secciones discontinuas de una secuencia de aminoácidos del antígeno, interacciona con un anticuerpo como resultado de la estructura terciaria del epítotope. A diferencia, un epítotope lineal es un epítotope que es reconocido por anticuerpos basándose en su estructura primaria. En una realización, el epítotope de la fractalina que forma la interfase mínima con Fab incluye, por ejemplo, E66-Q69, W81-Q87, H70-F73 y H88-D90.

Los términos "expresar" y "producir" se usan sinónimamente en el presente documento, y se refieren a la biosíntesis de un producto génico. Estos términos engloban la transcripción de un gen en ARN. Estos términos también engloban la traducción de ARN en uno o más polipéptidos, y engloban además todas las modificaciones postranscripcionales y postraduccionales que existen de forma natural. La expresión/producción de un anticuerpo puede ser dentro del citoplasma de la célula, y/o en el medio extracelular, tal como el medio de crecimiento de un cultivo celular.

Por "fractalcina", "FKN", "FK" o "neurotactina" se indica un polipéptido que es homólogo al polipéptido definido por SEQ ID NO: 1 (Figura 1) y que tiene actividad biológica de FKN (por ejemplo, se une al receptor de CX3CR1; quimioatrae linfocitos T y monocitos; o promueve la adhesión de leucocitos a células endoteliales activadas). La actividad biológica de un polipéptido FKN se puede ensayar usando cualquier método convencional. Como se usa en el presente documento, FKN también incluye cualquier miembro de la familia FKN o isoforma. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. Nº 7.390.490, documento WO 2006/046739 y la publicación de solicitud de patente de EE.UU. Nº 2006/0233710.

Un "fragmento de unión a FKN" incluye una porción de un anticuerpo intacto, que comprende su región de unión de FKN y capaz de unirse a FKN. Los fragmentos de unión a FKN pueden ser fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ o Fv; diacuerpos; triacuerpos; tetracuerpos; minianticuerpos; moléculas de Affibody; minicuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenario; o anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

Por "homólogo" se indica cualquier gen o secuencia de proteínas que posea al menos 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o más homología con un gen conocido o secuencia de proteínas a lo largo de la longitud de la secuencia de comparación. Una proteína "homóloga" también puede tener al menos una actividad biológica de la proteína de comparación. Para polipéptidos, la longitud de secuencias de comparación generalmente será al menos 15, 20, 25, 35 o más aminoácidos. Para ácidos nucleicos, la longitud de secuencias de comparación generalmente será al menos 50, 60, 75, 100, 125 o más nucleótidos. "Homología" también se puede referir a una similitud sustancial entre un epítipo usado para generar anticuerpos y la proteína o su fragmento a la que se dirigen los anticuerpos. En este caso, homología se refiere a una similitud suficiente para provocar la producción de anticuerpos que pueden reconocer específicamente la proteína en cuestión.

"Anticuerpo humano" significa que el anticuerpo es o bien únicamente de origen humano o cualquier anticuerpo en el que las secuencias de dominio variable y constante son secuencias humanas o secuencias de anticuerpos humanos. El término engloba anticuerpos con secuencias derivadas de (es decir, que utilizan) genes humanos, pero que han sido cambiados, por ejemplo, para reducir la posible inmunogenicidad, aumentar la afinidad, eliminar las cisteínas que pueden causar plegamiento no deseable, etc. El término engloba tales anticuerpos producidos recombinantemente en células no humanas, que pueden conferir glucosilación no típica de células humanas.

"Híbrido" se refiere al producto de una fusión celular entre un linfocito neoplásico cultivado y un linfocito B o T sensibilizado, que expresa el potencial inmunitario específico de la célula parental.

Un "trastorno inflamatorio", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier enfermedad, trastorno o afección en la que el sistema inmunitario se activa anormalmente. El trastorno inflamatorio puede ser, por ejemplo, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, enfermedad inflamatoria del intestino, artritis reumatoide, miositis, esclerosis múltiple, neuromielitis óptica, aterosclerosis, psoriasis, lupus eritematoso sistémico (por ejemplo, lupus del sistema nervioso central o nefritis lúpica), nefritis, glomerulonefritis, enfermedad hepatoiliar autoinmunitaria (por ejemplo, hepatitis autoinmunitaria, cirrosis biliar primaria o colangitis esclerosante primaria), enfermedad injerto contra huésped, dermatitis atópica, asma, enfermedad neurodegenerativa (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer), polirradiculopatía desmielinizante (por ejemplo, síndrome de Guillain-Barré o polirradiculopatía desmielinizante inflamatoria crónica), dolor neuropático, dolor visceral del cáncer, aterosclerosis, degeneración macular senil, nefropatía diabética, uveítis originada por sarcoidosis o diabetes mellitus.

Alternativamente, la enfermedad, trastorno o afección es una enfermedad de las vías respiratorias superiores o inferiores, por ejemplo, traqueobronquitis linfomatosa; hipersensibilidad alérgica o una afección de hipersecreción, tal como bronquitis crónica y fibrosis quística; fibrosis pulmonar de diversas etiologías (por ejemplo, fibrosis pulmonar idiopática); enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC); sarcoidosis; alérgica y rinitis no alérgica; urticaria alérgica o no alérgica; una enfermedad relacionada con la piel caracterizada por inflamación desregulada, remodelación tisular, angiogénesis y neoplasia; una enfermedad del tubo gastrointestinal, tal como enfermedad de Hirschsprung, diarrea, afecciones de malabsorción y afecciones inflamatorias; un trastorno del sistema nervioso central y periférico, tal como depresión, estados de ansiedad, enfermedad de Parkinson, migraña y otras formas de dolor craneal, accidentes cerebrovasculares y emesis; una enfermedad del sistema inmunitario, tal como en los tejidos esplénicos y linfáticos, una enfermedad autoinmunitaria, u otra enfermedad inmunorrelacionada; una enfermedad del sistema cardiovascular, tal como edema pulmonar, hipertensión, preeclampsia, síndrome de dolor regional complejo de tipo 2 y accidente cerebrovascular; enfermedad inflamatoria crónica, tal como artritis; una enfermedad relacionada con los huesos; dolor crónico, tal como fibromialgia; y otros trastornos en los que la acción de neuroquininas, taquiquininas u otras sustancias relacionadas (por ejemplo, hemoquininas) participa en la patogénesis, patología y etiología.

Ejemplos adicionales de trastornos inflamatorios son acné vulgar; síndrome disneico agudo; enfermedad de Addison; enfermedades inflamatorias intraoculares alérgicas; vasculitis de vasos pequeños asociada a ANCA; espondilitis anquilosante; anemia hemolítica autoinmune; enfermedad de Behcet; parálisis de Bell; penfigoide bulloso; isquemia cerebral; cirrosis; síndrome de Cogan; dermatitis de contacto; síndrome de Cushing; dermatomiositis; lupus eritematoso discoide; fascitis eosinofílica; eritema nodoso; dermatitis exfoliativa; glomeruloesclerosis focal; glomeruloesclerosis segmentaria focal; glomeruloesclerosis segmentaria; arteritis de células gigantes; gota; artritis gotosa; eccema de manos; púrpura de Henoch-Schonlein; herpes gestacional; hirsutismo; queratoescleritis idiopática; púrpura trombocitopénica idiopática; trastornos intestinales o gastrointestinales inflamatorios por púrpura trombocitopénica inmunitaria; dermatosis inflamatoria; liquen plano; traqueobronquitis linfomatosa; edema macular; miastenia grave; enfermedad pulmonar fibrosante no específica; osteoartritis; pancreatitis; penfigoide gestacional; pénfigo vulgar; periodontitis; poliarteritis nodosa; polimialgia reumática; prurito escrotal; prurito/inflamación; artritis psoriásica; histoplasmosis pulmonar; policondritis recidivante; rosácea; sarcoidosis; esclerodermia; síndrome de choque séptico; tendinitis o bursitis en el hombro; síndrome de Sjogren; enfermedad de Still; enfermedad de Sweet; esclerosis sistémica; arteritis de Takayasu; arteritis temporal; necrólisis epidérmica tóxica; rechazo de trasplante y síndromes relacionados con el rechazo de trasplante; tuberculosis; diabetes de tipo 1; vasculitis; enfermedad de Vogt-Koyanagi-Harada (VKH); y granulomatosis de Wegener.

"Aislado" o "purificado" significa alterado "por la mano del hombre" desde el estado natural. Si una molécula o composición ocurre en la naturaleza, se ha "aislado" o "purificado" si se ha cambiado o eliminado de su entorno original, o ambos. Por ejemplo, un polinucleótido o un polipéptido naturalmente presente en una planta o animal vivo no se "aisla" o "purifica", pero el mismo polinucleótido o polipéptido separado de los materiales coexistentes de su estado natural se "aisla" o "purifica" como el término se emplea en el presente documento.

El término "operativamente unidas" o "operativamente insertadas" significa que las secuencias reguladoras necesarias para la expresión de la secuencia codificante se ponen en una molécula de ácido nucleico en las posiciones apropiadas con respecto a la secuencia codificante para permitir la expresión de la secuencia codificante. A modo de ejemplo, un promotor se une operativamente con una secuencia codificante cuando el promotor es capaz de controlar la transcripción o expresión de esa secuencia codificante. Las secuencias codificantes se pueden unir operativamente a promotores o secuencias reguladoras en una orientación sentido o antisentido. El término "operativamente unidas" se aplica algunas veces a la disposición de otros elementos de control de la transcripción (por ejemplo, potenciadores) en un vector de expresión.

"Polinucleótido", sinónimamente denominado "molécula de ácido nucleico", se refiere a cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser ARN o ADN no modificado o ARN o ADN modificado. Los "polinucleótidos" incluyen, sin limitación, ADN mono- y bicatenario, ADN que es una mezcla de regiones mono- y bicatenarias, ARN mono- y bicatenario, y ARN que es mezcla de regiones mono- y bicatenarias, moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que puede ser monocatenario, o, más normalmente, bicatenario o una mezcla de regiones mono- y bicatenarias. Además, "polinucleótido" se refiere a regiones de cadena triple que comprenden ARN o ADN o tanto ARN como ADN. El término polinucleótido también incluye ADN o ARN que contiene una o más bases modificadas y ADN o ARN con esqueletos modificados por estabilidad o por otros motivos. Las bases "modificadas" incluyen, por ejemplo, bases tritiladas y bases poco usuales tales como inosina. Se pueden preparar una variedad de modificaciones para ADN y ARN; así, "polinucleótido" engloba formas química, enzimática o metabólicamente modificadas de polinucleótidos que se encuentran normalmente en la naturaleza, así como las formas químicas de ADN y ARN características de virus y células. "Polinucleótido" también engloba cadenas de ácido nucleico relativamente cortas, frecuentemente denominadas oligonucleótidos.

"Polipéptido" se refiere a tanto cadenas cortas, comúnmente denominadas péptidos, oligopéptidos u oligómeros, como a cadenas más largas, generalmente denominadas proteínas. Los polipéptidos pueden contener aminoácidos distintos de los 20 aminoácidos codificados por los genes. Los "polipéptidos" incluyen secuencias de aminoácidos modificadas ya sea por procesos naturales, tales como procesamiento postraduccional, como por técnicas de modificación química que se conocen bien en la técnica. Tales modificaciones se describen bien en textos básicos y monografías más detalladas, así como en una voluminosa investigación bibliografía. Las modificaciones pueden ocurrir en cualquier sitio en un polipéptido, que incluye el esqueleto del péptido, las cadenas laterales de aminoácidos, y los extremos amino o carboxilo. Se apreciará que el mismo tipo de modificación puede estar presente en los mismos grados o grados variables en varios sitios en un polipéptido dado. Por tanto, un polipéptido dado puede contener muchos tipos de modificaciones. Los polipéptidos se pueden ramificar como resultado de ubiquitinación, y pueden ser cíclicos, con o sin ramificación. Los polipéptidos cíclicos, ramificados y cíclicos ramificados pueden resultar de procesos postraduccionales naturales o se pueden preparar por métodos de síntesis. Las modificaciones incluyen, por ejemplo, acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de un resto hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o derivado de lípido, unión covalente de fosfatidilinositol, reticulación, ciclación, formación de enlaces disulfuro, desmetilación, formación de reticulaciones covalentes, formación de cistina, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, glucosilación, formación de anclajes GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenilación, sulfatación y adición mediada por ARN transferente de aminoácidos a proteínas tales como arginilación, y ubiquitinación. Véanse, por ejemplo, *Proteins - Structure and Molecular Properties*, 2ª Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York, 1993 y Wold, F., *Posttranslational Protein Modifications: Perspectives and*

Prospects, pgs. 1-12 en Posttranslational Covalent Modification of Proteins, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, 1983; Seifter et al., Analysis for Protein Modifications and Nonprotein Cofactors, Meth Enzymol (1990) 182:626-646 y Rattan et al., Protein Synthesis: Posttranslational Modifications and Aging, Ann NY Acad Sci (1992) 663:48-62.

5 Por "se une específicamente a" se indica que un anticuerpo o su fragmento reconoce y se une al antígeno (por ejemplo, FKN o un fragmento de la misma), pero que no reconoce sustancialmente y se une a otras moléculas en una muestra (por ejemplo, una muestra biológica). "Específicamente" se indica para distinguir la adhesividad no específica de bajo nivel que puede algunas veces ocurrir entre proteínas al azar, por ejemplo, con dominios hidrófilos expuestos. No se pretende implicar que el anticuerpo no se una a cualquier proteína distinta del antígeno de la invención. Los anticuerpos podrían reaccionar de forma cruzada (y "unirse específicamente") con cualquier proteína que incluye el epítipo relevante.

10 Por "sujeto" se indica cualquier animal, por ejemplo, un mamífero (por ejemplo, un humano). Un sujeto que está siendo tratado para, por ejemplo, un trastorno inflamatorio es uno que ha sido diagnosticado por un médico o veterinario, según sea el caso, que tiene dicha afección. El diagnóstico se puede realizar por cualquier medio adecuado. Un experto en la técnica entenderá que los sujetos de la invención se pueden someter a pruebas estándar o se pueden identificar, sin examen, como uno que tiene alto riesgo debido a la presencia de uno o más factores de riesgo, tales como la edad, genética o antecedentes familiares.

15 Una célula se ha "transformado" o "transfectado" por ácidos nucleicos exógenos o heterólogos tales como ADN cuando dicho ADN se ha introducido dentro de la célula. El ADN puede o puede no integrarse (por ejemplo, unirse covalentemente) en el genoma de la célula. En procariontes, levadura y células de mamífero, por ejemplo, el ADN transformante se puede mantener en un elemento episómico tal como un plásmido. Con respecto a las células eucariotas, una célula establemente transformada, o "célula estable", es una en la que el ADN transformante se ha llegado a integrar en un cromosoma de manera que es heredado por células hija mediante replicación cromosómica. Esta estabilidad se demuestra por la capacidad de la célula eucariota para establecer líneas celulares o clones comprendidos de una población de células hija que contiene el ADN transformante. Un "clon" es una población de células derivada de una única célula o ancestro común por mitosis. Una "línea celular" es un clon de una célula primaria que es capaz de crecimiento estable *in vitro* durante muchas generaciones.

20 Por "tratar" se indica administrar un anticuerpo terapéutico o una composición farmacéutica del mismo para fines profilácticos y/o terapéuticos. "Tratar una enfermedad o trastorno" o uso para "tratamiento terapéutico" se refiere a administrar el tratamiento a un sujeto que ya padece una enfermedad para mejorar la afección del sujeto. El sujeto se puede diagnosticar con un trastorno inflamatorio basándose en la identificación de cualquiera de los síntomas característicos o el uso de los métodos de diagnóstico conocidos por un experto en la técnica. "Prevenir una enfermedad o trastorno" se refiere al tratamiento profiláctico de un sujeto que todavía no está enfermo, pero que es susceptible a, o está de otro modo en riesgo de, desarrollar una enfermedad particular. Se determina que un sujeto está en riesgo de desarrollar un trastorno inflamatorio usando los métodos de diagnóstico conocidos en la técnica.

30 Un "vector" es un replicón, tal como plásmido, fago, cósmido o virus, en el que otro segmento de ácido nucleico puede ser operativamente insertado de manera que provoque la replicación o expresión del segmento.

35 Como se usa en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una", "el" y "la" incluyen referentes plurales, a menos que el contexto dicte claramente de otro modo. Así, por ejemplo, referencia a "una célula" incluye una combinación de dos o más células, y similares.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción detallada y de las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es la secuencia de aminoácidos de FKN humana.

45 La Figura 2 es una tabla que muestra las características de unión (es decir, actividad neutralizante, afinidad de unión y reactividad cruzada de especies) de anticuerpos monoclonales anti-FKN.

50 La Figura 3 es un alineamiento de las regiones variables de la cadena pesada de las secuencias de mAb anti-FKN humanizados (SEQ ID NOS 36-37 y 42-43, respectivamente, en orden de aparición), la secuencia de m3A5-2 (SEQ ID NO: 26), la secuencia de Ig de la línea germinal (SEQ ID NO: 40) y la secuencia de AAA68427.1 (SEQ ID NO: 34).

La Figura 4 es un alineamiento de las regiones variables de la cadena ligera de las secuencias de mAb anti-FKN humanizados (SEQ ID NOS 38 y 44-45, respectivamente, en orden de aparición), la secuencia de m3A5-2 (SEQ ID NO: 27), la secuencia de Ig de la línea germinal (SEQ ID NO: 41) y la secuencia de ABU90602.1 (SEQ ID NO: 35).

La Figura 5 es una tabla que resume los resultados de tres ensayos independientes de quimiotaxia. Se analizaron las actividades neutralizantes de mAb anti-hFKN humanizados usando un ensayo de quimiotaxia. Todas las combinaciones de H3 y H3-2 con L2 y L4 fueron satisfactoriamente humanizadas, ya que estos mAb mostraron actividad neutralizante similar con el mAb quimérico. Sin embargo, HK2, que se preparó usando restos clave reducidos, mostró actividad neutralizante reducida en combinación con L2 o L4.

Las Figuras 6A y 6B representan una serie de gráficos que muestran las actividades neutralizantes de mAb m3A5-2 y mAb quimérico. La Figura 6A es un gráfico que muestra la actividad neutralizante de mAb m3A5-2 como se ha determinado por un ensayo de quimiotaxia. La Figura 6B es un gráfico que muestra la actividad neutralizante del mAb quimérico como se ha determinado por un ensayo de quimiotaxia.

Las Figuras 7A-7D representan una serie de gráficos que muestran las actividades neutralizantes de anticuerpos anti-hFKN humanizados como se ha determinado por un ensayo de quimiotaxia. La Figura 7A muestra la actividad neutralizante de H3L2-IgG2. La Figura 7B muestra la actividad neutralizante de H3-L4-IgG2. La Figura 7C muestra la actividad neutralizante de HK2L2-IgG2. La Figura 7D muestra la actividad neutralizante de HK2L4-IgG2.

Las Figuras 8A-8F representan una serie de gráficos que muestran las actividades neutralizantes de anticuerpos anti-hFKN humanizados como se ha determinado por un ensayo de quimiotaxia. La Figura 8A muestra la actividad neutralizante de H3-2L2-IgG2. La Figura 8B muestra la actividad neutralizante de H3-2L4-IgG2. La Figura 8C muestra la actividad neutralizante de H3-2L5-IgG2. La Figura 8D muestra la actividad neutralizante de HK3L2-IgG2. La Figura 8E muestra la actividad neutralizante de HK3L4-IgG2. La Figura 8F muestra la actividad neutralizante de HK3L5-IgG2.

La Figura 9 es una tabla que resume los resultados de ensayos BIACORE® usados para medir la afinidad de unión de los mAb por hFKN y FKN de mono cinomolgo.

Las Figuras 10A-10C representan una serie de gráficos que muestran las afinidades de unión de los anticuerpos anti-hFKN quiméricos y humanizados (H3L2, H3-2L2, H3L4, H3-2L4 y HK2L4) a hFKN-SEAP y FKN de mono cinomolgo-SEAP como se ha determinado por un ensayo BIACORE®. La Figura 10A es un gráfico de barras que muestra los valores de K_a (1/Ms). La Figura 10B es un gráfico de barras que muestra los valores de K_D (1/s). La Figura 10C es un gráfico de barras que muestra los valores de K_D (M).

La Figura 11 representa los resultados del mapeo de epítopes usando bibliotecas de péptidos sintéticos de solapamiento (SEQ ID NOS 115-135, respectivamente, en orden de aparición) desde el dominio de quimiocinas de FKN.

La Figura 12 representa los resultados del mapeo de epítopes de hFKN usando ELISA.

La Figura 13 representa los resultados del mapeo de epítopes de hFKN usando BIACORE®.

La Figura 14 muestra los resultados del experimento de saturación cruzada para identificar el sitio de unión Fab en fractalcina. El gráfico muestra que las regiones E66-Q69, W81-Q87, H70-F73 y H88-D90 de FKN están incluidas en la interfase mínima con Fab.

Descripción detallada

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas y cualquier otro aspecto o realización expuesto en el presente documento es solo para información.

Los presentes inventores han diseñado y aislado anticuerpos anti-FKN quiméricos, anticuerpos anti-FKN humanizados y fragmentos de unión a FKN de los mismos. Los anticuerpos anti-FKN humanizados y fragmentos de unión a FKN de los mismos caracterizados en el presente documento se pueden usar para tratar trastornos inflamatorios. Dichos anticuerpos también se pueden usar para inhibir el reclutamiento de leucocitos hasta un sitio de inflamación. Los trastornos inflamatorios que se pueden tratar según la invención incluyen colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, enfermedad inflamatoria del intestino, artritis reumatoide, miositis, esclerosis múltiple, neuromielitis óptica, aterosclerosis, psoriasis, lupus eritematoso sistémico (por ejemplo, lupus del sistema nervioso central o nefritis lúpica), nefritis, glomerulonefritis, enfermedad hepatoiliar autoinmunitaria (por ejemplo, hepatitis autoinmunitaria, cirrosis biliar primaria o colangitis esclerosante primaria), enfermedad injerto contra huésped, dermatitis atópica, asma, enfermedad neurodegenerativa (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer), polirradiculopatía desmielinizante (por ejemplo, síndrome de Guillain-Barré o polirradiculopatía desmielinizante inflamatoria crónica), dolor neuropático, dolor visceral del cáncer, aterosclerosis, degeneración macular senil, nefropatía diabética, uveítis originada por sarcoidosis, diabetes mellitus, traqueobronquitis linfomatosa, hipersensibilidad alérgica o una afección de hipersecreción, tal como bronquitis crónica y fibrosis quística, fibrosis pulmonar de diversas etiologías (por ejemplo, fibrosis pulmonar idiopática), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), sarcoidosis, rinitis alérgica y no alérgica, urticaria alérgica o no alérgica, una enfermedad relacionada con la piel caracterizada por inflamación desregulada, remodelación tisular, angiogénesis y neoplasia, una enfermedad del tubo gastrointestinal, tal como enfermedad de Hirschsprung, diarrea, afecciones de malabsorción y afecciones inflamatorias, un trastorno del

sistema nervioso central y periférico, tal como depresión, estados de ansiedad, enfermedad de Parkinson, migraña y otras formas de dolor craneal, accidentes cerebrovasculares y emesis, una enfermedad del sistema inmunitario, tal como en los tejidos esplénicos y linfáticos, una enfermedad autoinmunitaria u otra enfermedad relacionada con la inmunidad, una enfermedad del sistema cardiovascular, tal como edema pulmonar, hipertensión, preeclampsia, síndrome de dolor regional complejo de tipo 2 y accidente cerebrovascular, enfermedad inflamatoria crónica, tal como artritis, una enfermedad relacionada con los huesos, dolor crónico, tal como fibromialgia, acné vulgar, síndrome diséico agudo, enfermedad de Addison, enfermedades inflamatorias intraoculares alérgicas, vasculitis de vasos pequeños asociada a ANCA, espondilitis anquilosante, anemia hemolítica autoinmunitaria, enfermedad de Behcet, parálisis de Bell, penfigoide bulloso, isquemia cerebral, cirrosis, síndrome de Cogan, dermatitis de contacto, síndrome de Cushing, dermatomiositis, lupus eritematoso discoide, fascitis eosinofílica, eritema nodoso dermatitis exfoliativa, glomeruloesclerosis focal, glomeruloesclerosis segmentaria focal, glomeruloesclerosis segmentaria, arteritis de células gigantes; gota, artritis gotosa, eccema de manos; púrpura de Henoch-Schonlein, herpes gestacional, hirsutismo; queratoescleritis idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática, trastornos intestinales o gastrointestinales inflamatorios por púrpura trombocitopénica inmunitaria, dermatosis inflamatoria, liquen plano, traqueobronquitis linfomatosa, edema macular, miastenia grave, enfermedad pulmonar fibrosante no específica, osteoartritis, pancreatitis, penfigoide gestacional, pénfigo vulgar; periodontitis, poliarteritis nodosa; polimialgia reumática, prurito escrotal, pruritis/inflamación, artritis psoriásica, histoplasmosis pulmonar, policondritis recidivante, rosácea, sarcoidosis, esclerodermia, síndrome de choque séptico, tendinitis o bursitis en el hombro, síndrome de Sjogren, enfermedad de Still; enfermedad de Sweet, esclerosis sistémica; arteritis de Takayasu, arteritis temporal, necrólisis epidérmica tóxica, rechazo de trasplante y síndromes relacionados con el rechazo de trasplante, tuberculosis, diabetes de tipo 1, vasculitis, enfermedad de Vogt-Koyanagi-Harada (VKH) y granulomatosis de Wegener.

Anticuerpos

Se conocen bien en la técnica los métodos de preparación y purificación de anticuerpos o fragmentos de unión a FKN de los mismos. Véanse, por ejemplo, Kohler et al., *Nature* 256:495-497 (1975); Hongo et al., *Hybridoma* 14:253-260 (1995); Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press), 2ª ed. (1988); Hammerling et al., *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* (Elsevier), 563-681 (1981); Ni, Xiandai Mianyixue, 26:265-268 (2006); patentes de EE.UU. Nº 7.189.826; 7.078.492; y 7.153.507; Vollmers y Brandlein, *Histology and Histopathology* 20:927-937 (2005); Vollmers y Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology* 27:185-191 (2005); documentos US 2006/258841; US 2006/183887; US 2006/059575; US 2005/287149; US 2005/100546; y US 2005/026229.

Anticuerpos quiméricos

Se conocen bien y están establecidos en la técnica los anticuerpos quiméricos y métodos para producirlos. Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo quimérico" significa un anticuerpo, o fragmento de unión a FKN del mismo, que tiene al menos alguna porción de al menos un dominio variable derivada de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo de un mamífero no humano, un roedor, o un reptil, mientras que las porciones restantes del anticuerpo, o su fragmento de unión a FKN, derivan de un ser humano. Por ejemplo, un anticuerpo quimérico puede comprender un dominio de unión al antígeno de ratón con un dominio Fc humano u otro dominio estructural tal.

Anticuerpos humanizados

La invención engloba anticuerpos anti-FKN humanizados y fragmentos de unión a FKN de los mismos como se reivindica que, por ejemplo, modulan la interacción entre FKN y CX3CR1. La humanización se puede realizar por medio del método de injerto de la región determinante de la complementariedad (CDR) (Kontermann y Dübel, *Antibody Engineering*, Springer Lab Manual (2001) y Tsurushita et al., *Methods* 36:69-83 (2005)). La humanización también se puede realizar siguiendo los métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323-327 (1988); y Verhoeven et al., *Science* 239:1534-1536 (1988)) sustituyendo las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano por las secuencias de la región hipervariable. Los anticuerpos humanizados normalmente son anticuerpos humanos en los que algunos restos de la región hipervariable y posiblemente algunos restos de FR se sustituyen por restos de sitios análogos en anticuerpos no humanos.

La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, que se van a usar en la preparación de los anticuerpos humanizados puede ser importante para reducir la antigenicidad. Según el método "de mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se criba contra la biblioteca completa de secuencias de dominio variable humano conocidas. Entonces se acepta la secuencia humana que está más próxima a la del roedor como la región estructural humana para el anticuerpo humanizado. Véanse, por ejemplo, Sims et al., *J. Immunol.* 151:2296-2308 (1993) y Chothia et al., *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987). Otro método usa una región estructural particular derivada de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. La misma región estructural se puede usar para varios anticuerpos humanizados diferentes. Véanse, por ejemplo, Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4285-4289 (1992) y Presta et al., *J. Immunol.* 151:2623-2632 (1993).

Es además generalmente deseable que los anticuerpos se humanicen con retención de alta afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este objetivo, según un método, los anticuerpos humanizados se preparan por un proceso de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulina están comúnmente disponibles y se conocen por los expertos en la técnica. Están disponibles programas informáticos que ilustran y muestran estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas presentaciones permite el análisis de la probable función de los restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de restos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta forma, se pueden seleccionar restos de FR y combinarse a partir de las secuencias de importación y de receptor de manera que se logre la característica del anticuerpo deseado, tal como la elevada afinidad por el (los) antígeno(s) diana (por ejemplo, FKN o un fragmento de la misma). En general, los restos de CDR están directa y principalmente sustancialmente implicados en influir la unión al antígeno.

Fragmentos de unión a FKN

En ciertas realizaciones de la invención, se proporcionan fragmentos de unión a FKN como se reivindica que modulan la interacción entre FKN y CX3CR1. Dichos fragmentos pueden ser fragmentos de unión al antígeno funcionales de anticuerpos intactos, humanizados y/o quiméricos, tales como fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, Fv o ScFv (véase, por ejemplo, Bird et al., Science 242:423-426 (1998)). Dichos fragmentos se producen por la digestión proteolítica de anticuerpos intactos por, por ejemplo, digestión con papaína (véase, por ejemplo, el documento WO 94/29348) directamente a partir de células hospedadoras recombinantemente transformadas. Los fragmentos de unión a FKN se pueden producir usando una variedad de técnicas de ingeniería descritas a continuación.

Los fragmentos Fv tienen una energía de interacción más baja entre sus dos cadenas que los fragmentos Fab. Para estabilizar la asociación de los dominios VH y VL, los fragmentos Fv se han asociado con péptidos (véase, por ejemplo, Bird et al., Science 242:423-426 (1998) y Huston et al., PNAS 85:5879-5883 (1998)), puentes disulfuro (véase, por ejemplo, Glockshuber et al., Biochemistry 29:1362-1367 (1990)) y mutaciones "botón en ojal" (véase, por ejemplo, Zhu et al., Protein Sci. 6:781-788 (1997)). Los fragmentos ScFv se pueden producir por métodos bien conocidos por los expertos en la técnica (véanse, por ejemplo, Whitlow et al., Methods Enzymol. 2:97-105 (1991) y Huston et al., Int. Rev. Immunol. 10:195-217 (1993)). ScFv se puede producir en células bacterianas tales como *E. coli*, pero también se puede producir en células eucariotas. Una desventaja de ScFv es la monovalencia del producto, que descarta un aumento de avidéz debido a la unión polivalente, y la corta semivida de los fragmentos ScFv. Los intentos por vencer estos problemas incluyen (ScFv)₂ bivalente producido a partir de ScFv que contiene una cisteína del extremo C adicional por acoplamiento químico (véanse, por ejemplo, Adams et al., Cancer Res. 53:4026-4034 (1993) y McCartney et al., Protein Eng. 8:301-314 (1995)) o por dimerización espontánea específica del sitio de ScFv que contiene un resto de cisteína no apareado del extremo C (véase, por ejemplo, Kipriyanov et al., Cell. Biophys. 26:187-204 (1995)). Alternativamente, se puede forzar que ScFv forme multímeros por acortamiento del conector peptídico hasta 3 a 12 restos para formar "diacuerpos" (véase, por ejemplo, Holliger et al., PNAS 90:6444-6448 (1993)). La reducción del conector puede además dar como resultado trímeros de ScFv para formar "triacuerpos" (véase, por ejemplo, Kortt et al., Protein Eng. 10:423-433 (1997)) y tetrámeros para formar "tetracuerpos" (véase, por ejemplo, Le Gall et al., FEBS Letters 453:164-168 (1999)). La construcción de moléculas bivalentes de ScFv también se puede lograr por fusión genética con motivos dimerizantes de proteína para formar "minianticuerpos" (véase, por ejemplo, Pack et al., Biochemistry 31:1579-1584 (1992)) y "minicuerpos" (véase, por ejemplo, Hu et al., Cancer Res. 56:3055-3061 (1996)). Los tándems ScFv-ScFv ((ScFv)₂) también se pueden producir uniendo dos unidades ScFv por un tercer conector peptídico (véase, por ejemplo, Kurucz et al., J. Immunol. 154:4576-4582 (1995)). Los diacuerpos biespecíficos se pueden producir mediante la asociación no covalente de dos productos de fusión monocatenarios que contienen un dominio VH de un anticuerpo conectado por un conector corto al dominio VL de otro anticuerpo (véase, por ejemplo, Kipriyanov et al., Int. J. Can. 77:763-772 (1998)). La estabilidad de dichos diacuerpos biespecíficos se puede potenciar por la introducción de puentes disulfuro o mutaciones "botón en ojal" o por formación de diacuerpos monocatenarios (ScDb), en el que dos fragmentos híbridos de ScFv se conectan mediante un conector peptídico (véanse, por ejemplo, Kontermann et al., J. Immunol. Methods 226:179-188 (1999)). La moléculas biespecíficas tetravalentes están disponibles por, por ejemplo, fusión de un fragmento ScFv con el dominio CH3 de una molécula IgG o con un fragmento Fab mediante la región bisagra (véase, por ejemplo, Coloma et al., Nature Biotechnol. 15:159-163 (1997)). Alternativamente, están disponibles moléculas biespecíficas tetravalentes por la fusión de diacuerpos biespecíficos monocatenarios (véase, por ejemplo, Alt et al., FEBS Letters 454:90-94 (1999)). También se pueden formar moléculas tetravalentes biespecíficas más pequeñas por la dimerización de cualquiera de los tándems scFv-ScFv con un conector que contiene un motivo de hélice-bucle-hélice (minianticuerpos DiBi) (véase, por ejemplo, Muller et al., FEBS Letters 432:45-49 (1998)) o una molécula monocatenaria que comprende cuatro dominios variables de anticuerpo (VH y VL) en una orientación que previene el emparejamiento intramolecular (diacuerpo en tándem) (véase, por ejemplo, Kipriyanov et al., J. Mol. Biol. 293:41-56 (1999)). Los fragmentos biespecíficos F(ab')₂ se pueden crear por acoplamiento químico de fragmentos Fab' o por heterodimerización mediante cremalleras de leucina (véase, por ejemplo, Shalaby et al., J. Exp. Med. 175:217-225 (1992) y Kostelny et al., J. Immunol. 148:1547-1553 (1992)). También están disponibles dominios VH y VL aislados (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. Nº 6.248.516; 6.291.158; y 6.172.197).

Formulaciones farmacéuticas

Las formulaciones terapéuticas que comprenden un anticuerpo o su fragmento de unión a FKN de la invención se pueden combinar con vehículos, excipientes o estabilizadores fisiológicamente aceptables en forma de formulaciones acuosas o secas. Los vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables incluyen, por ejemplo, solución salina; tampones, tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, que incluyen ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular; proteínas (por ejemplo, albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas); polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos; monosacáridos, disacáridos, y otros hidratos de carbono, que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; alcoholes de azúcar, tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sal, tales como sodio; o tensioactivos no iónicos, tales como TWEEN™, PLURONICS™, o PEG.

Los anticuerpos o fragmentos de unión a FKN de los mismos de la invención se pueden atrapar en microcápsulas, en sistemas coloidales de administración de fármacos (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas o nanocápsulas), o en macroemulsiones. Si se desea la administración de liberación sostenida del anticuerpo en una formulación con características de liberación adecuadas para el tratamiento de cualquier trastorno que requiera la administración del anticuerpo, se puede contemplar la microencapsulación del anticuerpo. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. Nº 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y L-glutamato de γ -etilo, copolímeros de etileno-acetato de vinilo no degradables, de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como the LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

Las formulaciones que se van a usar para la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se realiza fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles.

Terapias de combinación

Los anticuerpos terapéuticos o fragmentos de unión a FKN de los mismos de la invención se pueden usar tanto solos como en combinación con otras composiciones en una terapia. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención se puede coadministrar con uno o más de otro anticuerpo, agentes antiinflamatorios, agentes citotóxicos, agentes antiangiogénicos, citocinas, agentes inhibidores del crecimiento, o terapia anti-TNF- α . Dichas terapias combinadas incluyen administración combinada (donde los dos o más agentes se incluyen en las mismas formulaciones o formulaciones separadas) y administración separada (por ejemplo, simultáneamente o secuencialmente). Cuando se administran por separado dos o más agentes, la administración del anticuerpo de la invención puede ocurrir antes de o tras la administración de la terapia complementaria.

Las cantidades eficaces de agentes terapéuticos administradas en combinación con un anticuerpo anti-FKN o su fragmento de unión a FKN serán a criterio del médico. La determinación de la dosis se calcula para lograr el máximo tratamiento de las afecciones que se van a tratar. La dosis dependerá además de factores tales como el tipo de agente terapéutico que se va a usar y el sujeto específico que se está tratando. Se pueden reducir las dosis adecuadas debido a la acción combinada (sinergia) del agente terapéutico adicional y el anticuerpo anti-FKN o su fragmento de unión a FKN.

Agentes antiinflamatorios

Se puede administrar un compuesto antiinflamatorio en combinación con los anticuerpos o fragmentos de unión a FKN de la invención. Los agentes antiinflamatorios a modo de ejemplo incluyen esteroides, tales como un glucocorticoide, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (por ejemplo, ibuprofeno o tacrolimus), inhibidores específicos de la ciclooxigenasa-2 tales como rofecoxib (Vioxx®) y celecoxib (Celebrex®), corticosteroides (por ejemplo, prednisona o hidrocortisona), citocinas específicas dirigidas a la función de linfocitos T, flubiprofeno, diclofenaco y ketorolaco. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. Nº 7.112.578 y 7.199.119.

Otros agentes

Otros agentes terapéuticos que se pueden administrar incluyen, por ejemplo, aminosalicilatos (por ejemplo, ácido 5-aminosalicílico), sulfasalazina (por ejemplo, azulfadina), mesalamina (por ejemplo, Asacol® o Pentasa®), azatioprina (por ejemplo, Imuran®), 6-mercaptopurina (por ejemplo, Purinethol®), ciclosporina, metotrexato, infliximab (por ejemplo, Remicade®), interferones (por ejemplo, interferón-P), acetato de glatiramer (por ejemplo, Copaxone®), natalizumab (Tysabri®), anti-integrina $\alpha 4$, ácido ursodesoxicólico, clorhidrato de tacrina, inhibidor de HMG CoA reductasa, lidocaína, sulfonilurea, ciclofosfamida, inmunoglobulina intravenosa, amitriptilina, opiáceos (por ejemplo, morfina), difenoxilato, atropina, vitamina D, calcio, lamotrigina, quetiapina, prostaglandina E1, nitroglicerina, pegaptanib, ranibizumab, dinitrato de isosorbida, perospirona, topiramato, oxcarbacepina, dopamina, micofenolato mofetilo, mizoribina, levetiracetam, fentanilo, tramadol, digitalis, capsaicina, péptido natriurético, cloridina, -dronatos (por ejemplo, alendronato), bezafibrato, mexiletina, glinidas (por ejemplo, nateglinida o repaglinida), clorhidrato de donepezilo, leflunomida, pregabalina, tartrato de rivastigmina, fentanilo, prostaciclina, procainamida, colchicina, inhibidores de α -glucosidasa, diuréticos (por ejemplo, diuréticos de tiazida o diuréticos de aldosterona),

5 tacrolimus, clorhidrato de memantina, pentazocina, clopidogrel, activador tisular del plasminógeno, talidomida, receptor bloqueante de angiotensina, tiazolidindiona, metronidazol, espironolactona, duloxetine, paroxetina, clonidina, ticlopidina, heparina, bloqueantes de los canales de calcio, insulina, albúmina, bucilamina, carbamacepina, risperidona, limaprost, warfarina, verteporfina, gabapentina, bromhidrato de galantamina, aspirina, urocinasa, clorambucilo, inhibidor de la enzima convertora de angiotensina, biguanidas, inhibidores o agonistas de receptores β -adrenérgicos, hidroclooroquina y mitoxantrona.

10 El tratamiento de un trastorno descrito en el presente documento (por ejemplo, un trastorno inflamatorio) puede implicar además la administración de otras terapias. Por ejemplo, se puede usar la plasmaféresis (por ejemplo, terapia de intercambio de plasma) para tratar, por ejemplo, síndrome de Guillain-Barré, polirradiculopatía desmielinizante (por ejemplo, polirradiculopatía desmielinizante inflamatoria crónica), púrpura trombocitopénica trombótica (TTP), enfermedad de Behcet o esclerosis múltiple.

Dosis y administración

15 El alivio o tratamiento de un trastorno inflamatorio generalmente implica la reducción de uno o más síntomas o complicaciones asociados al trastorno. En el caso de trastornos inflamatorios, la cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo terapéutico, fragmentos de unión a FKN, o composición farmacéutica de los mismos, puede realizar uno o una combinación de los siguientes: reducir la inflamación; reducir el dolor abdominal o de tipo cólico; reducir la distensión abdominal; reducir o eliminar la diarrea; reducir la ulceración del tubo digestivo; reducir la fiebre; reducir o aliviar las náuseas; reducir la fatiga; minimizar la pérdida de peso; aliviar el dolor articular; reducir la hinchazón; aliviar el picor o las erupciones cutáneas; eliminar la ictericia; y/o aliviar uno o más de los síntomas asociados a un trastorno inflamatorio. La "cantidad terapéuticamente eficaz" del anticuerpo que se administra es la cantidad mínima necesaria para prevenir, mejorar o tratar un trastorno inflamatorio.

20 Los anticuerpos, fragmentos de unión a FKN y composición farmacéutica descritos en el presente documento se administran a un sujeto según métodos conocidos, tales como administración intravenosa como un bolo o por infusión continua durante un periodo de tiempo, por vía tópica, por vía oral, por vía subcutánea, por inyección bronquial, por vía intracerebral, por vía intranasal, por vía transdérmica, por vía intraperitoneal, por vía intramuscular, por vía intrapulmonar, por vía vaginal, por vía rectal, por vía intrarticular, por vía intrarterial, por vía intralesional, por vía parenteral, por vía intraventricular en el cerebro, o por vía intraocular. La administración local puede ser particularmente deseada si amplios efectos secundarios o toxicidad están asociados con el tratamiento.

25 Las formulaciones para uso oral también se pueden proporcionar como comprimidos masticables, o como cápsulas de gelatina dura, en las que el principio activo se mezcla con un diluyente sólido inerte, o como cápsulas de gelatina blanda en las que el principio activo se mezcla con agua o un medio de aceite.

30 También se puede usar una estrategia *ex vivo* para aplicaciones terapéuticas. Las estrategias *ex vivo* implican transfectar o transducir las células obtenidas del sujeto con un polinucleótido que codifica un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Las células transfectadas o transducidas se devuelven entonces al sujeto. Las células pueden ser cualquiera de un amplio intervalo de tipos que incluyen, sin limitación, células hemopoyéticas (por ejemplo, células de la médula ósea, macrófagos, monocitos, células dendríticas, linfocitos T o linfocitos B), fibroblastos, células epiteliales, células endoteliales, queratinocitos o células musculares.

35 La dosis y el momento preciso de la administración de las composiciones de la presente invención dependen de diversos factores clínicos, que incluyen la salud general del sujeto y la gravedad de los síntomas del trastorno inflamatorio. El tratamiento puede ser continuado durante un periodo de tiempo que varía desde 1 día hasta 4 años, 1 día hasta 3 años, 1 día hasta 2 años, 1 día hasta un año, 1 hasta 100 días, 1 hasta 60 días, 1 hasta 20 días, 1 hasta 10 días, o hasta que se traten o alivien el trastorno inflamatorio o síntomas del trastorno inflamatorio. Las composiciones de la presente invención se pueden administrar cuatro veces al día, tres veces al día, dos veces al día, diariamente, semanalmente, bimensualmente, mensualmente, cada dos meses, cada tres meses, o anualmente. Las dosis varían dependiendo de la gravedad de la afección y se valoran para lograr una concentración en suero sanguíneo en estado estacionario que varía desde aproximadamente 1 ng/ml hasta 10 μ g/ml, o 1 hasta 500 ng/ml. La cantidad de anticuerpo administrada normalmente está en el intervalo desde aproximadamente 0,001 hasta aproximadamente 30 mg/kg de peso de sujeto (por ejemplo, 0,01 hasta aproximadamente 10 mg/kg de peso de sujeto).

50 Ejemplos

La presente invención se ilustra por los siguientes ejemplos, que de ninguna forma están previstos para ser limitantes de la invención.

Ejemplo 1. Preparación de anticuerpos monoclonales de ratón anti-fractalcina humana (hFKN)

55 Se generaron anticuerpos monoclonales (mAb) anti-hFKN de ratón como se describe previamente (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 7.390.490, incorporada por este documento como referencia). Se obtuvieron clones de mAb neutralizantes 1F3-1, 3A5-2, 1F3, 1G1, 2B2, 3D5, 3H7, 6D1, 7F6 y 5H7-6.

Ejemplo 2. Selección de mAb candidatos para humanización

Se analizaron los clones 1F3-1, 3A5-2 y 5H7-6 usando ensayos de quimiotaxia para medir la actividad neutralizante, ensayos BIACORE® para medir la afinidad de unión a hFKN y ensayo inmunoanálisis de adsorción (ELISA) para medir la reactividad cruzada de especies a FKN de mono cinomolgo. La actividad neutralizante, afinidad de unión y reactividad cruzada de especies a FKN de mono cinomolgo se resumen en la Figura 2. El clon 3A5-2 mostró la mayor actividad neutralizante y la mayor afinidad de unión a hFKN. El clon 3A5-2 mostró reactividad igual a FKN de mono cinomolgo y hFKN. Por tanto, se seleccionó el clon 3A5-2 como un candidato para la humanización.

Los ensayos de quimiotaxia se realizaron del siguiente modo. Se dispusieron células en los pocillos superiores de una placa de cultivo transwell (placa MultiScreen-MIC, 5,0 µm, Millipore, catálogo N° MAMIC 5S10) con ligando en los pocillos inferiores. Primero, se preincubó FKN humana recombinante (R&D Systems, catálogo N° 362-CX/CF) (33 ng/ml de concentración final) (Figura 1) con anticuerpos purificados a diversas concentraciones (0 a 10 µg/ml) a temperatura ambiente. La composición contuvo los siguientes componentes: 10x disolución de quimiocina, 15 µl/pocillo; 10x mAb purificado, 15 µl/pocillo; y 1x tampón de quimiotaxia (0,5 % de BSA, 0,5 % de FBS, HEPES 20 mM (pH 7,4), 2-mercaptoetanol 50 µM en RPMI1640 (Invitrogen)), 120 µl/pocillo. Después de 30 minutos, se aplicaron células B300.19 transfectadas con CX3CR1 (2x10⁵ células/75 µl) a los pocillos superiores y se incubaron en una estufa de incubación con 5 % de CO₂ a 37 °C durante 4 horas. Después de la incubación, se recogieron 150 µl de la disolución de los pocillos inferiores, se fijaron con 50 µl de 4 % de PFA/PBS y se aplicaron 30 µl de las muestras al analizador de células FACSCantoII para contar las células migradas.

Los ensayos BIACORE® se realizaron del siguiente modo. Se inmovilizó proteína recombinante-A/G (Pierce Chemical) sobre chips sensores BIACORE® (CM5) que se preactivaron con reactivos de acoplamiento de amina (GE Healthcare). Se añadieron los mAbs purificados en los chips sensores a una concentración de 0,2 µg/ml. Se añadieron antígenos solubles (FKN soluble conjugada con fosfatasa alcalina secretada (SEAP) o proteínas SEAP de control) a los chips sensores a diversas concentraciones (0 a 200 nM). Se monitorizó continuamente la asociación de antígenos añadidos con mAb capturados sobre los chips sensores, y se determinó la respuesta de unión relativa de los antígenos usando un sistema BIACORE® A100 (GE Healthcare).

Los ELISA se realizaron del siguiente modo. Se recubrió sobre los pocillos de una placa de 96 pocillos (Nunc, catálogo N° 442402) el anticuerpo policlonal anti-IgG de conejo (Jackson ImmunoResearch Laboratories, catálogo N° 711-005-152). Después de la incubación durante la noche a 4 °C, los pocillos se bloquearon con 1x Block-Ace (DainipponPharma) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar tres veces con 0,05 % de Tween 20/PBS, se añadió a los pocillos (50 µl/pocillo) anticuerpo policlonal de conejo anti-PLAP 10 nM (Biomed). Después de incubar durante 1 hora a temperatura ambiente y lavar tres veces como se ha descrito anteriormente, se añadieron (concentración final 1 nM) a los pocillos sobrenadantes de cultivo que contenían hFKN-SEAP o FKN de mono cinomolgo-SEAP y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar tres veces, se añadieron a los pocillos a diversas concentraciones (0 a 10 µg/ml) mAb anti-hFKN purificados. Después de incubar durante 1 hora y lavar tres veces, se añadió a 0,16 µg/ml (50 µl/pocillo) anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (Jackson ImmunoResearch Laboratories, catálogo N° 715-036-151) y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar tres veces, se añadió a los pocillos una disolución de TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina) y se permitió que se incubara durante 15-30 minutos. Se añadió a los pocillos un volumen igual de disolución de parada (H₂SO₄ 2 M) y se leyó la densidad óptica a 450 nm por un lector de microplacas (Arvo, PerkinElmer).

Se preparó hFKN-SEAP soluble del siguiente modo. ADNc que codifica la región extracelular de hFKN se amplificó con el cebador 5'-Sall-hFKN (CGCGTCGACGCCACCAT-GGCTCCGATATCTCTGTC; SEQ ID NO: 2) y el cebador 3'-NotI-hFKN (GCGGGCG-GCCGCCCTCCGGGTGGCAGCCTGGG; SEQ ID NO: 3) y se subclonó en el vector pcDNA3.1 (+) dSall SEAP que contenía ADNc de SEAP. Se transfectó el vector de expresión de hFKN-SEAP en células HEK293EBNA (HEK293E) (Invitrogen). Las células HEK293E se inocularon con DMEM (Invitrogen) complementado con 10 % de suero bovino fetal el día antes de la transfección. El día de la transfección, el medio se intercambió con medio libre de suero OPTI-MEM II (Invitrogen). El vector de expresión se transfectó con TransIT LT1 (TAKARA) según las instrucciones del fabricante. Después de 3 días de incubación (5 % de CO₂ a 37 °C), se recogió el sobrenadante de cultivo. Se midió la concentración de proteína SEAP usando Great EscAPE SEAP Chemiluminescence Kit 2.0 (Clontech).

Se preparó FKN de mono cinomolgo-SEAP soluble del siguiente modo. ADNc que codifica la región extracelular de FKN de mono cinomolgo se amplificó con el cebador 5'-XhoI-FKN de mono cinomolgo (GCGCTCGAGGCCACCATGGCTCCGATA-TCTCTGTGCTGG; SEQ ID NO: 4) y el cebador 3'-NotI-FKN de mono cinomolgo (GCGGGCGGCCGCGGTGGCAGCCTGGGAGTCAGGGAC; SEQ ID NO: 5) y se subclonó en pENTRIA (Invitrogen) que contenía ADNc de SEAP. Se transfirió el fragmento que codifica FKN de mono cinomolgo y SEAP al casete B que contenía pcDNA3.1 usando el sistema GATEWAY (Invitrogen). Se preparó el sobrenadante de cultivo que contenía FKN de mono cinomolgo-SEAP como se ha descrito anteriormente.

Ejemplo 3. Clonación de ADNc de las regiones variables de cadenas pesadas y ligeras del mAb de ratón anti-hFKN clon 3A5-2

Se amplificaron por RT-PCR ADNc de las cadenas pesadas y ligeras del clon 3A5-2. Se extrajo el ARN total del hibridoma del clon 3A5-2 con el kit RNeasy Mini (QIAGEN). Usando el ARN total, se sintetizaron ADNc usando un kit de síntesis de ADNc (TAKARA) y se amplificaron con el cebador 5'-Mm-HC-Leader1 (GGGATGGRATGSAG-CTGKGMTATSCTCTT; SEQ ID NO: 6), cebador 5'-Mm-HC-Leader2 (GGGATGRA-CTTCGGGYTGAGCTKGGTTTT; SEQ ID NO: 7) o cebador 5'-Mm-HC-Leader3 (GGGATGGCTGTCTTGGGGCTGCTCTTCT; SEQ ID NO: 8) y cebador 3'-Mm-IgG2a-CH3-R (TCATTTACCCGGAGTCCGGGAGAAGCTCTTAGTC; SEQ ID NO: 9) para la cadena pesada y cebador 5'- Mm-LC-Leader1 (GGGATGGAGACAGACACA-CTCCTGCTAT; SEQ ID NO: 10) o cebador 5'-Mm-LC-Leader2 (GGGATGGATTTT-CAGGTGCAGATTTTTCAG; SEQ ID NO: 11) o cebador 5'-Mm-LC-Leader3 (GGGATGRAGTCACACACYCAGGTCTTYRTA; SEQ ID NO: 12) o cebador 5'-Mm-LC-Leader4 (GGGATGAGGKCCCCWGCTCAGYTYCTKGGR; SEQ ID NO: 13) o cebador 5'-Mm-LC-Leader5 (GGGATGAAGTTGGCTGTTAGGCTGTTG; SEQ ID NO: 14) y cebador 3'-Mm-Ckappa-R (CTAACACTCATTCTGTTGAAGCTC; SEQ ID NO: 15) para la cadena ligera, respectivamente. Los ADNc amplificados se subclonaron en el vector pCR2.1 (Invitrogen). Las secuencias se analizaron usando ABI3130XL. Se obtuvieron la cadena pesada de longitud completa y una versión truncada de 5' de la cadena L. Para amplificar la región truncada de la cadena L e identificar secuencias conductoras precisas, se realizó la amplificación rápida de 5' de extremos de ADNc (5'-RACE). Se preparó ADNc bicatenario usando un kit de síntesis de ADNc (TAKARA) y se añadió adaptador de 5' (ad29S; se hibridaron ACATCACTC-CGT (SEQ ID NO: 16) y as29AS; ACGGAGTGATGTCCGTCGACGTATCTCTGC-GTTGATACTTCAGCGTAGCT (SEQ ID NO: 17)). Se amplificó ADNc con el cebador 5'-PCR1 (GTATCAACGCAGAGATACGTCGACGG; SEQ ID NO: 18) para la primera PCR y el cebador 5'-PCR4 (AGCTACGCTGAAGTATCAACGC-AG-AG; SEQ ID NO: 19) para la segunda PCR y 3' HC RACE cebador_1 (GTACGGA-GTACTCCAAAAATGTTG; SEQ ID NO: 20) para la primera PCR o 3' HC RACE cebador_2 (TCTTCAGGCTGCAGGCTGATGATC; SEQ ID NO: 21) para la segunda PCR para la cadena H, 3' LC RACE cebador_3 (AAATCTTCAGGCTGCAGGCTGTTG; SEQ ID NO: 22) para la primera PCR o 3' LC RACE cebador_4 (CTGTTGATCTTGAGAGAATAT-TGTG; SEQ ID NO: 23) para la segunda PCR para la cadena L, respectivamente. Se subclonaron los ADNc amplificados y se secuenciaron como se ha descrito anteriormente. Las secuencias identificadas de regiones variables son del siguiente modo.

Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena pesada (H):

CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAACTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAG
 TGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACAACTACTATATACAC
 TGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGACTTGAGTGGATTGGATGGATTTATC
 CTGGAGATGGTAGTCTAAGTTCAATGAGAGGTTCAAGGGCAAGACCACACT
 GACTGCAGACAAGTCCTCAAACACAGCCTACATGTTGCTCAGCAGCCTGACC
 TCTGAAGACTCTGCGATCTATTTCTGTGCAACTGGGCCACTGATGGCGACTA
 CTTTGACTACTGGGGCCAGGGCACCCTCTCACAGTCTCCTCA (SEQ ID NO:
 24)

Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena ligera (L):

GACATCCAGATGACTCAGTCTCCAGCCTCCCTATCTGCATCTGTGGGAGAAA
 CTGTCAACATCACATGTCGAGCAAGCGGAATATTCACAATTTTTTAGCATGG
 TATCAGCAGAAACAGGGAAAATCTCCTCAGTTCCTGGTCTATAATGAAAAA
 CCTTAGCAGATGGTGTGCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGAACACA
 ATATTCTCTCAAGATCAACAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGGGATTTATTCT
 GTCAACAGTTTTGGAGTACTCCGTATACGTTCCGAGGGGGGACCAAGCTGGA
 AATAAAA (SEQ ID NO: 25)

Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (H):

QVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTNYYIHWVKQRPGQGLEWIGWIYP
 GDGSPKFNERFKGKTTLTADKSSNTAYMLLSSLTSEDSAIYFCATGPTDGDYFDY
 WGQGTTLVSS (SEQ ID NO: 26)

Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (L):

DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASGNIHNFLAWYQQKQKGKSPQFLVYNEKTLA
 DGVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLPEDFGIYFCQQFWSTPYTFGGGKLEIK (SEQ
 ID NO: 27)

Ejemplo 4. Diseño de mAb humanizados anti-FKN del clon 3A5-2

5 Se humanizó el mAb de ratón anti-hFKN, clon 3A5-2, por medio del método de injerto de la región determinante de la complementariedad (CDR) (Kontermann and Dübél, Antibody Engineering, Springer Lab Manual (2001) y Tsurushita et al., Methods 36:69-83 (2005)). Las secuencias de aminoácidos de las CDR son del siguiente modo.

CDR-H1: NYYIH (SEQ ID NO: 28)

CDR-H2: WIYPGDGSPKFNERFKG (SEQ ID NO: 29)

10 CDR-H3: GPTDGDYFDY (SEQ ID NO: 30)

CDR-L1: RASGNIHNFLA (SEQ ID NO: 31)

CDR-L2: NEKTLAD (SEQ ID NO: 32)

CDR-L3: QQFWSTPYT (SEQ ID NO: 33)

15 Se seleccionaron regiones estructurales aceptoras humanas de entre los segmentos de la región variable humana. Se injertaron las CDR identificadas de 3A5-2 en las regiones estructurales aceptoras humanas seleccionadas. Las secuencias humanizadas diseñadas son del siguiente modo.

Cadena H (designada H3; SEQ ID NO: 36)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYYIHWVKQAPGQGLEWIGWIYP
 GDGSPKFNERFKGRTTLTADKSTNTAYMLLSSLRSDDTAVYFCATGPTDGDYFD
 YWGQGTTVTVSS

Cadena H (designada H3-2; SEQ ID NO: 37)

20 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYYIHWVKQAPGQGLEWIGWIYP
 GDGSPKFNERFKGRTTLTADKSTNTAYMLLSSLRSEDTAVYFCATGPTDGDYFD
 YWGQGTTVTVSS

Cadena L (designada L2; SEQ ID NO: 38)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASGNIHNFLAWYQQKPGKAPKFLVYNEKTLA
 DGVPSRFSGSGSGTQYTLTISSLQPEDFATYFCQQFWSTPYTFGGGKVEIK

Cadena H (designada H4; SEQ ID NO: 39)

25 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYYIHWVRQAPGQGLEWIGWIYP
 GDGSPKFNERFKGRTTLTRDKSTNTAYMELSSLRSDDTAVYFCATGPTDGDYFD
 YWGQGTTVTVSS

Secuencias de la línea germinal para la cadena H (SEQ ID NO: 40)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTXXXXXWVRQAPGQGLEWMGXX
 XXXXXXXXXXXXXXXXXXXRVTMTRDTSTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCARXXXXX
 XXXXXWGQGTITVTVSS

Secuencias de la línea germinal para la cadena L (SEQ ID NO: 41)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCXXXXXXXXXXXXWYQKPKGKAPKLLIYXXXX
 XXXGVPSRFSGSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCXXXXXXXXXXFGGGTKVEIK

5 Cadena H (designada HK2; SEQ ID NO: 42)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYYIHWVRQAPGQGLEWIGWIYP
 GDGSPKFNRFKGRITMTADTSTSTAYMELSSLRSEDNAVYFCARGPTDGDYFD
 YWGQGTITVTVSS

Cadena H (designada HK3; SEQ ID NO: 43)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYYIHWVRQAPGQGLEWIGWIYP
 GDGSPKFNRFKGRITLTADKSTSTAYMELSSLRSEDNAVYFCARGPTDGDYFD
 YWGQGTITVTVSS

Cadena L (designada L4; SEQ ID NO: 44)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASGNIHNFLAWYQKPKGKAPKLLIYNEKTLA
 DGVPSRFSGSGSGTDYTLTITSLQPEDFATYFCQQFWSTPYTFGGGTKVEIK

10

Cadena L (designada L5; SEQ ID NO: 45)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASGNIHNFLAWYQKPKGKAPKLLIYNEKTLA
 DGVPSRFSGSGSGTQYTLTITSLQPEDFATYFCQQFWSTPYTFGGGTKVEIK

Se alinearon todas las secuencias humanizadas (Figuras 3 y 4).

Ejemplo 5. Construcción de vectores de expresión de los mAb humanizados anti-hFKN

15 Para seleccionar las secuencias conductoras para la expresión de mAb humanizados, se buscaron segmentos de la línea germinal basándose en la similitud con AAA68427.1 y ABU90602.1. Los segmentos VH1-1-18 y VKI-O12 fueron los más similares a AAA68427.1 y ABU90602.1, respectivamente. Se usaron sus secuencias conductoras para la expresión de mAbs humanizados. Sus secuencias conductoras son del siguiente modo.

Secuencia de aminoácidos de la cadena H (SEQ ID NO: 46)

20 MDWTWSILFLVAAPTGAHS

Secuencias de nucleótidos de la cadena H

ATGGACTGGACCTGGAGCATCCTTTTCTGGTGGCAGCACCAACAGGTGCC ACTCC (para H3 y H3-2; SEQ ID NO: 47)

25 ATGGACTGGACATGGTCCATCCTGTTCTGGTGGCCGCTCCAACCTGGCGCAC ACTCT (para HK2 y HK3; SEQ ID NO: 48)

Secuencia de aminoácidos de la cadena L (SEQ ID NO: 49)

MDMRVPALLGLLLLWLRGARC

Secuencias de nucleótidos de la cadena L (SEQ ID NO: 50)

**ATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTACTCTGGCTCCG
AGGTGCCAGATGT**

Se generaron por PCR con los siguientes cebadores regiones variables de los mAbs humanizados anti-hFKN diseñados añadidos con las secuencias conductoras descritas anteriormente.

5 Para la cadena pesada H3

Cebador h3A5-2_VH3-1 (SEQ ID NO: 51):

ATGGACTGGACCTGGAGCATCCTTTTCTTGGTGGCAGCACCAACAGGTGC

Cebador h3A5-2_VH3-2R (SEQ ID NO: 52):

CCAGACTGCACCAGCTGCACCTGGGAGTGGGCACCTGTTGGTGCTGCCAC

10 Cebador h3A5-2_VH3-3 (SEQ ID NO: 53):

GTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGT

Cebador h3A5-2_VH3-4R (SEQ ID NO: 54):

GTGTATCCAGAAGCCTTGCAGGAGACCTTCACTGAGGCCCCAGGCTTCTT

Cebador h3A5-2_VH3-5 (SEQ ID NO: 55):

15 TGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACCACTACTATATACACTGGGTGAA

Cebador h3A5-2_VH3-6R (SEQ ID NO: 56):

ATCCACTCAAGCCCTTGTCCAGGGGCTGCTTCACCCAGTGTATATAGTA

Cebador h3A5-2_VH3-7 (SEQ ID NO: 57):

GGACAAGGGCTTGAGTGGATAGGATGGATTTATCCTGGAGATGGTAGTCC

20 Cebador h3A5-2_VH3-8R (SEQ ID NO: 58):

GTCCTGCCCTTGAACCTCTCATTGAACTTAGGACTACCATCTCCAGGATA

Cebador h3A5-2_VH3-9 (SEQ ID NO: 59):

GAGAGGTTCAAGGGCAGGACCACCCTGACCGCAGACAAGTCCACGAACAC

Cebador h3A5-2_VH3-10R (SEQ ID NO: 60):

25 GATCTCAGGCTGCTCAGCAACATGTAGGCTGTGTTTCGTGGACTTGTCTGC

Cebador h3A5-2_VH3-11 (SEQ ID NO: 61):

TTGCTGAGCAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGATTTCTGTGCGAC

Cebador h3A5-2_VH3-12R (SEQ ID NO: 62):

TAGTCAAAGTAGTCGCCATCAGTGGGCCCTGTGCGACAGAAATACACGGC

30 Cebador h3A5-2_VH3-13 (SEQ ID NO: 63):

GATGGCGACTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTC

Cebador h3A5-2_R (SEQ ID NO: 64):

GACCGATGGGCCCTTGGTGGAGGCTGAAGAGACGGTGACCGTGGTCCC

Para la cadena ligera L2

35 Cebador h3A5-2_VL2-1 (SEQ ID NO: 65):

**GCCACCATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTACTCTG
GCTCCGAGGTGCCAGAT**

Cebador h3A5-2_VL2-2R (SEQ ID NO: 66):

**TCCTACAGATGCAGACAGGGAGGATGGAGACTGGGTCATCTGGATGTCACAT
CTGGCACCTCGGAGCCAG**

Cebador h3A5-2_VL2-3 (SEQ ID NO: 67):

5

**CCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGAGCAAGCGG
GAATATTCACAATTTTTT**

Cebador h3A5-2_VL2-4R (SEQ ID NO: 68):

**GAACTTAGGGGCTTCCCTGGTTTCTGTTGATACCATGCTAAAAAATTGTGAA
TATCCCGCTTGCTCGG**

Cebador h3A5-2_VL2-5 (SEQ ID NO: 69):

**CAGGGAAAGCCCCTAAGTTCCTGGTCTATAATGAAAAACCTTAGCAGATGG
GGTCCCATCAAGGTTTCAG**

10

Cebador h3A5-2_VL2-6R (SEQ ID NO: 70):

**GTTGCAGACTGCTGATGGTGAGAGTATATTGTGTCCCAGATCCACTGCCACTG
AACCTTGATGGGACCCC**

Cebador h3A5-2_VL2-7 (SEQ ID NO: 71):

**CACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGGCACCCTACTTCTGTCAACAGT
TTTGGAGTACTCCGTAT**

Cebador h3A5-2_VL2-8R (SEQ ID NO: 72):

15

**TTTGATCTCCACCTTGGTCCCTCCGCCGAACGTATACGGAGTACTCCAAAAC
GTTGACAGAA**

h3A5-2_VL-R (SEQ ID NO: 73): GACAGATGGTGCAGCCACAGTTGTTTTGATCTCCACCTGGTCCCTCC

20

Se amplificaron por PCR H3 y L2 generadas con el cebador 5'-Eco-Sal-h3A5-2_VH_F (GCGAATTCGTCGACGCCACCATGGACTGGACCTGGAGCATCCTTTT-CTTG; SEQ ID NO: 74) y 3'-NheI-h3A5-2_VH_R (CGCGCTAGCTGAAGAGAC-GGTGACCGTGGT-CCC; SEQ ID NO: 75) para H3 y el cebador 5'-h3A5-2_VL_Sall-kozac_F (GCGGTCGACGCCACCATGGACATGAGGGTCCCC; SEQ ID NO: 76) y el cebador 3'-h3A5-2_VL-R (GACAGATGGTGCAGCCACAGTTGTTTTGATCTCCAC-CTTGGTCCCTCC; SEQ ID NO: 77) para L2, respectivamente.

H4 se generó por Genscript USA Inc. La secuencia de H4 es del siguiente modo. H4 (SEQ ID NO: 78):

**GAATTCGTCGACGCCACCATGGACTGGACATGGTCCATCCTGTTCCCTGGTGGC
CGCTCCAACCTGGCGCACACTCTCAGGTGCAGCTGGTGCAGAGTGGCGCTGAG**

GTGAAGAAACCCGGAGCATCAGTGAAGGTGTCTCTGCAAAGCCAGCGGATAC
 ACCTTCACCAACTACTATATTCATTGGGTGAGGCAGGCTCCTGGACAGGGAC
 TGGAGTGGATCGGATGGATCTACCCAGGGGACGGTTCCTTAAGTTCAACGA
 AAGGTTTAAAGGCCGGACCACACTGACCAGGGATAAGTCAACCAATACAGCT
 TACATGGAAGTGTCCAGCCTGCGCTCTGACGATACAGCAGTGTATTTCTGTGC
 CACTGGGCCAACCGACGGCGACTACTTTGATTATTGGGGCCAGGGAACTACC
 GTGACCGTGTCTAGTGCTAGC

Se generó la región variable de HK2 por mutaciones puntuales con PCR de H4 con los siguientes cebadores.

Cebador 3A5-2_HKG2_sal24F (SEQ ID NO: 79): CGCGTTCGACGCCACCATGGACTGGACATGGTCCATCCTG

Cebador h3A5-2_HKG2_280F (SEQ ID NO: 80): ATGACCGCCGATACCTCAACCTCCACAGCTTACATGGAA

5 Cebador h3A5-2_HKG2_300R (SEQ ID NO: 81): GGTTGAGGTATCGGCGGTCAATTGTGGTCCG

Cebador h3A5-2_HKG2_340F (SEQ ID NO: 82): GAGGATACAGCAGTGTATTTCTGTGCCCGGGGGCCAACC

Cebador h3A5-2_HKG2_370R (SEQ ID NO: 83): GGCACAGAAATACACTGCTGTATCCTCAGAGCGCAG

Cebador h3A5-2_HKG2_Nhe24R (SEQ ID NO: 84): CGCGCTAGCACTAGACACGGTCACGGTAGTTCC

Se generó la región variable de HK3 por mutaciones puntuales con PCR de HK2 con cebadores del siguiente modo.

10 Cebador h3A5-2_HKG2_sal24F (SEQ ID NO: 85):
 CGCGTTCGACGCCACCATGGACTGGACATGGTCCATCCTG

Cebador HKG3_R (SEQ ID NO: 86): TTGACTTATCGGCGGTCAAGTGTGGTCCGGCCTTTAAACCTTTTC

Cebador HKG3_F (SEQ ID NO: 87): ACACTGACCGCCGATAAGTCAACCTCCACAGCTTACATGGAA

Cebador h3A5-2_HKG2_Nhe24R (SEQ ID NO: 88): CGCGCTAGCACTAGACACGGTCACGGTAGTTCC

15 Se generó la región variable de L4 por mutaciones puntuales con PCR de L2 con cebadores del siguiente modo.

Cebador h3A5-2_VL4_sal24F (SEQ ID NO:89): CGCGTTCGACGCCACCATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAG

Cebador h3A5-2_VL4_200R (SEQ ID NO: 90): CAGCAGCTTAGGGGCTTTCCCTGGTTTCTG

Cebador h3A5-2_VL4_190F (SEQ ID NO: 91): GGGAAAGCCCCTAAGCTGCTGATCTATAATGAAAAA

Cebador h3A5-2_VL4_260R (SEQ ID NO: 92): TGTCCAGATCCACTGCCACTGAACCTTGA

20 Cebador h3A5-2_VL4_250F (SEQ ID NO: 93): AGTGGCAGTGGATCTGGGACAGACTATACTCTCACC

Cebador h3A5-2_VL4_BsiW24R (SEQ ID NO: 94): CGCCGTACGTTTGATCTCCACCTTGGTCCCTCC

Se generó la región variable de L5 por mutaciones puntuales con PCR de L4 con cebadores del siguiente modo.

Cebador h3A5-2_VL4_sal24F (SEQ ID NO: 95): CGCGTTCGACGCCACCATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAG

Cebador VL5 R (SEQ ID NO: 96): GGTGAGAGTATACTGTGTCCAGATCCACTGCCACTGAAC

25 Cebador VL5_F (SEQ ID NO: 97): GGATCTGGGACACAGTATACTCTCACCATCAGCAGTCTG

h3A5-2_VL4_BsiW24R (SEQ ID NO: 98): cgcCGTACGTTTGATCTCCACCTTGGTCCCTCC

30 Se amplificaron las regiones constantes de IgG2 y Igk con el cebador 5'-NheI-IgG2_F (CGCGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCC; SEQ ID NO: 99) y el cebador 3'-EcoRV-IgG2_R (CGCGATATCTCATTACCCGGAGACAGGGAGAG; SEQ ID NO: 100) para IgG2 y el cebador 5'-BsiWI-Igk_F (CGCCGTACGGTGGCTGCACCA-TCTGTCTTCATC; SEQ ID NO: 101) y el cebador 3'-EcoRV-Igk_R (CGCGATATCCT-AACACTCTCCCCTGTTGAAGCT; SEQ ID NO: 102) para Igk, respectivamente. Las regiones constantes amplificadas se subclonaron en pENTR1A dNotI en el que se delecionó NotI.

Las regiones variables generadas se subclonaron en pENTR1A-IgG2 o pENTR1A-Igk usando sitios Sall-NheI para las cadenas pesadas o sitios Sall-BsiWI para las cadenas ligeras, respectivamente. En el caso de L2, la región

constante de Igk se amplificó con el cebador 5'-hIGK_F (CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTGC; SEQ ID NO: 103) y el cebador 3'-hIGK_NotI-R (CGCGCGGCCGCCTAACACTCTCCCCTGTTGAAGCTCTT; SEQ ID NO: 104). Se combinaron por PCR la región constante Igk amplificada y L2 generada y se subclonaron en pENTR1A. Las regiones variables y regiones constantes subclonadas se transfirieron en pEE6.4 o pEE12.4 (Lonza) para la cadena pesada y cadena ligera, respectivamente, usando el sistema GATEWAY (Invitrogen).

Se generó H3-2 por mutación puntual con el sistema de mutagénesis dirigida al sitio GeneTailor de pENTR1A-H3-IgG2 con el cebador 5'-h3A5-2_H3-2_300F (TTGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCC; SEQ ID NO: 105) y el cebador 3'-h3A5-2_H3-2_320R (AGATCTCAGGCTGCTCAGCAACATGTAGGC; SEQ ID NO: 106). Se realizó mutagénesis dirigida al sitio GeneTailor según las instrucciones del fabricante. La región variable y la región constante mutadas se transfirieron en pEE6.4 como se ha descrito anteriormente.

Ejemplo 6. Preparación de mAb humanizados anti-hFKN

Se transfectaron en células HEK293E vectores de expresión de cadenas pesadas y ligeras de mAb humanizados anti-hFKN. El día de la transfección, células HEK293E se inocularon con DMEM (Invitrogen) con 10 % de suero bovino fetal. Después de incubar durante 5 horas, se transfectó con Lipofectamine 2000 (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante una mezcla de vectores de expresión de la cadena pesada y ligera. Al día siguiente de la transfección, el medio se cambió a medio libre de suero 293 (SFM) II (Invitrogen). Después de incubar durante 5 días a 37 °C, se recogieron los sobrenadantes de cultivo. Para los ensayos BIACORE®, se usaron directamente los sobrenadantes recogidos. Para ensayos de quimiotaxia, se purificaron sobrenadantes con una columna de proteína recombinante A Sepharose (Pharmacia).

Ejemplo 7. Preparación de mAb quimérico 3A5-2 de ratón-humano

Se amplificó la región variable de la cadena pesada de 3A5-2 de ratón con el cebador de VH 5'-EcoRI-Sall-3A5-2 (GCGGAATTCGTCGACGCCACCATGCGATGGAGCTGGA-TC; SEQ ID NO: 107) y el cebador de VH de 3A5-2 solapado con 3'-IgG (GACCGATGGGCC-CTTGGTGGAGGCTGAGGAGACTGTGAGAGTGGTGCC; SEQ ID NO: 108). Se amplificó la región constante de IgG2 humana con el cebador 5'-hlgG2 (GCCTCCACCA-AGGGCCCATCGGTCTTCCCCTGGCGCCCTG; SEQ ID NO: 109) y 3'-NotI-hlgG2 (CGCGCGGCCGCTCATTTACCCGGAGACAGGGAGAG; SEQ ID NO: 110). Se combinaron con PCR VH de 3A5-2 amplificada y la región constante de IgG2 humana y se subclonó en pCX-IRES-bsr, que tiene el gen resistente a blasticidina para la selección celular. Se amplificó la región variable de la cadena ligera de 3A5-2 de ratón con el cebador 5'-3A_VL-Sall-kozac_F (GCGGTGACGCCACCATGAGTGTGCTCACTCAG; SEQ ID NO: 111) y el cebador 3'-3A-IgG1.2_VH-R (GACAGATGGTGCAGCCACAGTTCGTTTTATTTCAGCTTGGTCCCCCT; SEQ ID NO: 112). Se amplificó la región constante de Igk humana con el cebador 5'-hIGK_F (CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTGC; SEQ ID NO: 113) y 3'-hIGK_NotI-R (CGCGCGGCCGCCTAACACTCTCCCCTGTTGA-AGCTCTT; SEQ ID NO: 114). Se combinaron con PCR VH de 3A5-2 amplificada y la región constante de IgG2 humana y se subclonaron en pMX-IRES-puro, que tiene el gen resistente a puomicina para la selección celular.

El vector de expresión de la cadena ligera quimérica se transfectó en células HEK293E con pE-Eco y pGp (TAKARA) para la encapsidación de retrovirus. Células HEK293E se inocularon con DMEM (Invitrogen) con 10 % de FBS el día antes de la transfección. El día de la transfección, los vectores se transfectaron con TranIT LT1 (TAKARA). Después de incubar durante 3 días, se recogió el sobrenadante de cultivo que contenía el retrovirus y se añadió a células B300.19. Después de incubar durante 8 horas, se retiró el sobrenadante de cultivo y se añadió RPMI1640 (Invitrogen) con 10 % de FBS. Después de cultivar durante 2 días, se añadió puomicina para seleccionar células infectadas. Las células seleccionadas se infectaron posteriormente con otro retrovirus recombinante que llevaba cadena pesada quimérica, que se preparó usando un método similar como se describe para la cadena ligera. Después de la selección con blasticidina, las células doblemente seleccionadas se cultivaron con SF-O (Sanko Junyaku) que contenía Glutamax 8 mM, 2-mercaptoetanol 55 µM, 1x colesterol (Invitrogen) en Integra CELLline (Integra Bioscience). Se purificó el sobrenadante de cultivo usando una columna de proteína recombinante A Sepharose (Pharmacia) para el ensayo de quimiotaxia y el ensayo BIACORE®.

Ejemplo 8. Análisis de mAb humanizados anti-hFKN

Se analizaron mAb humanizados anti-hFKN usando un ensayo de quimiotaxia para medir la actividad neutralizante y un ensayo BIACORE® para medir la afinidad de unión a hFKN y FKN de mono cinomolgo. Datos y resultados representativos de tres ensayos de quimiotaxia independientes se resumen en la Figura 5 y se muestran en las Figuras 6A-B, 7A-D y 8A-F. Todas las combinaciones de H3 y H3-2 para la cadena pesada con L2 y L4 para la cadena ligera se humanizaron satisfactoriamente, ya que estos mAb mostraron actividad neutralizante similar con el mAb quimérico. Sin embargo, HK2, que se preparó usando restos clave reducidos, mostró actividad neutralizante reducida en combinación con L2 o L4. Los resultados del ensayo BIACORE® se resumen en las Figuras 9 y 10A-C. Todas las combinaciones de H3 y H3-2 para la cadena pesada con L2 y L4 para la cadena ligera mostraron niveles de afinidad similares en comparación con el mAb quimérico. Por otra parte, HK2L4 mostró menor afinidad que los otros. Estos resultados sugieren que 3A5-2 no se pudo humanizar satisfactoriamente por un método general usando la identificación usual de restos clave, especialmente en el caso de la cadena pesada.

Se realizaron ensayos de quimiotaxia del siguiente modo. Las células se dispusieron en los pocillos superiores de una placa de cultivo transwell (placa MultiScreen-MIC, 5,0 μ m, Millipore, catálogo N^o MAMIC 5S10) con ligando en los pocillos inferiores. Primero, se añadió FKN humana recombinante (R&D Systems, catálogo N^o 362-CX/CF) (10 ng/ml de concentración final) con anticuerpos purificados a diversas concentraciones (0 a 10 μ g/ml) a los pocillos inferiores. La composición contuvo los siguientes componentes: 3x disolución de quimiocina, 50 μ l/pocillo; 1,5x mAb purificado, 100 μ l/pocillo; quimiocina y anticuerpos purificados se diluyeron con 1x tampón de quimiotaxia (descrito anteriormente). Las células B300.19 transfectadas con CX3CR1 (2×10^5 células/75 μ l) se aplicaron junto con anticuerpos purificados a diversas concentraciones (0 a 10 μ g/ml) a los pocillos superiores. La composición contuvo los siguientes componentes: 3x suspensión de células, 25 μ l/pocillo; 1,5x disolución de mAb purificado, 50 μ l/pocillo; se diluyeron las células y los anticuerpos purificados con 1x tampón de quimiotaxia. El ensayo de quimiotaxia se realizó en una estufa de incubación con 5 % de CO₂ a 37 °C durante 4 horas. Después de la incubación, se recogieron 150 μ l de los pocillos inferiores, se fijaron con 50 μ l de 4 % de PFA/PBS y se aplicaron 30 μ l de las muestras al analizador celular FACSCantoll para contar las células migradas.

Los ensayos BIACORE® se realizaron como se ha descrito anteriormente. Sin embargo, para mAb humanizados y quiméricos, se usó mAb de ratón anti-IgG humana (GE Healthcare) como anticuerpo de captura sobre el chip sensor.

Ejemplo 9. Mapeo de epítopes usando péptidos sintéticos del dominio de quimiocina de FKN

Se realizó el mapeo de epítopes usando bibliotecas de péptidos sintéticos de solapamiento del dominio de quimiocina de FKN. Se sintetizaron los veintidós tipos de péptidos de 15 restos por Sigma Genosys. Los péptidos se disolvieron hasta 10 mg/ml con DMSO. Estos péptidos (50 μ g/ml) se recubrieron sobre una placa de ELISA (Nunc) durante la noche a 4 °C. Se retiraron las disoluciones de péptido y se añadió a cada pocillo disolución de PBS que contenía 1 % de BlockAce (Dainippon Pharma), se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavó con solución salina tamponada con Tris (pH 7,4) que contenía 0,05 % de Tween 20 (disolución de lavado). Se añadió disolución de anticuerpo H3-2L4 (50 μ g/ml) a los pocillos y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Se retiró la disolución de anticuerpo y se lavó con disolución de lavado. Se añadió a los pocillos disolución de anticuerpo anti-IgG humana marcada con peroxidasa (Zymed; 400 ng/ml) y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Se retiró la disolución de anticuerpo y se lavó con disolución de lavado. Se añadió disolución de TMBZ (Sigma) a cada pocillo y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. La reacción se terminó con disolución 1 N de H₂SO₄ y se midió la absorbancia a 450-650 nm.

Los resultados se muestran en la Figura 11. El anticuerpo H3-2L4 reaccionó con péptidos desde el extremo N y la región central de FKN humana.

Ejemplo 10. Preparación de mutantes de sustitución de alanina o serina

Se prepararon mutantes de sustitución de alanina o serina de hFKN-SEAP del siguiente modo. ADNc que codifica la región extracelular de hFKN se retiró del vector de expresión de hFKN-SEAP, pcDNA3.1 (+) hFKN-SEAP, usando enzimas de restricción Sall/NotI y se subclonó en el vector pENTR1A_dSEAP-(His)₁₀ que contenía ADNc de SEAP (pENTR1A se compró de Invitrogen). Se indujeron mutaciones de sustitución de alanina o serina usando el sistema de mutagénesis dirigida al sitio GeneTailor™ (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. Los fragmentos de ADNc inducidos por mutación de hFKN-SEAP se transfirieron en el vector pcDNA3.1 (+)_casete B (el casete B se compró de Invitrogen) usando el sistema Gateway (Invitrogen). Los vectores de expresión del mutante de sustitución de alanina o serina de hFKN-SEAP se transfectaron en células HEK293EBNA (HEK293E) (Invitrogen). Las células HEK293E se inocularon con DMEM (Invitrogen) complementado con 10 % de suero bovino fetal el día antes de la transfección. Los vectores de expresión se transfectaron con TransIT LT1 (Takara) según las instrucciones del fabricante. Después de 3 días de incubación (5 % CO₂ a 37 °C), se recogió el sobrenadante de cultivo. Se midió la concentración de proteínas SEAP usando Great EscAPe SEAP Chemiluminescence Kit 2.0 (Clontech).

Ejemplo 11. ELISA para el mapeo de epítopes de hFKN

Se recubrieron cada uno de anticuerpo policlonal anti-hFKN (eBioscience) y H3-2L4 sobre pocillos de una placa de ELISA (Nunc) durante la noche a 4 °C. Para cada uno, se retiró la disolución de anticuerpo y se añadió a cada pocillo PBS que contenía 1 % de albúmina de suero bovino y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente, luego se lavó con solución salina tamponada con Tris (pH 7,4) que contenía 0,05 % de Tween20 (disolución de lavado). Los mutantes de sustitución de alanina o serina se diluyeron hasta 0,13 nM con PBS que contenía 1 % de BSA y se añadieron alícuotas de 50 μ l a los pocillos de la placa de ELISA y se incubaron durante 4 horas a temperatura ambiente. Se retiraron las disoluciones de mutante y se lavaron con disolución de lavado. Se añadió a cada pocillo disolución de fosfato de p-nitrofenilo (Thermo Scientific) y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción se terminó con disolución 1 N de NaOH y se midió la absorbancia a 405 nm. Los resultados se muestran en la Figura 12. El mutante R68A perdió específicamente la reactividad con H3-2L4. Otros mutantes que perdieron la reactividad con H3-2L4 también perdieron la reactividad con anticuerpo policlonal. Estos resultados muestran que R68 es un epítipo crítico para H3-2L4.

Ejemplo 12. Mapeo de epítopes de hFKN usando BIACORE®

Se inmovilizó anticuerpo anti-marca de histidina (Bethyl) sobre un chip sensor CM5 (GE Healthcare). Las disoluciones de mutante sustituido con alanina o serina se diluyeron 10 veces con tampón HBS-EP (GE Healthcare), se cargaron sobre el chip, se lavaron con HBS-EP y se midió el nivel de unión al antígeno. Se cargaron H3-2L4 y disolución de anticuerpo policlonal anti-FKN sobre el chip unido al antígeno, se lavaron con HBS-EP y se midió el nivel de unión al anticuerpo. Se calculó [Nivel de unión al anticuerpo / Nivel de unión al antígeno] y se compararon los valores calculados para cada mutante con los del natural. Los resultados se muestran en la Figura 13.

Ejemplo 13. Reactividad de otros anticuerpos con el mutante R68A

Se recubrieron sobre una placa de ELISA (Nunc) durante la noche a 4 °C los anticuerpos monoclonales de ratón anti-FKN humana (1F3, 1G1, 2B2, 3D5, 6D1, 7F6) y el anticuerpo H3-2L4. Se retiraron las disoluciones de anticuerpo. Se añadió a cada pocillo la disolución de PBS que contenía 1 % de BSA y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente, y los pocillos se lavaron con solución salina tamponada con Tris (pH 7,4) que contenía 0,05 % de Tween 20. Se añadieron a los pocillos disolución de FKN-SEAP-His natural y mutado con R68A (1, 0,5, 0,25, 0,125 nM) y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Se retiraron las disoluciones de antígeno y se lavaron con disolución de lavado. Se añadió disolución de fosfato de p-nitrofenilo (Thermo Scientific) a cada pocillo y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción se terminó con disolución 1 N de NaOH y se midió la absorbancia a 405 nm.

Se probó la actividad neutralizante de estos anticuerpos basándose en un ensayo de quimiotaxia, como se ha descrito anteriormente. Se añadieron FKN humana 10 nM y diversas concentraciones de estos anticuerpos a los pocillos inferiores de una placa transwell. En el pocillo superior de la placa, se añadieron las células que expresaban CX3CR1. Después de incubarse durante 4 horas a 37 °C, se recuperaron los medios de los pocillos inferiores y las células se fijaron usando una disolución de 4 % de formaldehído. Se contó el número de células usando un analizador FACS. La relación entre actividad neutralizante y reactividad con mutante de R68A se muestra en la Tabla 1. Los anticuerpos que neutralizan fuertemente la actividad de CTX perdieron su reactividad con el mutante R68A. Este resultado muestra que R68 de FKN humana es el sitio de reconocimiento clave para los anticuerpos que pueden neutralizar eficazmente la función de FKN.

Tabla 1. Relación entre unión a mutante de R68A y actividad neutralizante

Anticuerpo	R68A/natural (%)	CTX (CI50, nM)
1F3	131	12,7
1G1	39	80<
2B2	51	80<
3D5	0	4,09
3H7	0	19,1
6D1	58	80<
7F6	56	80<
H3-2L4	0	0,2

Ejemplo 14: Mapeo de epítopes de hFKN por RMN**30 Purificación de Fab del anticuerpo H3-2L4**

Se dializaron 100 mg de disolución de anticuerpo H3-2L4 purificado (20 mg/ml de disolución de PBS) contra tampón fosfato 0,1 M (pH 7,0) que contenía EDTA 2 mM. La concentración de anticuerpo se ajustó a 15 mg/ml con el tampón de diálisis y se añadió cisteína 30 mM. Se añadieron 0,2 mg de papaína (Sigma) a la disolución de anticuerpo y se incubaron durante 14 horas a 37 °C. Se añadió yodoacetamida a la disolución para terminar la reacción enzimática. Se dializó la disolución de anticuerpo digerido con papaína contra disolución de PBS durante la noche a temperatura ambiente. La disolución se aplicó a una columna ProSep vA (Millipore) y se recogió la fracción no retenida. La fracción no retenida se aplicó a una columna inmovilizada de anticuerpo anti-Fc de IgG humana (Jackson ImmunoResearch Laboratories) y se recogió la fracción no retenida. Se concentró la fracción no retenida y se aplicó a Superose 12 10/300 GL (GE Healthcare) y se recogieron las fracciones que contenían el fragmento Fab. La pureza de estas fracciones se analizó por SDS-PAGE y se reunieron las fracciones dominantes de Fab.

Identificación de sitio de unión de Fab sobre fractalcina

5 Para identificar el sitio de unión de Fab sobre fractalcina, se preparó fractalcina marcada con isótopo estable (^2H , ^{15}N y ^{13}C , ^{15}N) (Mizoue, L et al., *Biochemistry*, 38: 1402-1414 (1999)) y se realizó un experimento de RMN basado en coherencia heteronuclear de ^{15}N cuántica simple (HSQC). Se prepararon muestras de RMN en tampón acetato 20 mM (pH 5,0) y 80 % de D_2O (experimento de saturación cruzada) o 5 % de D_2O (los otros experimentos). Todos los experimentos de RMN se llevaron a cabo en un espectrómetro Bruker Avance de 700 MHz equipado con sonda criogénica bajo la temperatura de 45 °C.

10 La adición de Fab no marcado indujo el cambio espectral de fractalcina, que indica la interacción entre la fractalcina marcada y Fab. Las asignaciones secuenciales de esqueleto ^{15}N y $^1\text{H}_\text{N}$ de fractalcina complejada con Fab se completaron del espectro 3D de HNCA.

15 Un experimento de saturación cruzada es uno de los métodos de RMN más precisos para determinar las interfases de unión de interacciones proteína-proteína (Takahashi, H et al., *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 7: 220-223 (2000)). Como resultado del experimento, se redujo la intensidad de señal de varios restos por irradiación selectiva de Fab (Figura 14). Los restos se localizaron en dos regiones contiguas separadas. Una región consiste en E66-Q69, y la otra región consiste en W81-Q87. Además, los desplazamientos químicos de estos restos estuvieron afectados en gran medida por la adición de Fab, que respalda los datos de saturación cruzada (Figura 14). A partir de estos resultados, los presentes inventores llegaron a la conclusión de que estas regiones están incluidas en la interfase con el Fab.

LISTADO DE SECUENCIAS

20 <110> EISAI R&D MANAGEMENT CO., LTD.

<120> COMPOSICIONES Y MÉTODOS DE TRATAMIENTO DE TRASTORNOS INFLAMATORIOS

<130> 09056-C9338

25

<150> 61/256.521

<151> 30-10-2009

<160> 135

30

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 397

35

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

ES 2 698 389 T3

Met Ala Pro Ile Ser Leu Ser Trp Leu Leu Arg Leu Ala Thr Phe Cys
1 5 10 15

His Leu Thr Val Leu Leu Ala Gly Gln His His Gly Val Thr Lys Cys
 20 25 30

Asn Ile Thr Cys Ser Lys Met Thr Ser Lys Ile Pro Val Ala Leu Leu
 35 40 45

Ile His Tyr Gln Gln Asn Gln Ala Ser Cys Gly Lys Arg Ala Ile Ile
 50 55 60

Leu Glu Thr Arg Gln His Arg Leu Phe Cys Ala Asp Pro Lys Glu Gln
65 70 75 80

Trp Val Lys Asp Ala Met Gln His Leu Asp Arg Gln Ala Ala Ala Leu
 85 90 95

ES 2 698 389 T3

Thr Arg Asn Gly Gly Thr Phe Glu Lys Gln Ile Gly Glu Val Lys Pro
 100 105 110

Arg Thr Thr Pro Ala Ala Gly Gly Met Asp Glu Ser Val Val Leu Glu
 115 120 125

Pro Glu Ala Thr Gly Glu Ser Ser Ser Leu Glu Pro Thr Pro Ser Ser
 130 135 140

Gln Glu Ala Gln Arg Ala Leu Gly Thr Ser Pro Glu Leu Pro Thr Gly
 145 150 155 160

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

Asp Gly Gly Pro Val Gly Thr Glu Leu Phe Arg Val Pro Pro Val Ser
 180 185 190

Thr Ala Ala Thr Trp Gln Ser Ser Ala Pro His Gln Pro Gly Pro Ser
 195 200 205

Leu Trp Ala Glu Ala Lys Thr Ser Glu Ala Pro Ser Thr Gln Asp Pro
 210 215 220

Ser Thr Gln Ala Ser Thr Ala Ser Ser Pro Ala Pro Glu Glu Asn Ala
 225 230 235 240

Pro Ser Glu Gly Gln Arg Val Trp Gly Gln Gly Gln Ser Pro Arg Pro
 245 250 255

Glu Asn Ser Leu Glu Arg Glu Glu Met Gly Pro Val Pro Ala His Thr
 260 265 270

ES 2 698 389 T3

Asp Ala Phe Gln Asp Trp Gly Pro Gly Ser Met Ala His Val Ser Val
 275 280 285

Val Pro Val Ser Ser Glu Gly Thr Pro Ser Arg Glu Pro Val Ala Ser
 290 295 300

Gly Ser Trp Thr Pro Lys Ala Glu Glu Pro Ile His Ala Thr Met Asp
 305 310 315 320

Pro Gln Arg Leu Gly Val Leu Ile Thr Pro Val Pro Asp Ala Gln Ala
 325 330 335

Ala Thr Arg Arg Gln Ala Val Gly Leu Leu Ala Phe Leu Gly Leu Leu
 340 345 350

Phe Cys Leu Gly Val Ala Met Phe Thr Tyr Gln Ser Leu Gln Gly Cys
 355 360 365

Pro Arg Lys Met Ala Gly Glu Met Ala Glu Gly Leu Arg Tyr Ile Pro
 370 375 380

Arg Ser Cys Gly Ser Asn Ser Tyr Val Leu Val Pro Val
 385 390 395

<210> 2

<211> 35

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

10

<400> 2

cgcgctcgacg ccaccatggc tccgatatct ctgtc 35

<210> 3

15 <211> 32

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

5 <400> 3

gcggggcgcc gccctccggg tggcagcctg gg 32

<210> 4

<211> 39

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

15

<400> 4

gcgctcgagg ccacatggc tccgatatct ctgtcgtgg 39

<210> 5

20 <211> 36

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 5

gcgggcggcc gcggtggcag cctgggagtc agggac 36

30 <210> 6

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 6

gggatggrat gsagctgkgt matsctct 29

<210> 7

5 <211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 7

gggatgract tcgggytgag ctkggttt 29

15 <210> 8

<211> 28

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 8

gggatggctg tctggggct gctctct 28

25

<210> 9

<211> 34

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 9

35 tcatttacc ggagtcggg agaagctct agtc 34

<210> 10

<211> 28

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 10

gggatggaga cagacacact cctgctat 28

10

<210> 11

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 11

20 gggatggatt tcaggtgca gatttcag 29

<210> 12

<211> 30

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

30 <400> 12

gggatgragt cacakacyca ggtcttyrta 30

<210> 13

<211> 30

35 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 13

5 gggatgaggk cccwgctca gtyctkggr 30

<210> 14

<211> 27

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

15 <400> 14

gggatgaagt tggctgtag gctgtg 27

<210> 15

<211> 25

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

25

<400> 15

ctaactca tcctgtga agctc 25

<210> 16

30 <211> 12

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 16

ES 2 698 389 T3

acatcactcc gt 12

<210> 17
<211> 50
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
10

<400> 17
acggagtgat gtcggtcgac gtatctctgc gttgatactt cagcgtagct 50

<210> 18
15 <211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
20 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 18
gtatcaacgc agagatacgt cgacgg 26

25 <210> 19
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 19
agctacgctg aagatcaac gcagag 26
35

<210> 20
<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 20

gtacggagta ctcaaaaat gttg 24

10 <210> 21

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 21

tcttcaggct gcaggctgat gatc 24

20

<210> 22

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 22

30 aaatcttcag gctgcaggct gttg 24

<210> 23

<211> 25

<212> ADN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 698 389 T3

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 23

ctgttgatct tgagagaata ttgtg 25

5

<210> 24

<211> 357

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 24

caggtccagc tgcagcagtc tggacctgaa ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagatg 60

tcctgcaagg cttctggcta caccttcaca aactactata tacactgggt gaagcagagg 120

cctggacagg gacttgagtg gattggatgg atttatcctg gagatggtag tcctaagttc 180

aatgagaggt tcaagggcaa gaccacactg actgcagaca agtcctcaaa cacagcctac 240

atgttgctca gcagcctgac ctctgaagac tctgogatct atttctgtgc aactgggccc 300

15

actgatggcg actactttga ctactggggc cagggcacca ctctcacagt ctctca 357

<210> 25

<211> 321

20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

25

<400> 25

ES 2 698 389 T3

```

gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgcat ctgtgggaga aactgtcacc      60
atcacatgtc gagcaagcgg gaattattcac aatTTTTtag catggtatca gcagaaacag      120
ggaaaatctc ctcaGttcct ggtctataat gaaaaaacct tagcagatgg tgtgccatca      180
aggttcagtg gcagtggatc aggaacacaa tattctctca agatcaacag cctgcagcct      240
gaagattttg ggattttatt ctgtcaacag ttttggagta ctccgtatac gttcggaggg      300
gggaccaagc tggaataaaa a                                               321
    
```

<210> 26

<211> 119

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

10

<400> 26

```

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

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

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

ES 2 698 389 T3

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

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

Met Leu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Thr Gly Pro Thr Asp Gly Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 27

<211> 107

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

10

<400> 27

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

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Phe
 20 25 30

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

Tyr Asn Glu Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

ES 2 698 389 T3

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Ile Tyr Phe Cys Gln Gln Phe Trp Ser Thr Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 28

<211> 5

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

10

<400> 28

Asn Tyr Tyr Ile His
1 5

<210> 29

15 <211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 29

Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Pro Lys Phe Asn Glu Arg Phe Lys
1 5 10 15

Gly

25 <210> 30

ES 2 698 389 T3

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 30

Gly	Pro	Thr	Asp	Gly	Asp	Tyr	Phe	Asp	Tyr
1				5					10

10

<210> 31

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 31

Arg	Ala	Ser	Gly	Asn	Ile	His	Asn	Phe	Leu	Ala
1				5						10

20

<210> 32

<211> 7

<212> PRT

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

30

<400> 32

Asn	Glu	Lys	Thr	Leu	Ala	Asp
1				5		

<210> 33

ES 2 698 389 T3

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 33

Gln Gln Phe Trp Ser Thr Pro Tyr Thr
1 5

10

<210> 34

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<400> 34

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

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

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

Gly Trp Ile Ser Pro Asn Arg Gly Ala Thr Arg Phe Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Ile Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

Ala Thr Thr Arg Thr Ala Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly

ES 2 698 389 T3

100

105

110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 35

<211> 107

5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

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 Asn Ile Asp Asn Tyr
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Glu 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 Val Ile
85 90 95

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

10

<210> 36

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

ES 2 698 389 T3

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 36

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

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

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

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

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

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

Ala Thr Gly Pro Thr Asp Gly Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

5

<210> 37

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 37

ES 2 698 389 T3

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

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

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

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

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

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

Ala Thr Gly Pro Thr Asp Gly Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 38

<211> 107

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

10

<400> 38

ES 2 698 389 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 Gly Asn Ile His Asn Phe
 20 25 30

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

Tyr Asn Glu Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

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

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

<210> 39

<211> 119

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

10

<400> 39

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

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

ES 2 698 389 T3

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

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

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

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

Ala Thr Gly Pro Thr Asp Gly Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 40

<211> 119

5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

10

<220>

<221> MOD_RES

<222> (31)..(35)

<223> Cualquier aminoácido

15

<220>

<221> MOD_RES

<222> (50)..(66)

<223> Cualquier aminoácido

20

<220>

<221> MOD_RES

<222> (99)..(108)

ES 2 698 389 T3

<223> Cualquier aminoácido

<400> 40

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

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

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

Gly Xaa
 50 55 60

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

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

Ala Arg Xaa Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

5

<210> 41

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<220>

15

<221> MOD_RES

<222> (24)..(34)

<223> Cualquier aminoácido

ES 2 698 389 T3

<220>

<221> MOD_RES

<222> (50)..(56)

<223> Cualquier aminoácido

5

<220>

<221> MOD_RES

<222> (89)..(97)

<223> Cualquier aminoácido

10

<400> 41

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 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
20 25 30

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

Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa 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 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
85 90 95

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

15

<210> 42

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

ES 2 698 389 T3

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 42

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Pro Thr Asp Gly Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

5

<210> 43

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 43

ES 2 698 389 T3

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Pro Thr Asp Gly Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 44

<211> 107

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

10

<400> 44

ES 2 698 389 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 Gly Asn Ile His Asn Phe
20 25 30

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

Tyr Asn Glu Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

<210> 45

<211> 107

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

10

<400> 45

ES 2 698 389 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 Gly Asn Ile His Asn Phe
20 25 30

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

Tyr Asn Glu Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

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

<210> 46

<211> 19

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

10

<400> 46

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

Ala His Ser

<210> 47

15 <211> 57

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

ES 2 698 389 T3

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 47

5 atggactgga cctggagcat cctttcttg gtggcagcac caacaggtgc ccaactcc 57

<210> 48

<211> 57

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

15 <400> 48

atggactgga catggtccat cctgttctg gtggccgctc caactggcgc acactct 57

<210> 49

<211> 22

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

25

<400> 49

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys
20

<210> 50

30 <211> 66

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

ES 2 698 389 T3

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 50

atggacatga gggccccgc tcagctcctg gggctcctgc tactctggct ccgaggtgcc 60

5 agatgt 66

<210> 51

<211> 50

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

15 <400> 51

atggactgga cctggagcat cttttctg gtggcagcac caacaggtgc 50

<210> 52

<211> 50

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

25

<400> 52

ccagactgca ccagctgcac ctgggagtgg gcacctgtg gtgctgccac 50

<210> 53

30 <211> 50

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

ES 2 698 389 T3

<400> 53

gtgcagctgg tgcagtctgg ggctgaggtg aagaagcctg gggcctcagt 50

<210> 54

5 <211> 50

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 54

gtgtatccag aagcctgca ggagacctc actgaggccc caggcttctt 50

15 <210> 55

<211> 50

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 55

tgcaaggctt ctggatacac cttcaccaac tactatatac actgggtgaa 50

25

<210> 56

<211> 50

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 56

35 atccactcaa gccctgtcc aggggctgc ttcaccagc gtatatagta 50

<210> 57

ES 2 698 389 T3

<211> 50

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 57

ggacaagggc ttgagtgat aggatggatt tatcctggag atggtatcc 50

10

<210> 58

<211> 50

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 58

20 gtctgcct tgaacctc attgaacta ggactacat ctccaggata 50

<210> 59

<211> 50

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

30 <400> 59

gagagttca agggcaggac cacctgacc gcagacaagt ccacgaacac 50

<210> 60

<211> 50

35 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 60

5 gatctcaggc tgctcagcaa catgtaggct gtgttcgtgg actgtctgc 50

<210> 61

<211> 50

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

15 <400> 61

ttgctgagca gcctgagatc tgacgacacg gccgtgtatt tctgtgcgac 50

<210> 62

<211> 50

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

25

<400> 62

tagtcaaagt agtcgccatc agtgggccct gtcgcacaga aatacacggc 50

<210> 63

30 <211> 50

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 63

ES 2 698 389 T3

gatggcgact actttgacta ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc 50

<210> 64
<211> 48
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético
10

<400> 64
gaccgatggg cccttggtgg aggctgaaga gacggtgacc gtggtccc 48

<210> 65
15 <211> 70
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
20 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 65
gcccaccatgg acatgagggt ccccgctcag ctctggggc tctgctact ctggctccga 60
ggtgccagat 70

25 <210> 66
<211> 70
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 66

ES 2 698 389 T3

	tcctacagat gcagacaggg aggatggaga ctgggtcatc tggatgtcac atctggcacc	60
	tcggagccag	70
	<210> 67	
	<211> 70	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
10	<400> 67	
	ccctgtctgc atctgtagga gacagagtca ccatcacttg ccgagcaagc ggaatattc	60
	acaatttttt	70
	<210> 68	
15	<211> 70	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	
	<400> 68	
	gaacttaggg gctttccctg gtttctgttg ataccatgct aaaaaattgt gaatattccc	60
	gcttgctcgg	70
25	<210> 69	
	<211> 70	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético	

ES 2 698 389 T3

	<400> 69		
		cagggaaagc ccctaagttc ctggtctata atgaaaaaac cttagcagat ggggtccat	60
		caaggttcag	70
	<210> 70		
5	<211> 70		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
10	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético		
	<400> 70		
		gttgcagact gctgatggtg agagtatatt gtgtcccaga tccaactgcca ctgaaccttg	60
		atgggacccc	70
15	<210> 71		
	<211> 70		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
20	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético		
	<400> 71		
		caccatcagc agtctgcaac ctgaagattt tgcgacctac ttctgtcaac agttttggag	60
		tactccgtat	70
25	<210> 72		
	<211> 63		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
30	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético		

ES 2 698 389 T3

<400> 72

tttgatctcc accttgggcc ctccgccgaa cgtatacggg gtactccaaa actgttgaca 60

gaa 63

<210> 73

5 <211> 48

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 73

gacagatggt gcagccacag ttcgtttgat ctccaccttg gtcctccc 48

15 <210> 74

<211> 50

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 74

gcgaattcgt cgagccacc atggactgga cctggagcat ccttttcttg 50

25

<210> 75

<211> 33

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 75

35 cgcgctagct gaagagacgg tgacctggt ccc 33

<210> 76

<211> 33

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 76

10 gcggtcgacg ccacatgga catgagggtc ccc 33

<210> 77

<211> 48

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

20 <400> 77

gacagatggt gcagccacag ttcgttgat ctccacctg gtcctcc 48

<210> 78

<211> 438

25 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

30

<400> 78

ES 2 698 389 T3

gaattcgtcg acgccacccat ggactggaca tggatcatcc tgttcctggt ggcgctcca 60
 actggcgcac actctcaggt gcagctggtg cagagtggcg ctgaggtgaa gaaacccgga 120
 gcatcagtga aggtgtcctg caaagccagc ggatacacct tcaccaacta ctatattcat 180
 tgggtgaggc aggctcctgg acagggactg gagtggatcg gatggatcta cccaggggac 240
 ggttccccta agttcaacga aaggtttaa ggccggacca cactgaccag ggataagtca 300
 accaatacag cttacatgga actgtccagc ctgcgctctg acgatacagc agtgatttc 360
 tgtgccactg ggccaaccga cggcgactac tttgattatt gggccaggg aactaccgtg 420
 accgtgtcta gtgctagc 438

<210> 79

<211> 39

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

10

<400> 79

cgcgctgacg ccacccatgga ctggacatgg tccatcctg 39

<210> 80

15 <211> 39

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 80

atgaccgccg atacctcaac ctccacagct tacatggaa 39

25 <210> 81

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

5

<400> 81

ggttgaggta tcggcgggtca ttgtggtccg 30

<210> 82

10

<211> 39

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 82

gaggatacag cagtgattt ctgtgcccg gggccaacc 39

20

<210> 83

<211> 36

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 83

ggcacagaaa tacactgctg taccctcaga gcgag 36

30

<210> 84

<211> 33

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 84

cgcgctagca ctagacacgg tcacggtagt tcc 33

<210> 85

5 <211> 39

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 85

cgcgctgacg ccaccatgga ctggacatgg tccatcctg 39

15 <210> 86

<211> 43

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 86

ttgactatc ggcggtcagt gtggtcggc cttaaacct ttc 43

25 <210> 87

<211> 42

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 87

35 acactgaccg ccgataagtc aacctccaca gttacatgg aa 42

<210> 88

<211> 33

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 88

cgcgctagca ctagacacgg tcacggtagt tcc 33

10

<210> 89

<211> 39

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 89

20 cgcgctgacg ccacatgga catgagggtc cccgctcag 39

<210> 90

<211> 30

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

30 <400> 90

cagcagctta ggggcttcc ctggttctg 30

<210> 91

<211> 36

35 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 91

5 gggaaagccc ctaagctgct gatctataat gaaaaa 36

<210> 92

<211> 30

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

15 <400> 92

tgtcccagat ccaactgccac tgaaccttga 30

<210> 93

<211> 36

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

25

<400> 93

agtggcagtg gatctgggac agactatact ctcacc 36

<210> 94

30 <211> 33

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 94

ES 2 698 389 T3

cgccgtacgt ttgatctcca ccttggccc tcc 33

<210> 95

<211> 39

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

10

<400> 95

cgcgctgacg ccacatgga catgagggtc cccgctcag 39

<210> 96

15 <211> 40

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 96

ggtgagagta tactgtgtcc cagatccact gccactgaac 40

25 <210> 97

<211> 39

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 97

ggatctggga cacagtatac ttcacatc agcagtctg 39

35

<210> 98

<211> 33

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 98

cgccgtacgt ttgatctcca ccttgtccc tcc 33

10 <210> 99

<211> 33

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 99

cgcgctagca ccaaggccc atcgtcttc ccc 33

20

<210> 100

<211> 33

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 100

30 cgcgatatct cattaccg gagacagga gag 33

<210> 101

<211> 33

<212> ADN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 101

cgccgtacgg tggctgcacc atctgtcttc atc 33

5

<210> 102

<211> 33

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 102

15

cgcgatatcc taacactctc ccctgttgaa gct 33

<210> 103

<211> 24

<212> ADN

20

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

25

<400> 103

cgaactgtgg ctgcaccatc tgtc 24

<210> 104

<211> 38

30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

35

<400> 104

cgcgcgcccg cctaactctc tcccctgttg aagctctt 38

<210> 105

<211> 33

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 105

10 ttgctgagca gcctgagatc tgaggacacg gcc 33

<210> 106

<211> 30

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

20 <400> 106

agatctcagg ctgctcagca acatgtaggc 30

<210> 107

<211> 39

25 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

30

<400> 107

gcggaattcg tcgacgccac catgcatgg agctggatc 39

<210> 108

35 <211> 48

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 108

5 gaccgatggg cccttggtgg aggctgagga gactgtgaga gtggtgcc 48

<210> 109

<211> 41

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

15 <400> 109

gctccacca agggcccatc ggtctcccc ctggcgcct g 41

<210> 110

<211> 35

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

25

<400> 110

cgcgcgccg ctcatctacc cggagacagg gagag 35

<210> 111

30 <211> 33

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 111

gcggtcgacg ccacatgag tggctcact cag 33

<210> 112

<211> 49

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 112

gacagatggg gcagccacag ttcgtttat ttccagcttg gtccccct 49

<210> 113

15 <211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 113

cgaactgtgg ctgcaccatc tgtc 24

25 <210> 114

<211> 38

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 114

35 cgcgcgccg cctaacactc tcccctgttg aagctctt 38

<210> 115

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 115

Gln	His	His	Gly	Val	Thr	Lys	Cys	Asn	Ile	Thr	Cys	Ser	Lys	Met
1				5					10					15

10 <210> 116

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 116

Gly	Val	Thr	Lys	Cys	Asn	Ile	Thr	Cys	Ser	Lys	Met	Thr	Ser	Lys
1				5					10					15

20

<210> 117

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 117

Lys	Cys	Asn	Ile	Thr	Cys	Ser	Lys	Met	Thr	Ser	Lys	Ile	Pro	Val
1				5					10					15

30

<210> 118

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 118

Ile	Thr	Cys	Ser	Lys	Met	Thr	Ser	Lys	Ile	Pro	Val	Ala	Leu	Leu
1				5					10					15

10 <210> 119

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 119

Ser	Lys	Met	Thr	Ser	Lys	Ile	Pro	Val	Ala	Leu	Leu	Ile	His	Tyr
1				5					10					15

20

<210> 120

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 120

Thr	Ser	Lys	Ile	Pro	Val	Ala	Leu	Leu	Ile	His	Tyr	Gln	Gln	Asn
1				5					10					15

30

<210> 121

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

5

<400> 121

Ile Pro Val Ala Leu Leu Ile His Tyr Gln Gln Asn Gln Ala Ser
 1 5 10 15

<210> 122

10

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 122

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

20

<210> 123

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 123

Ile His Tyr Gln Gln Asn Gln Ala Ser Cys Gly Lys Arg Ala Ile
 1 5 10 15

30

<210> 124

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 698 389 T3

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 124

5 Gln Gln Asn Gln Ala Ser Cys Gly Lys Arg Ala Ile Ile Leu Glu
 1 5 10 15

<210> 125

<211> 15

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

15 <400> 125

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

<210> 126

<211> 15

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

25 <400> 126

 Cys Gly Lys Arg Ala Ile Ile Leu Glu Thr Arg Gln His Arg Leu
 1 5 10 15

<210> 127

30 <211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 698 389 T3

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 127

5 Arg Ala Ile Ile Leu Glu Thr Arg Gln His Arg Leu Phe Cys Ala
1 5 10 15

<210> 128

<211> 15

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

15 <400> 128

Ile Leu Glu Thr Arg Gln His Arg Leu Phe Cys Ala Asp Pro Lys
1 5 10 15

<210> 129

<211> 15

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

25

<400> 129

Thr Arg Gln His Arg Leu Phe Cys Ala Asp Pro Lys Glu Gln Trp
1 5 10 15

<210> 130

30 <211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 130

His	Arg	Leu	Phe	Cys	Ala	Asp	Pro	Lys	Glu	Gln	Trp	Val	Lys	Asp
1				5					10					15

5

<210> 131

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 131

Phe	Cys	Ala	Asp	Pro	Lys	Glu	Gln	Trp	Val	Lys	Asp	Ala	Met	Gln
1				5					10					15

15

<210> 132

<211> 15

<212> PRT

20

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

25

<400> 132

Asp	Pro	Lys	Glu	Gln	Trp	Val	Lys	Asp	Ala	Met	Gln	His	Leu	Asp
1				5					10					15

30

<210> 133

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 133

	Glu	Gln	Trp	Val	Lys	Asp	Ala	Met	Gln	His	Leu	Asp	Arg	Gln	Ala
	1				5					10					15

5

<210> 134

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 134

	Val	Lys	Asp	Ala	Met	Gln	His	Leu	Asp	Arg	Gln	Ala	Ala	Ala	Leu
	1				5					10					15

15

<210> 135

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 135

	Ala	Met	Gln	His	Leu	Asp	Arg	Gln	Ala	Ala	Ala	Leu	Thr	Arg	Asn	Gly
	1				5					10						15

25

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-fractalcina o fragmento de unión a fractalcina del mismo, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a fractalcina del mismo comprende una cadena pesada y una cadena ligera,
 - 5 en el que la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26 y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de NO: 27,
 - la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36 y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de NO: 38,
 - la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36 y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de NO: 44,
 - 10 la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37 y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de NO: 38,
 - la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37 y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de NO: 44, o
 - 15 la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37 y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de NO: 45.
2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo es un anticuerpo intacto.
3. El anticuerpo o fragmento de unión a fractalcina del mismo de la reivindicación 1 o 2, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a fractalcina es humanizado.
4. El anticuerpo o fragmento de unión a fractalcina del mismo de la reivindicación 1, 2 o 3, en el que el anticuerpo o
 - 20 fragmento de unión a fractalcina es quimérico.
 5. El anticuerpo o fragmento de unión a fractalcina del mismo de la reivindicación 4, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en el que el dominio variable de la cadena pesada de dicho anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26, y en el que el dominio variable de la cadena ligera de dicho anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27.
- 25 6. El anticuerpo o fragmento de unión a fractalcina del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el anticuerpo o su fragmento comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 44.
7. El anticuerpo o fragmento de unión a fractalcina del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende una región constante humana.
- 30 8. El anticuerpo o fragmento de unión a fractalcina del mismo de la reivindicación 7, que comprende una región constante de un isotipo IgG.
9. El anticuerpo o fragmento de unión a fractalcina del mismo de la reivindicación 8, que comprende una región constante del isotipo IgG2.
10. El anticuerpo o fragmento de unión a fractalcina del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que
 - 35 comprende una región Fc mutada de forma que dicho anticuerpo tiene ADCC y/o activación del complemento reducidas.
 11. El anticuerpo o fragmento de unión a fractalcina del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o las reivindicaciones 3 a 9, en el que el fragmento de unión a fractalcina se selecciona del grupo que consiste en un Fab, un Fab', un F(ab')₂ y un Fv, y en el que el fragmento de unión a fractalcina retiene la especificidad de unión a
 - 40 fractalcina.
 12. El anticuerpo o fragmento de unión a fractalcina del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que el anticuerpo inhibe la unión entre fractalcina y CX3CR1.
 13. El anticuerpo o fragmento de unión a fractalcina del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, para su uso en el tratamiento de un trastorno inflamatorio, en el que el trastorno inflamatorio es colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn o artritis reumatoide.
 - 45 14. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a fractalcina del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13.
 15. La composición farmacéutica de la reivindicación 14, para su uso en el tratamiento de un trastorno inflamatorio, en el que el trastorno inflamatorio es colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn o artritis reumatoide.

16. La composición farmacéutica de la reivindicación 14 o 15, en el que la composición comprende además un vehículo.
17. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 14-16, en el que la composición comprende además un agente terapéutico adicional.
- 5 18. Un ácido nucleico que codifica el anticuerpo o fragmento de unión a fractalcina del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13.
19. Un vector que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 18.
20. El vector de la reivindicación 19, en el que el vector es un vector de expresión.
21. Una célula hospedadora que comprende uno o más vectores de la reivindicación 19 o 20.
- 10 22. La célula hospedadora de la reivindicación 21, en el que dicha célula hospedadora comprende un primer y segundo vector, comprendiendo dicho primer vector un ácido nucleico que codifica una cadena pesada y comprendiendo dicho segundo vector un ácido nucleico que codifica una cadena ligera del anticuerpo o fragmento de unión a fractalcina del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13.
- 15 23. La célula hospedadora de la reivindicación 22, en la que la expresión de dicha cadena pesada y ligera en dicha célula hospedadora produce un anticuerpo o fragmento de unión a fractalcina del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13.
24. La célula hospedadora de una cualquiera de las reivindicaciones 21-23, en la que la célula hospedadora es procariota.
- 20 25. La célula hospedadora de una cualquiera de las reivindicaciones 21-23, en la que la célula hospedadora es eucariota.
26. La célula hospedadora de la reivindicación 25, en la que la célula hospedadora es de mamífero.
27. La célula hospedadora de la reivindicación 26, en la que la célula es una célula CHO o célula NS0.
28. Un método de preparación de un anticuerpo anti-fractalcina o fragmento de unión a fractalcina del mismo, comprendiendo dicho método (a) expresar el vector de una cualquiera de la reivindicación 19 o 20 en una célula hospedadora adecuada, y (b) recuperar el anticuerpo o fragmento de unión a fractalcina del mismo.
- 25 29. El método de la reivindicación 28, en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión a fractalcina del mismo se secreta por dicha célula hospedadora en medios de cultivo.
30. El método de la reivindicación 29, en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión a fractalcina del mismo se purifica hasta al menos 95 % o más con respecto a dicho anticuerpo que contiene medios de cultivo.
- 30 31. El uso de un anticuerpo o fragmento de unión a fractalcina del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-13 en la preparación de un medicamento para su uso en el tratamiento de un trastorno inflamatorio, en el que el trastorno inflamatorio es colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn o artritis reumatoide.

Figura 1

MAPISLWLLRLATFCHLTVLLAGQHGGVTKCNITCSKMTSKIPVALLIHYQQN
QASCGKRAIILETRQHRLFCADPKEQWVKDAMQHLDRQAAALTRNGGTFEKQI
GEVKPRITTPAAGGMDESIVLEPEATGESSLETPSSQEAQRALGTSPELPTGVTG
SSGTRLPPTPKAQDGGPVGTELFRRVPPVSTATWQSSAPHQPPSLWAEAKTSE
APSTQDPSTQASTASSPAPEENAPSEGQRVWGGQSPRPENSLEREEMGPVPA
HTDAFQDWGPGSMAHVSVPVSSSEGTSPREPVASGSWTPKAEETIHA TMDPQR
LGVLIITPVPDAQAA TRRQAVGLLAFLLGFLGVMFTYQSLQGCPRKMAGEMAE
GLRYIPRSCGSNSYLVVPV (SEQ ID NO: 1)

Figura 2

	1F3-1	3A5-2	3H7-6
Ensayo de quimiotaxia CI ₅₀ (nM)	Ratón -	-	-
	Humano 12,67 (±5,07)	4,80 (±1,33)	19,07 (±5,13)
Afinidad (BIACORE) KD (nM)	Ratón -	-	-
	Humano 0,66	0,60	0,83
Reactividad a FKN de mono cinomolgo (ELISA)	No igual a humano	igual a humano	igual a humano

- : sin actividad

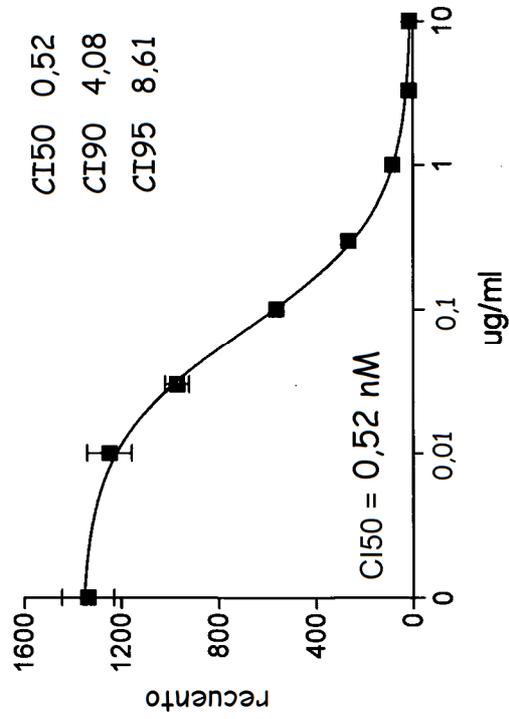
Figura 5

		1°	2°	3°	Prom.	DE
ratón	CI50	0,52	0,61	0,54	0,55	0,05
	CI90	4,08	4,24	3,23	3,85	0,55
	CI95	8,61	10,84	6,66	8,70	2,09
químérico	CI50	0,34	0,29	0,43	0,35	0,07
	CI90	3,36	2,21	1,66	2,41	0,87
	CI95	7,07	5,24	3,15	5,15	1,96
	CI50	0,47	0,26	0,29	0,34	0,12
H3L2	CI90	2,94	2,25	1,34	2,18	0,80
	CI95	5,61	4,69	2,91	4,40	1,37
	CI50	0,44	0,91	0,44	0,60	0,27
H3L4	CI90	8,34	5,11	4,43	5,96	2,09
	CI95	15,92	50,26	10,46	25,54	21,58
	CI50	0,25	0,23	0,27	0,25	0,02
H3-2L2	CI90	2,23	2,13	2,67	2,34	0,29
	CI95	4,25	5,28	5,59	5,04	0,70
	CI50	0,20	0,65	0,45	0,43	0,23
H3-2L4	CI90	2,71	3,01	2,98	2,90	0,17
	CI95	6,36	7,00	5,92	6,43	0,54
	CI50	0,13	0,46	0,57	0,39	0,23
H3-2L5	CI90	1,97	4,92	3,84	3,58	1,49
	CI95	5,81	17,47	6,68	9,99	6,50
	CI50	16,49	27,86	ND		
HK2L2	CI90	>66,67	>66,67	ND		
	CI95	>66,67	>66,67	ND		
	CI50	16,87	19,59	ND		
HK2L4	CI90	>66,67	>66,67	ND		
	CI95	>66,67	>66,67	ND		
	CI50	1,65	8,50	9,63	6,59	4,32
HK3L2	CI90	>66,67	>66,67	>66,67		
	CI95	>66,67	>66,67	>66,67		
	CI50	0,42	25,25	>66,67	12,84	17,56
HK3L4	CI90	>66,67	>66,67	>66,67		
	CI95	>66,67	>66,67	>66,67		
	CI50	1,10	14,17	13,50	9,59	7,36
HK3L5	CI90	>66,67	>66,67	>66,67		
	CI95	>66,67	>66,67	>66,67		

Figura 6

A

m3A5-2 (hibridoma)



B

Quimérico

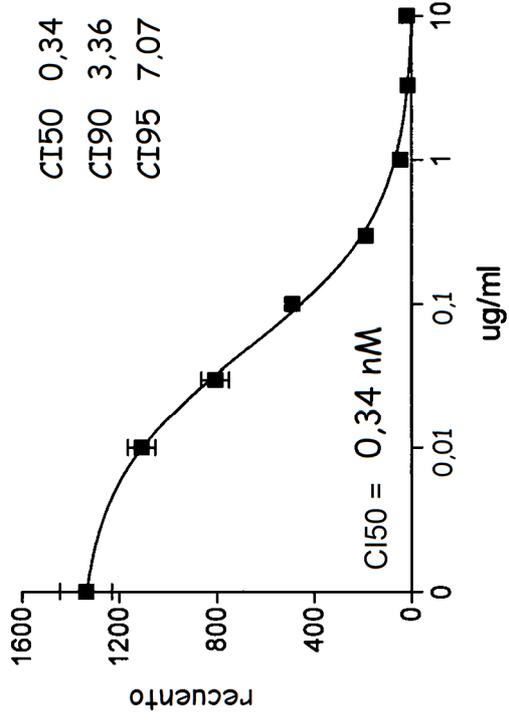


Figura 7

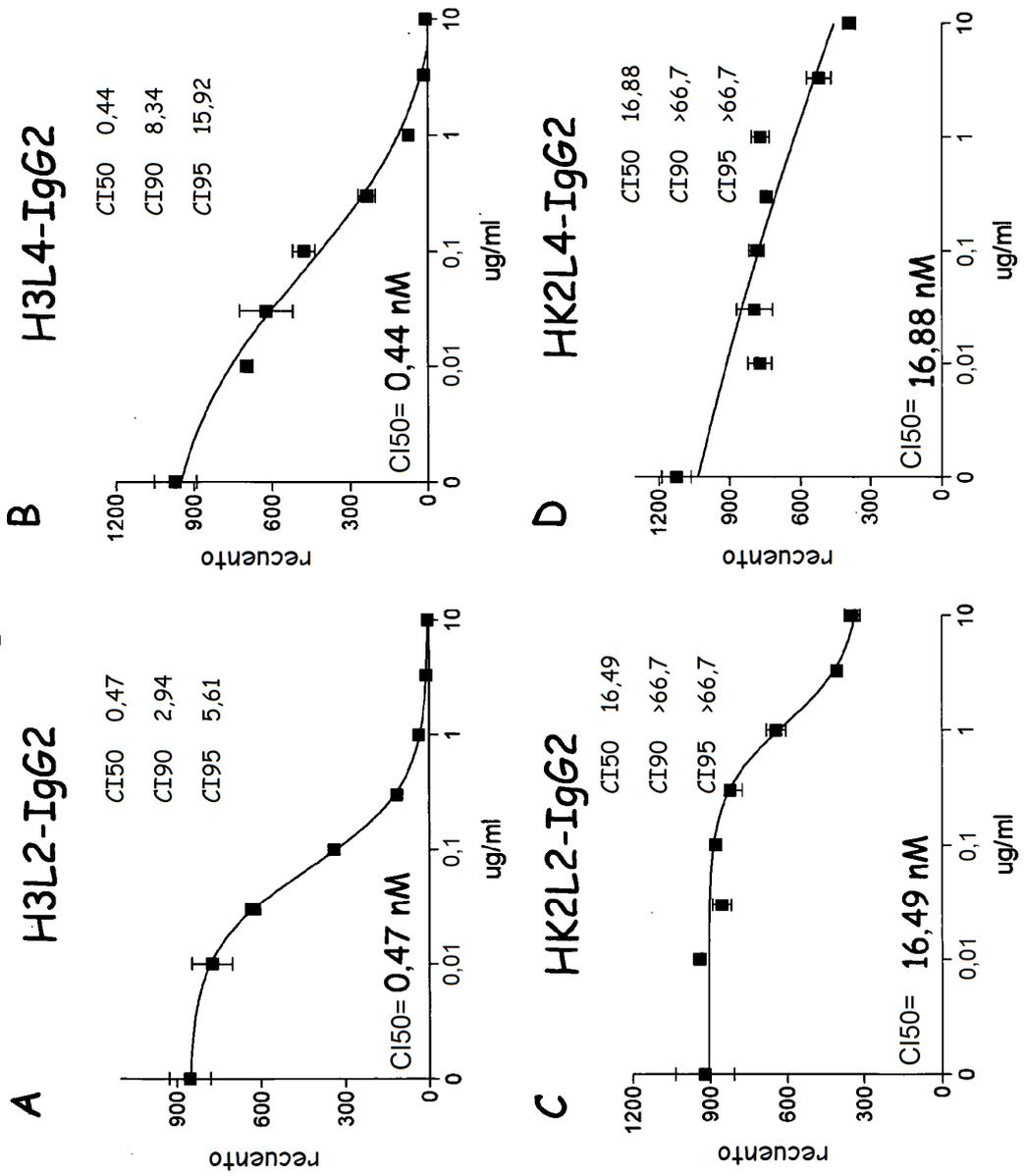


Figura 8

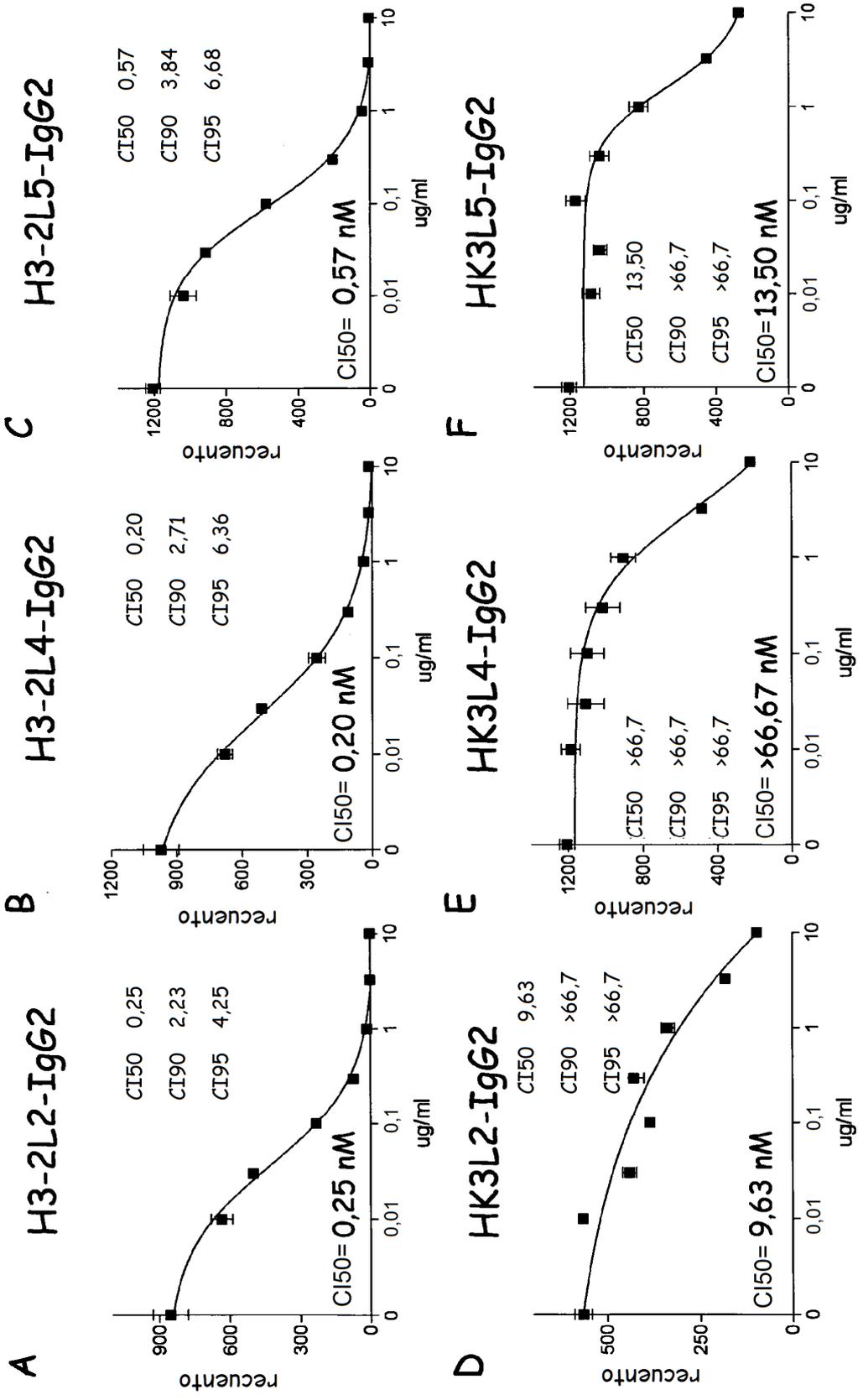


Figura 9

mAbs	FKN humana-SEAP		FKA de cinomolgo-SEAP	
	ka (1/Ms)	kd (1/s)	ka (1/Ms)	kd (1/s)
quimérico	1,34E+07	9,58E-05	1,43E+07	9,54E-05
H3L2	1,32E+07	1,16E-04	1,26E+07	1,22E-04
H3-2L2	1,50E+07	8,83E-05	1,39E+07	9,43E-05
H3L4	1,56E+07	1,05E-04	1,61E+07	1,87E-04
H3-2L4	1,88E+07	1,01E-04	1,49E+07	1,15E-04
HK2L4	1,83E+07	6,14E-04	2,49E+07	6,35E-04

Figura 10

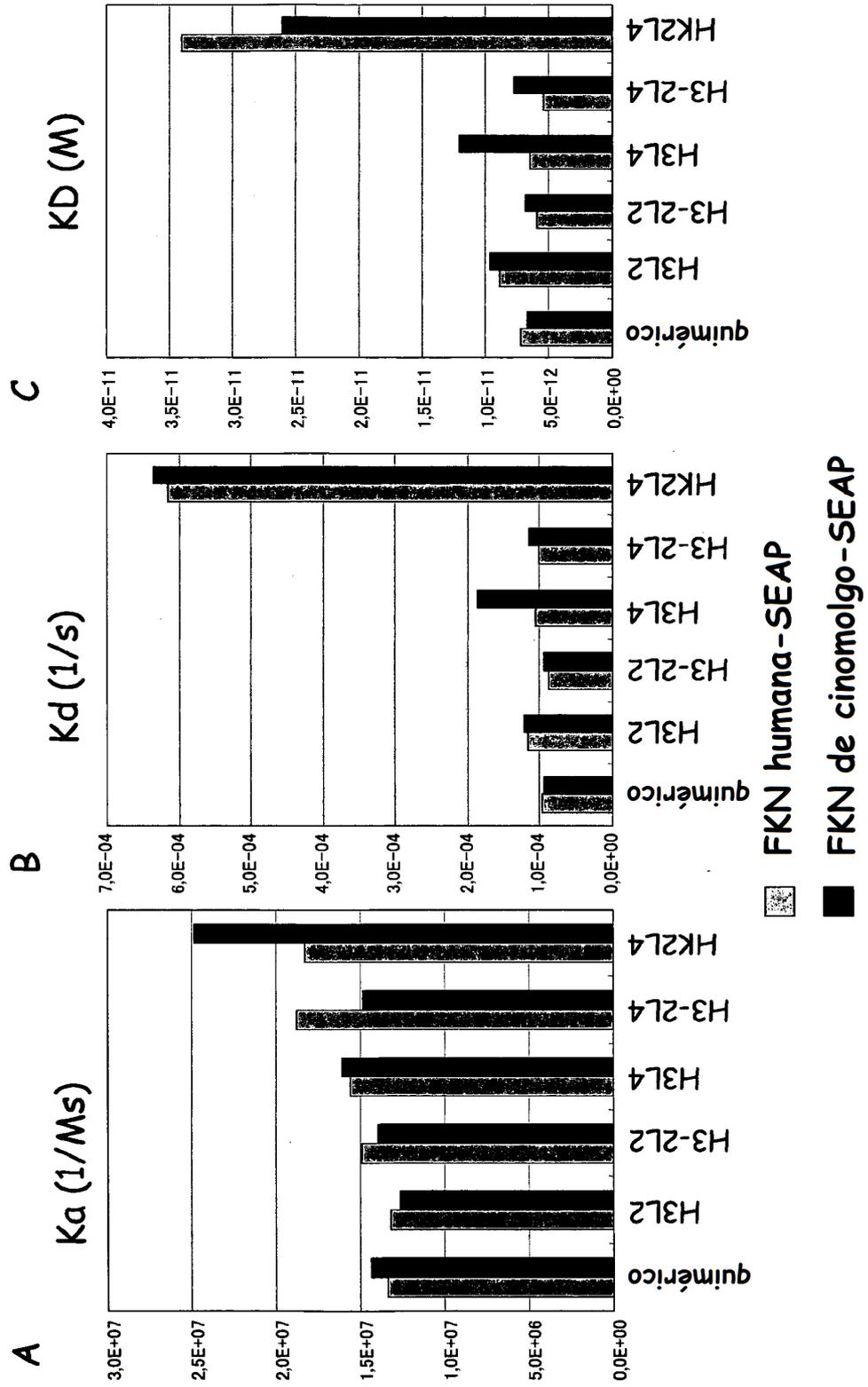


Figura 11

Mapeo de epítopes (ELISA de péptidos)

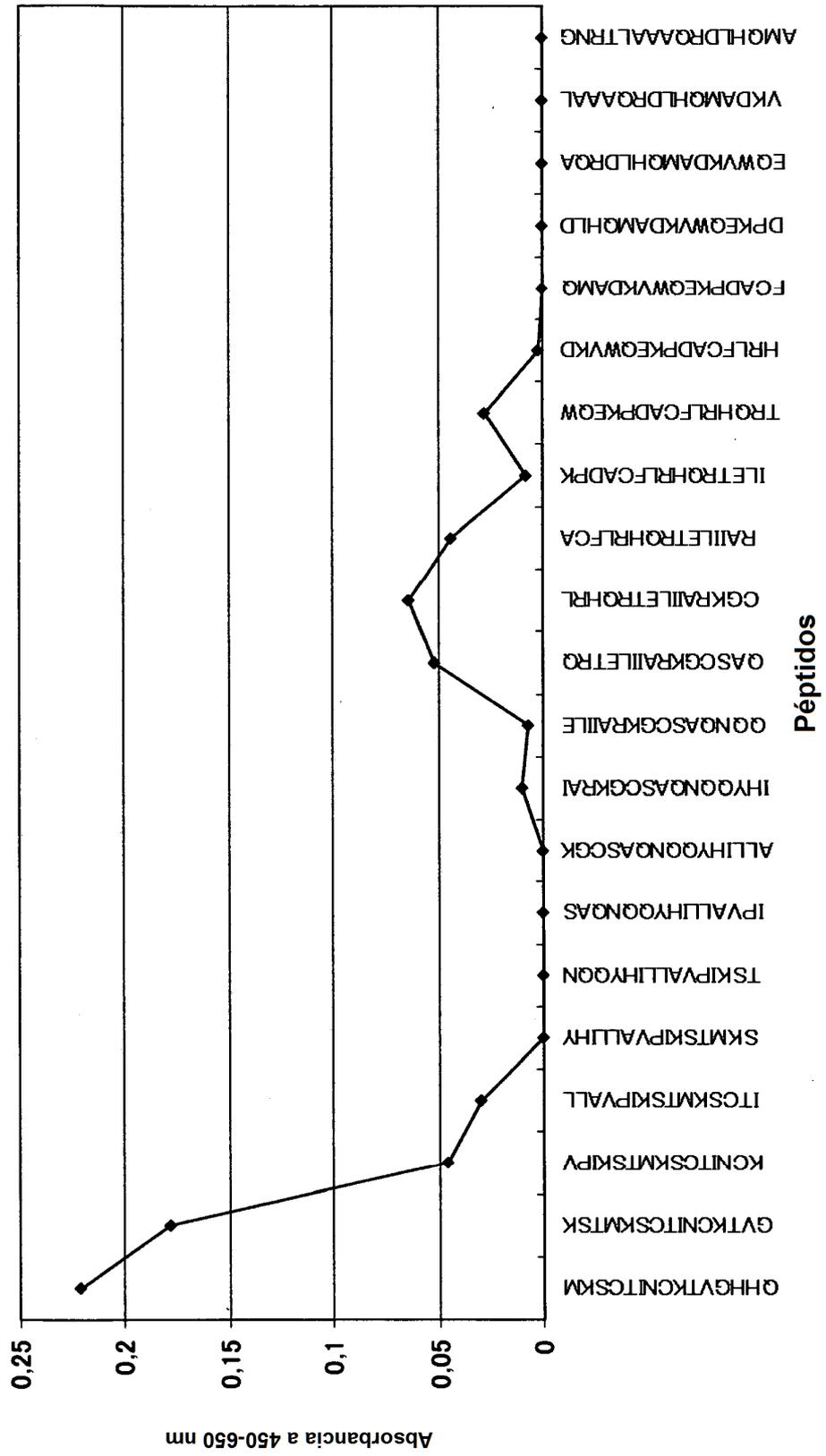
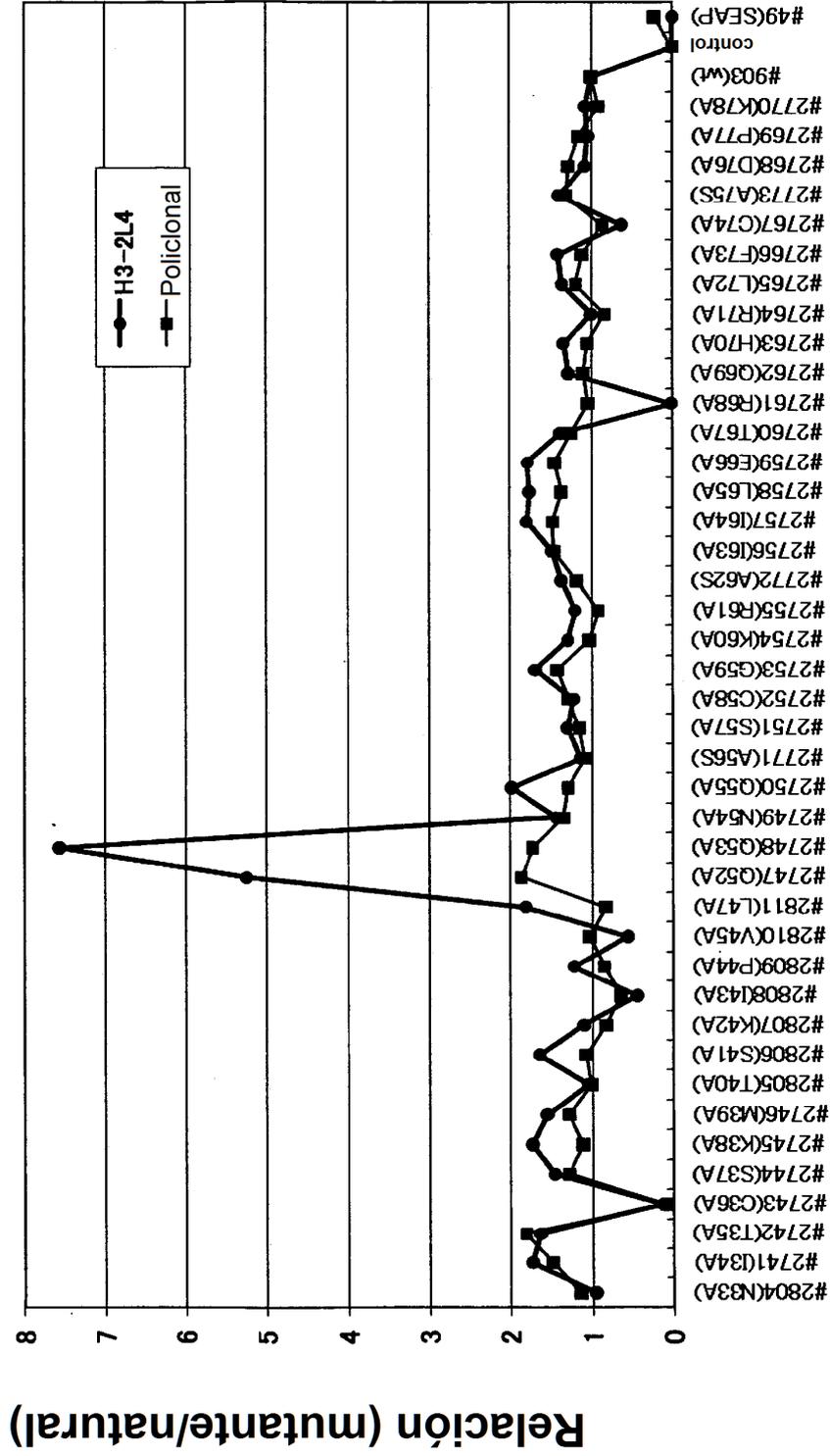


Figura 12
ELISA de mapeo de péptidos



Mutantes de alanina

Figura 13

BIACORE de mapeo de epítopes

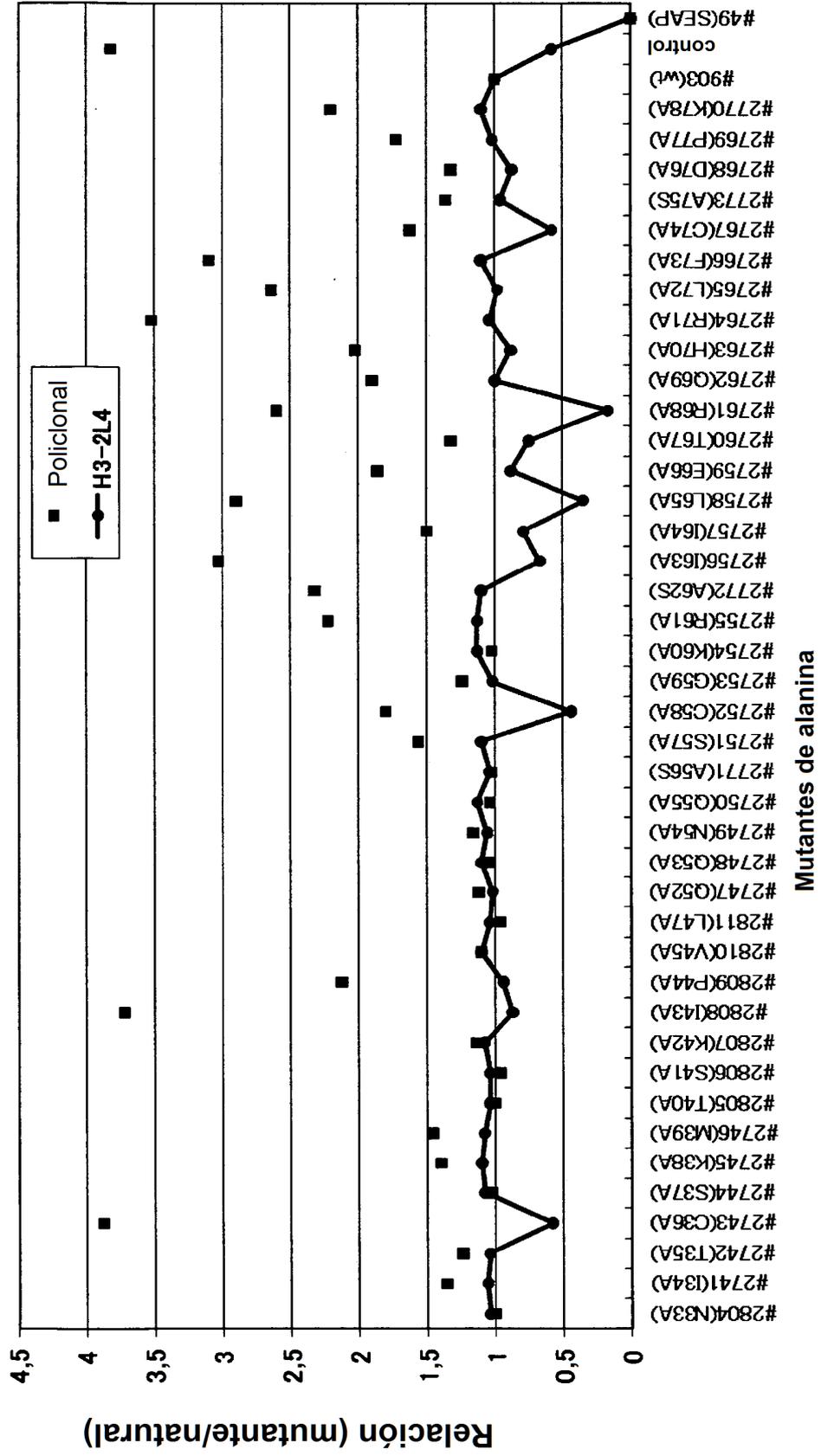


Figura 14

Gris: Saturación cruzada
 Negro: Mapeo de desplazamiento químico

