

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 699 078**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.03.2011 E 15178026 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.09.2018 EP 3025729**

54 Título: **Proteínas de unión a antígeno específicas para componente amiloide sérico P**

30 Prioridad:

03.03.2010 US 309957 P

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

07.02.2019

73 Titular/es:

**GLAXO GROUP LIMITED (100.0%)
980 Great West Road
Brentford, Middlesex TW8 9GS, GB**

72 Inventor/es:

**BHINDER, TEJINDER KAUR;
FORD, SUSANNAH KAREN;
GERMASCHEWSKI, VOLKER;
LEWIS, ALAN PETER y
PEPYS, MARK BRIAN**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 699 078 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

Proteínas de unión a antígeno específicas para componente amiloide sérico P

Campo de la invención

La presente descripción se refiere a proteínas de unión a antígeno, tales como anticuerpos, que se unen al componente amiloide sérico P (SAP, *serum amyloid P*), a polinucleótidos que codifican dichas proteínas de unión a antígeno, a composiciones farmacéuticas que comprenden dichas proteínas de unión a antígeno y a procedimientos de fabricación. La presente descripción también se refiere al uso de dichas proteínas de unión a antígeno en el tratamiento o profilaxis de enfermedades asociadas con deposición amiloide que incluyen amiloidosis sistémica, amiloidosis local, enfermedad de Alzheimer y diabetes de tipo 2.

Antecedentes de la invención

La amiloidosis es una enfermedad grave y habitualmente letal causada por la acumulación extracelular en los tejidos de fibras de proteínas insolubles anómalas conocidas como fibrillas amiloides. Estas derivan de más de 20 proteínas diferentes en formas diferentes de la enfermedad pero todas las fibrillas amiloides comparten una estructura de núcleo β -cruzada común y todas derivan por plegamiento erróneo de proteínas precursoras normalmente solubles (Pepys, M.B. (2006) Annu. Rev. Med., 57: 223-241). El componente amiloide sérico P (SAP), una proteína plasmática no fibrilar, también está siempre presente en los depósitos amiloides, en virtud de su ávida unión específica dependiente del calcio con todos los tipos de fibrillas amiloides (Pepys y col. (1979) Clin. Exp. Immunol., 38: 284-293; Pepys y col. (1997) Amyloid: Int. J. Exp. Clin. Invest., 4: 274-295).

El SAP humano es una proteína constitutiva en el plasma, a una concentración de aproximadamente 20-40 mg/l (Nelson y col. (1991) Clin. Chim. Acta, 200:191-200) y con un total de SAP de aproximadamente 50-100 mg en los compartimentos plasmáticos y extravasculares combinados tanto en individuos normales como en pacientes con enfermedades distintas a la amiloidosis (Hawkins y col. (1990) J. Clin. Invest., 86: 1862-1869). En pacientes con amiloidosis, el SAP se encuentra también específicamente concentrado en los depósitos amiloides y en un individuo con amiloidosis sistémica amplia puede encontrarse tanto como 20.000 mg de SAP en el amiloide (Pepys y col. (1994) PNAS, 91: 5602-5606), unido reversiblemente a las fibrillas y en equilibrio con el conjunto del SAP en fase líquida. La función fisiológica normal del SAP circulante no se comprende bien, pero experimentos con animales y estudios *in vitro* sugieren un papel en la defensa del huésped (Noursadeghi y col. (2000) PNAS, 97: 14584-14589)). El SAP es también un constituyente normal de la matriz tisular, que se asocia con las fibras elásticas y con la membrana basal glomerular aunque se desconoce su función.

En la amiloidosis, los depósitos amiloides extracelulares causan enfermedades debido a una acumulación progresiva, hasta que lesionan la estructura y por tanto la función de cualquier tejido que ocupan (Pepys, M.B. (2006) Annu. Rev. Med., 57: 223-241). Es muy poco frecuente alguna respuesta inflamatoria o 'cuerpo extraño' contra la deposición amiloide, observada localmente en los tejidos o sugerida por marcadores de inflamación sistémicos. La amiloidosis sistémica puede implicar cualquier órgano, es normalmente letal y causa ~1 por mil de muertes en los países desarrollados. El amiloide localizado, confinado a un solo sitio anatómico o tipo de tejido, también puede ser muy grave, por ejemplo, la angiopatía amiloide cerebral es una causa importante de ictus hemorrágico. Las presentaciones clínicas de la amiloidosis son extremadamente diversas y los diagnósticos raras veces se hacen antes de que se presente una lesión orgánica significativa. Más de 20 proteínas fibrilares amiloides diferentes son responsables de diferentes formas de amiloidosis, aunque los tratamientos que reducen sustancialmente la abundancia de la proteína precursora fibrilar amiloide respectiva detienen la acumulación amiloide y los depósitos pueden remitir. Desgraciadamente no siempre existen medidas eficaces disponibles y, cuando existen, son tóxicas o arriesgadas y de baja actuación (Pepys, M.B (2006) Annu. Rev. Med., 57: 223-241). Existe por lo tanto una necesidad médica insatisfecha para una terapia que promueva con toda seguridad la eliminación de depósitos amiloides establecidos. Además, existen otras afecciones en las que los depósitos amiloides están siempre presentes, con mayor importancia la enfermedad de Alzheimer (AD) y la diabetes mellitus de tipo 2, en las que se desconoce la contribución de la deposición amiloide con respecto a la patogenia de la enfermedad, específicamente la pérdida de la función cognitiva y de los islotes pancreáticos, respectivamente (Pepys, M.B. (2006) Annu. Rev. Med., 57: 223-241). Sin embargo, puede demostrarse que los depósitos amiloides en cualquier parte del cuerpo son patógenos y es probable que los depósitos cerebrales de la AD y los depósitos amiloides de los islotes de la diabetes de tipo 2 sean también nocivos. Dado que el tratamiento que elimina los depósitos amiloides en la amiloidosis sistémica será sin duda terapéutico (Pepys, M.B. (2006) Annu. Rev. Med., 57: 223-241), la eliminación de los depósitos amiloides en la AD y en la diabetes de tipo 2 también debe ser clínicamente beneficiosa.

La unión del SAP estabiliza las fibrillas amiloides, las protege de la proteólisis *in vitro* (Tennent y col., (1995) PNAS, 92: 4299-4303), puede potenciar la fibrillogénesis amiloides *in vitro* (Myers y col., (2006), Biochemistry, 45: 2311-2321) y contribuye a la patogenia de la amiloidosis sistémica *in vivo* (Botto y col., (1997) Nature Med., 3: 855-859). Junto con su presencia universal en todos los depósitos amiloides, estas propiedades del SAP hacen que este sea una diana terapéutica atractiva.

La solicitud de patente europea EP 0915088 desvela compuestos derivados de D-prolina que son inhibidores competitivos de la unión del SAP a fibrillas amiloides, así como procedimientos para su fabricación. En el documento EP 0915088 se desvela un compuesto preferido el ácido (R)-1-[6-[(R)-2-Carboxi-pirrolidin-1-il]-6-oxo oxohexanoil] pirrolidina-2-carboxílico (CPHPC).

5 La solicitud de patente internacional WO 03/051836 desvela profármacos para compuestos derivados de D-prolina.

La solicitud de patente internacional WO 2004/099173 desvela derivados de piruvato de glicerol cíclico que son inhibidores competitivos de la unión de SAP a fibrillas amiloides.

10 La solicitud de patente internacional WO 04/059318 describe procedimientos que aseguran que mejoran la formación de fibrocitos que comprende el suministro de composiciones que se unen al SAP. Dichas composiciones incluyen anticuerpos anti-SAP y CPHPC. El documento WO 04/059318 no describe el tratamiento de enfermedades asociadas a la deposición amiloides. Además, existen pruebas clínicas convincentes e *in vivo* de que ni el SAP ni su reducción tienen ningún efecto sobre la fibrosis en seres humanos (Tennent y col., (2007) *Arthritis Rheum.*, 56: 2013-2017; Pepys, M.B., Tennent, G.A. and Denton, C.P. (2007) Reply to Letter from Pilling, D., Buckley, C.D., Salmon, M. and Gomer, R.G., Serum amyloid P and fibrosis in systemic sclerosis: comment on the article by Tennent y col. *Arthritis Rheum.*, 56: 4229-4230).

15 El compuesto bis-D-prolina, CPHPC, desvelado en las patentes indicadas anteriormente, se une con elevada afinidad al SAP humano y se consideró como un fármaco para extraer el SAP de los depósitos amiloides *in vivo* y por lo tanto facilitar su eliminación. La unión del CPHPC al SAP induce la eliminación rápida del complejo por el hígado, reduce casi todo el SAP circulante siempre que se administre el fármaco y extrae bastante pero no todo el SAP unido al amiloide (Pepys y col., (2002) *Nature*, 417: 254-259). En estudios clínicos iniciales (Gillmore y col., (2010) *Brit. J. Haematol.*, doi:10.1111/j.1365-2141.2009.08036.x), la administración del CPHPC pareció detener la acumulación amiloide pero no produjo regresión amiloide y por lo tanto el CPHPC no extrae completamente todo el SAP de los depósitos amiloides, por lo que se necesita otra estrategia.

20 La solicitud de patente internacional WO 2009/000926 desvela el uso de compuestos que reducen el SAP de la circulación, tales como derivados de D-prolina, en particular el CPHPC, en combinación con un anticuerpo específico para SAP para tratamiento o profilaxis de la amiloidosis.

25 La solicitud de patente internacional relacionada PCT/EP2008/011135 (documento WO 2009/15592) se refiere a diversos anticuerpos monoclonales de ratón que pueden usarse en combinación con compuestos que reducen el SAP de la circulación, tales como derivados de D-prolina, en particular el CPHPC, para el tratamiento o la profilaxis de la amiloidosis.

30 Por consiguiente, existe una necesidad en la técnica para anticuerpos, particularmente anticuerpos humanizados o humanos, que dirijan específicamente el SAP y proporcionen eficacia terapéutica mejorada en pacientes, particularmente pacientes humanos, con enfermedades asociadas con la deposición amiloide con objeto de preservar la función orgánica y prolongar la vida.

35 **Sumario de la invención**

La presente memoria descriptiva describe una proteína de unión a antígeno que se une específicamente al SAP y compete por la unión a SAP con un anticuerpo de referencia que comprende una secuencia de región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 7, y una secuencia de región variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 9.

40 La presente memoria descriptiva describe una proteína de unión a antígeno que se une a SAP y comprende la CDRH3 expuesta en la SEQ ID NO: 3 o una variante funcional de la CDRH3.

La presente memoria descriptiva describe una proteína de unión a antígeno que se une de manera específica a SAP, en la que la proteína de unión a antígeno es un anticuerpo quimérico o humanizado que comprende la correspondiente CDRH3 de la secuencia del dominio variable de la SEQ ID NO:7, o una variante funcional de CDRH3.

45 La presente memoria descriptiva describe una proteína de unión a antígeno que se une de manera específica a SAP, y comprende una unidad de unión H3 que comprende los restos Kabat 95-101 de la SEQ ID NO:7, o una variante funcional de la unidad de unión H3.

50 La presente memoria descriptiva describe una proteína de unión a antígeno que se une de manera específica a SAP y comprende una región variable de cadena pesada seleccionada de la SEQ ID NO:27-31; y/o una región variable de cadena ligera seleccionada de la SEQ ID NO:34-36; o una variante de la región variable de cadena pesada o de la región variable de cadena ligera con el 75 % o más de identidad de secuencia.

La presente memoria descriptiva describe una proteína de unión a antígeno que se une específicamente al SAP y que comprende una cadena pesada de la SEQ ID NO: 62; y/o una cadena ligera de la SEQ ID NO: 64; o una variante de cadena pesada o de cadena ligera con el 75 % o más de identidad de secuencia.

La presente invención proporciona células huéspedes capaces de producir las proteínas de unión a antígeno de la invención.

- La presente memoria descriptiva describe una composición farmacéutica que comprende una proteína de unión a antígeno como se define en este documento. La presente memoria descriptiva describe procedimientos para prevenir y/o tratar a un sujeto susceptible de o afligido por una enfermedad asociada con la deposición amiloide, cuyo procedimiento comprende la etapa de administrar, a dicho sujeto, una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de una proteína de unión a antígeno a dicho sujeto. Se proporciona el uso de una proteína de unión a antígeno, como se define en el presente documento, para prevenir y/o tratar a un sujeto susceptible de o afligido por una enfermedad asociada con la deposición amiloide. También se describe el uso de una proteína de unión a antígeno, como se define en el presente documento, para la fabricación de un medicamento para prevenir y/o tratar a un sujeto susceptible de o afligido por una enfermedad asociada con la deposición amiloide.

Breve descripción de las figuras

- La Figura 1 muestra las curvas de unión de anticuerpos murinos SAP-E y SAP-K a una concentración de revestimiento de SAP humano de 1 µg/ml.
- La Figura 2 muestra las curvas de unión de anticuerpos murinos SAP-E y SAP-K a una concentración de revestimiento de SAP humano de 5 µg/ml.
- La Figura 3 muestra las curvas de unión de anticuerpos quiméricos cSAP-E y cSAP-K. El perfil de las curvas de los anticuerpos quiméricos es el mismo que el de los hibridomas equivalentes.
- La Figura 4 muestra las curvas de unión para SAP-K H0L0, SAP-K H1L0, SAP-K H2L0 y SAP-K H3L0 en comparación con la quimera de SAP-K y SAP-E H1L1 en comparación con la quimera de SAP-E. También se ensayó un anticuerpo kappa IgG1 humano irrelevante como un control negativo.
- La Figura 5 muestra anticuerpos monoclonales murinos SAP-K y SAP-E purificados en un ELISA de competencia con la quimera SAP-E.
- La Figura 6 muestra anticuerpos monoclonales murinos SAP-K y SAP-E purificados en un ELISA de competencia con la quimera SAP-K.
- La Figura 7 muestra un ensayo inmunoradiométrico de la unión de anticuerpos monoclonales de ratón SAP-E y SAP-K al SAP humano capturados por el anticuerpo anti-SAP humano policlonal de oveja inmovilizado.
- La Figura 8 muestra el mapeo epitópico del anticuerpo SAP-E anti-SAP humano monoclonal.
- La Figura 9 muestra la localización de los epítopes en el SAP humano reconocido por SAP-K (A, resaltado en negrita) y SAP-E (B, mostrado en blanco).
- La Figura 10 muestra la activación de C3 por anticuerpos anti-SAP humano monoclonales humanizados a dosis bajas, en suero humano completo.
- La Figura 11 muestra la activación de C3 por anticuerpos anti-SAP humanos monoclonales humanizados en suero humano completo a dosis reducidas.
- La Figura 12 muestra la activación C3 por anticuerpos anti-SAP humanos monoclonales humanizados en suero de ratón completo complementado con SAP humano puro.

Descripción detallada de la invención

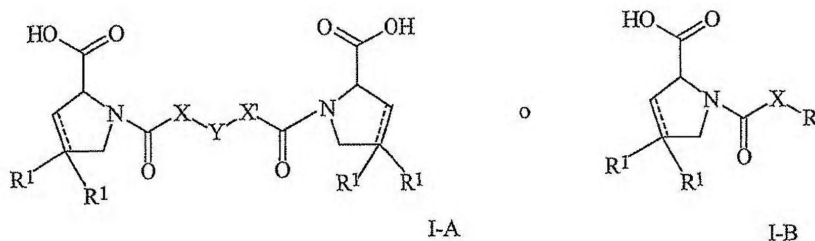
- La presente memoria descriptiva describe una proteína de unión a antígeno que se une al componente amiloide sérico P (SAP), por ejemplo al SAP humano, y su antígeno específico (es decir, una proteína de unión al SAP). En aplicaciones terapéuticas de la invención, la proteína de unión a antígeno activa los poderosos mecanismos corporales para la eliminación de residuos anómalos de los tejidos. La proteína de unión a antígeno puede ser un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal. Una proteína de unión a antígeno de la invención no es un anticuerpo de murino. En una realización, una proteína de unión a antígeno de la invención no es una proteína de unión a antígeno de murino. En particular, una proteína de unión a antígeno de la invención es una proteína de unión a antígeno quimérica, humanizada o humana.

- El "componente amiloide sérico P" o "SAP" se refiere a una glicoproteína plasmática homopentamérica de la familia pentraxina. Cada molécula está compuesta por 5 protómeros idénticos, cada uno con un plegamiento en barril β aplanado y una sola hélice alfa, asociados no covalentemente en un anillo de tipo disco con simetría pentamérica cíclica (Hutchinson y col., (2000) Mol. Med., 6: 482-493); Pepys y col., (2002) Nature, 417: 254-259). El término "SAP" como se usa en el presente documento también incluye la subunidad individual codificada por el gen humano APCS (cromosoma: 1; Localización: 1q21-q23) o genes homólogos en otros organismos, por ejemplo, la subunidad polipeptídica del SAP humano que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 43 así como la forma

pentamérica natural del SAP y cualquiera de los fragmentos y variantes del SAP que conserven la actividad biológica de unión a fibrillas amiloides *in vivo*.

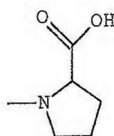
5 unión a antígeno de la invención se une al SAP humano. La proteína de unión a SAP descrita en el presente documento puede unirse al SAP cuando el SAP está unido a fibrillas amiloides de cualquier tipo y en cualquier localización extracelular dentro del cuerpo. La proteína de unión a antígeno descrita en el presente documento también puede unirse al SAP natural no unido.

10 documento en procedimientos terapéuticos es que la concentración del SAP en la circulación debe reducirse al menos el 90% por debajo de su valor normal antes de la administración de la proteína de unión a SAP. Específicamente, esto puede conseguirse con compuestos que disminuyen la cantidad de SAP circulante y, en particular, compuestos que den como resultado la reducción de SAP circulante, definido en este documento como “compuestos reductores de SAP”. Dichos compuestos son ligandos unidos al SAP y son inhibidores competitivos de la unión del SAP a fibrillas amiloides, tales como derivados de D-prolina y derivados de piruvato de glicerol cíclico. Los derivados de D-prolina se desvelan en el documento EP 0915088, y la expresión “derivados de D-prolina” incluye profármacos, tales como los descritos en el documento WO 03/051836. Se contemplan las D-prolinas de las siguientes fórmulas:



20 en las que

Res



y el grupo

R¹ es hidrógeno o halógeno;

y

X es $-(CH_2)_n-$; $-CH(R^2)(CH_2)_n-$; $-CH_2O(CH_2)_n-$; $-CH_2NH-$; $C(R^2)=CH-$; $-CH_2CH(OH)-$; o tiazol-2,5-diil; $-O-$;

Y es -S-S-; -(CH₂)_n-; -O-; -NH-; -N(R²)-; -CH=CH-; -NHC(O)NH-; N(R²)C(O)N(R²)-; -N[CH₂C₆H₃(OCH₃)₂]-; -N(CH₂C₆H₅)-; -N(CH₂C₆H₅)C(O)N(CH₂C₆H₅)-; -N(alcoialquil)-; N(cicloalquil-metil)-; 2,6-piridilo; 2,5-furanilo; 2,5-tienilo; 1,2-ciclohexilo; 1,3-ciclohexilo; 1,4-ciclohexilo; 1,2-naftilo; 1,4-naftilo; 1,5-naftilo; 1,6-naftilo; o 1,2-fenileno, 1,3-fenileno y 1,4-fenileno, en el que los grupos fenileno están opcionalmente sustituidos por sustituyentes 1-4, seleccionados entre halógeno, alquilo inferior, alcoxi inferior, hidroxilo, carboxi, -COO-alquilo inferior, nitrilo, 5-tetrazol, (pirrolidin-1-il-2-ácido carboxílico)-2-oxo-etoxi, N-hidroxicarbamimidóil, 5-oxo[1,2,4]-oxadiazolilo, 2-oxo[1,2,3,5]oxatiadiazolilo, 5-tioxo[1,2,4]oxadiazolilo y 5-terc-butilsulfanil-[1,2,4]oxadiazolilo;

X' es

 R^2 es

n es 0-3 y en el que

alquilo o alquilo inferior es alquilo C₁₋₆; alcoxi o alcoxi inferior es alcoxi C₁₋₆; cicloalquilo es cicloalquilo C₃₋₆; halógeno es F, Cl o Br; y donde aparece la línea de puntos en la fórmula es un enlace sencillo o doble;

40 o una sal farmacéuticamente aceptable o mono o diéster de la misma.

Las D-prolinas de la fórmula I-A anterior pueden escribirse como Ligando - engarce - Ligando, en el que el resto X-Y-X' de la fórmula I-A forma el engarce. El engarce (X-Y-X') puede tener una longitud de 4 a 20 átomos de carbono lineales, que incluye de 4-15 átomos de carbono lineales, de 5-10 átomos de carbono lineales y de 6-8 átomos de carbono lineales de longitud. El engarce puede ser una cadena recta o ramificada u opcionalmente puede formar una o más estructuras en anillos, a condición de que en el engarce haya al menos 4 átomos de carbono de cadena

lineal o recta. Al menos uno de los átomos de C de cadena lineal o recta se sustituyen opcionalmente por al menos un heteroátomo seleccionado de N, O o S, ventajosamente O o S, ventajosamente O.

Por lo tanto, un “engarce opcionalmente sustituido” puede tener una o más sustituciones que conduzcan a la ramificación y/o a una o más sustituciones del átomo (o átomos) de carbono de los átomos de carbono de cadena lineal o recta del engarce, por ejemplo el engarce puede ser un éter o un éter sustituido.

El ácido (R)-1-[6-[(R)-2-Carboxi-pirrolidin-1-il]-6-oxo-hexanoil]pirrolidina-2-carboxílico (CPHPC) es una D-prolina específica contemplada por la invención. En una realización particular, el CPHPC se administra a un paciente humano.

Los derivados de piruvato de glicerol cíclico se desvelan en el documento WO 2004/099173.

- 10 La expresión “proteína de unión a antígeno” tal como se usa en el presente documento, se refiere a anticuerpos, a fragmentos de anticuerpos y a otras construcciones de proteínas, tales como dominios, que son capaces de unirse a SAP.

- 15 El término “anticuerpo”, se usa en el presente documento en su sentido más amplio para referirse a moléculas con un dominio de tipo inmunoglobulina e incluye anticuerpos monoclonales, recombinantes, policlonales, quiméricos, humanizados, biespecíficos y heteroconjugados; un dominio variable sencillo, un anticuerpo de dominio, fragmentos de unión a antígeno, fragmentos inmunológicamente eficaces, Fv monocatenario, diacuerpos, Tandabs™, etc. (para un resumen de formatos alternativos de “anticuerpos” véase Holliger y Hudson, Nature Biotechnology, 2005, Vol 23, No. 9, 1126-1136).

- 20 La frase “dominio variable sencillo” se refiere a un dominio variable de proteína de unión a antígeno (por ejemplo, VH, VHH, VL) que se une de manera específica a un antígeno o a un epítopo independientemente de una región variable o dominio diferente.

- 25 Un “anticuerpo de dominio” o “dAb” se puede considerar lo mismo que un “dominio variable sencillo” que es capaz de unirse a un antígeno. Un dominio variable sencillo puede ser un dominio variable de anticuerpo humano, pero también incluye dominios variables sencillos de anticuerpos de otras especies tales como dAb VHH de roedores (por ejemplo, tal como se desvela en el documento WO 00/29004), de tiburón nodriza y de camélido. Los VHH de camélido son polipéptidos de dominio variable sencillo de inmunoglobulina que derivan de especies que incluyen el camello, la llama, la alpaca, el dromedario y el guanaco, que producen anticuerpos de cadena pesada desprovistos de forma natural de cadenas ligeras. Tales dominios de VHH se pueden humanizar de acuerdo con las técnicas convencionales disponibles en la materia, y se considera que tales dominios son “anticuerpos de dominio”. Tal como se usa en el presente documento, los VH incluyen los dominios VHH de camélido.

- 35 Tal como se usa en el presente documento, el término “dominio” se refiere a una estructura de proteína plegada que tiene una estructura terciaria independiente del resto de la proteína. Generalmente, los dominios son responsables de las propiedades funcionales discretas de las proteínas, y en muchos casos se pueden añadir, eliminar o transferir a otras proteínas sin la pérdida de función del resto de la proteína y/o del dominio. Un “dominio variable sencillo” es un dominio de polipéptido plegado que comprende secuencias características de los dominios variables de los anticuerpos. Por lo tanto, incluye dominios variables completos de anticuerpos y dominios variables modificados, por ejemplo, en los que se han reemplazado uno o más bucles por secuencias que no son características de los dominios variables de los anticuerpos o dominios variables de los anticuerpos que se han truncado o comprenden extensiones de N-terminal o de C-terminal, así como fragmentos plegados de dominios variables que al menos conservan la actividad y la especificidad de unión del dominio de longitud completa. Un dominio se puede unir a un antígeno o a un epítopo independientemente de una región o dominio variable diferente.

- 45 Se puede proporcionar un fragmento de unión a antígeno mediante la disposición de una o más CDR en armazones de proteínas que no son anticuerpos, tales como un dominio. El dominio puede ser un anticuerpo de dominio o puede ser un dominio que es un derivado de un armazón seleccionado del grupo que consiste en CTLA-4, lipocalina, SpA, un aficuerpo, un avímero, GroEl, transferrina, GroES y fibronectina/adnectina, que se ha sometido a diseño genético de proteínas con el fin de obtener la unión a un antígeno, tal como SAP, que no sea el ligando natural.

- 50 Un fragmento de unión a antígeno o un fragmento inmunológicamente eficaz puede comprender secuencias parciales variables de cadena pesada o ligera. Los fragmentos son de al menos 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos de longitud. Como alternativa, los fragmentos son de al menos 15, al menos 20, al menos 50, al menos 75 o al menos 100 aminoácidos de longitud.

- 55 La expresión “se une específicamente”, como se usa a lo largo de la presente memoria descriptiva, en relación a proteínas de unión a antígeno, significa que la proteína de unión a antígeno se une al SAP con ninguna o insignificante unión a cualquier otra proteína, incluyendo moléculas estrechamente relacionadas tales como proteína C reactiva (CRP) que, en seres humanos, comparte el 55% de restos rigurosos por homología de secuencias de restos aminoacídicos y tienen esencialmente el mismo plegamiento de proteína.

La constante de disociación del equilibrio (KD) de la interacción proteína de unión a antígeno-SAP puede ser 1 mM o

inferior, 100 nM o inferior, 10 nM o inferior, 2 mM o inferior o 1 nM o inferior. Como alternativa, la KD puede ser entre 5 y 10 nM; o entre 1 y 2 nM. La KD puede estar entre 1 pM y 500 pM; o entre 500 pM y 1 nM.

La afinidad de unión puede medirse por BIAcore™, por ejemplo, por captura antigénica con SAP acoplado sobre una microplaca de carboximetil dextrano por acoplamiento de una amina primaria y captura de anticuerpos sobre esta superficie. Como alternativa, la afinidad de unión puede medirse por BIAcore™ por la unión de anticuerpos anti-SAP al SAP humano capturado por O-fosfoetanolamina inmovilizado sobre una microplaca CM5. Para medir la afinidad de unión, pueden usarse los procedimientos de BIAcore™ descritos en el Ejemplo 8.

La constante de velocidad de disociación (kd) puede ser $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ o inferior, $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o inferior, o $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ o inferior. La kd puede ser entre $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ y $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$; o entre $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ y $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. Una kd pequeña puede dar como resultado una disociación lenta del complejo proteína de unión a antígeno-ligando y una eliminación mejorada de los complejos del SAP unidos a amiloide.

Será evidente para los expertos en la materia que el término “derivado” pretende definir no solo la fuente en el sentido de ser el origen físico del material sino también definir el material que es estructuralmente idéntico al material pero que no se origina a partir de la fuente de referencia. Por lo tanto, no es necesario que los “restos encontrados en el anticuerpo donante” se hayan purificado del anticuerpo donante.

Por “aislado” se entiende que la molécula, tal como una proteína de unión a antígeno, se retire del medio en el que puede encontrarse en la naturaleza. Por ejemplo, la molécula puede purificarse lejos de sustancias con las que podrían existir normalmente en la naturaleza. Por ejemplo, la masa de la molécula en una muestra puede ser el 95% de la masa total.

Un “anticuerpo quimérico” se refiere a un tipo de anticuerpo modificado por ingeniería genética, que contiene una región variable de origen natural (cadenas ligera y pesada) derivada de un anticuerpo donante en asociación con regiones constantes de cadena ligera y pesada derivadas de un anticuerpo aceptor.

Un “anticuerpo humanizado” se refiere a un tipo de anticuerpo modificado por ingeniería genética que tiene sus CDR derivadas de una inmunoglobulina donante no humana, derivándose las restantes partes de la molécula, derivadas de inmunoglobulina, de una inmunoglobulina (o inmunoglobulinas) humana. Además, los restos que soportan la región marco conservada pueden modificarse para conservar la afinidad de unión (véase como por ejemplo, Queen y col. Proc. Natl Acad Sci USA, 86:10029-10032 (1989), Hodgson y col. Bio/Technology, 9:421 (1991)). Un anticuerpo aceptor humano adecuado puede ser uno seleccionado de una base de datos convencional, por ejemplo, la base de datos de KABAT®, la base de datos de Los Álamos, y la base de datos de Swiss Protein, por homología con respecto a los nucleótidos y secuencias de aminoácidos del anticuerpo donante. Un anticuerpo humano caracterizado por una homología con respecto a las regiones marco conservadas del anticuerpo donante (en una base de aminoácidos) puede ser adecuado para proporcionar una región constante de cadena pesada y/o una región marco conservada variable de cadena pesada para la inserción de las CDR donantes. De manera similar, puede seleccionarse un anticuerpo aceptor adecuado que pueda donar regiones marco conservadas constantes o variables de cadena ligera. Debería observarse que las cadenas pesada y ligera del anticuerpo aceptor no se originan necesariamente a partir del mismo anticuerpo aceptor. La técnica anterior describe varias formas de producir dichos anticuerpos humanizados- véanse, por ejemplo, los documentos EP-A-0239400 y EP-A-054951.

La expresión “anticuerpo donante” se refiere a un anticuerpo que aporta las secuencias de aminoácidos de sus regiones variables, las CDR, u otros fragmentos funcionales o sus análogos a un primer compañero de inmunoglobulina. Por lo tanto el donante proporciona la región codificante de inmunoglobulina modificada y el anticuerpo modificado expresado resultante con la especificidad antigénica y actividad neutralizante características del anticuerpo donante.

La expresión “anticuerpo aceptor” se refiere a un anticuerpo que es heterólogo con respecto al anticuerpo donante, que aporta todas (o alguna parte) las secuencias de aminoácidos que codifican sus regiones marco conservadas de cadena ligera y/o pesada y/o sus regiones constantes de cadena pesada y/o ligera con respecto al primer compañero de inmunoglobulina. El anticuerpo aceptor puede ser un anticuerpo humano.

La expresión “anticuerpo humano” se refiere a un cuerpo derivado de secuencias génicas de inmunoglobulina humana. Estos anticuerpos completamente humanos proporcionan una alternativa para volver a modificar por ingeniería genética, o des-inmunizar, anticuerpos monoclonales de roedores (por ejemplo anticuerpos humanizados) como una fuente de anticuerpos terapéuticos de baja inmunogenicidad y estos se generan normalmente usando plataformas de presentación de fagos o de ratones transgénicos. En una realización, un anticuerpo de la invención es un anticuerpo humano.

Los términos “VH” y “VL”, como se usan en el presente documento, se refieren a la región variable de cadena pesada y a la región variable de cadena ligera, respectivamente, de una proteína de unión a antígeno.

Las “CDR” se definen como las secuencias de aminoácidos de la región determinante de la complementariedad de una proteína de unión a antígeno. Estas son las regiones hipervariables de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina. Existen tres CDR de cadena pesada y tres de cadena ligera (o regiones CDR) en la parte variable

de una inmunoglobulina. Por lo tanto, las "CDR", como se usa en el presente documento, se refiere a las tres CDR de cadena pesada, a las tres CDR de cadena ligera, a todas las CDR de cadena pesada y ligera o al menos dos CDR.

- 5 A lo largo de esta memoria descriptiva, los restos aminoacídicos de las secuencias de dominio variable y de las secuencias de anticuerpos de longitud completa se numeran de acuerdo con la convención de la numeración de Kabat. De manera similar, los términos, "CDR", "CDRL1", "CDRL2", "CDRL3", "CDRH1", "CDRH2", "CDRH3" usados en los Ejemplos siguen la convención de la numeración de Kabat. Para información adicional, véase Kabat y col, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4ª Ed., U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987).
- 10 Sin embargo, aunque los presentes inventores usan la convención de la numeración de Kabat para los restos aminoacídicos en las secuencias de dominio variable y en las secuencias de anticuerpos de longitud completa a lo largo de esta memoria descriptiva, será evidente para los expertos en la materia que existen convenciones de numeración alternativas para los restos aminoacídicos en las secuencias de dominio variable y en las secuencias de anticuerpos de longitud completa. También existen convenciones de numeración alternativas para las secuencias de
- 15 la CDR, por ejemplo las expuestas en Chothia y col (1989) Nature 342: 877-883. La estructura y plegamiento de las proteínas del anticuerpo puede significar que otros restos se consideran parte de la secuencia de la CDR y podría entenderse como tal por un experto en la materia.

- Otras convenciones de numeración para secuencias de la CDR, disponibles para un experto, incluyen procedimientos "AbM;" (University of Bath) y "contact" (University College London). La región solapante mínima
- 20 usando al menos dos de los procedimientos Kabat, Chothia, AbM y contact puede determinarse para proporcionar la "unidad de unión mínima". La unidad mínima puede ser una sub-parte de una CDR.

- La siguiente tabla 1 representa una definición usando cada convención de numeración para cada CDR o unidad de unión. En la Tabla 1 se usa el esquema de numeración de Rabat, para numerar la secuencia de aminoácidos del dominio variable. Debe observarse que algunas de las definiciones de la CDR pueden variar dependiendo de la
- 25 publicación individual usada.

Tabla 1

	CDR de Kabat	CDR de Chothia	CDR de AbM	CDR de Contact	Unidad de unión mínima
H1	31-35/35A/35B	26-32/33/34	26-35/35A/35B	30-35/35A/35B	31-32
H2	50-65	52-56	50-58	47-58	52-56
H3	95-102	95-102	95-102	93-101	95-101
L1	24-34	24-34	24-34	30-36	30-34
L2	50-56	50-56	50-56	46-55	50-55
L3	89-97	89-97	89-97	89-96	89-96

- Como se usa este documento, la expresión "sitio de unión a antígeno", se refiere a un sitio, en una proteína de unión a antígeno, que puede unirse específicamente a un antígeno. Este puede ser un dominio sencillo (por ejemplo, un dominio de unión epitópico), o dominios Fv monocatenarios (ScFv) o pueden ser dominios emparejados de VH/VL como puede encontrarse en un anticuerpo convencional.
- 30

- El término "epítipo", como se usa en este documento, se refiere a una parte del antígeno que se pone en contacto con un dominio de unión particular de la proteína de unión a antígeno. Un epítipo puede ser lineal, comprendiendo una secuencia de aminoácidos del antígeno esencialmente lineal. Como alternativa, un epítipo puede ser conformacional o discontinuo. Por ejemplo, un epítipo conformacional comprende restos aminoacídicos que requieren un elemento de limitación estructural. En el caso de un epítipo conformacional, aunque los restos pueden ser de diferentes regiones de la cadena peptídica, pueden estar en estrecha proximidad en la estructura tridimensional del antígeno. En el caso de antígenos multiméricos, tales como SAP, un epítipo conformacional puede incluir restos de diferentes cadenas peptídicas que pueden estar en estrecha proximidad en la estructura tridimensional del antígeno. Dichos restos estructuralmente colindantes pueden terminarse por medio de programas informáticos de modelación o a través de estructuras tridimensionales obtenidas por medio de procedimientos conocidos en la técnica, tales como cristalografía de rayos X.
- 35
- 40

- Un epítipo discontinuo comprende restos aminoacídicos que están separados por otras secuencias, es decir no en una secuencia continua en la secuencia primaria del antígeno. En el contexto de la estructura terciaria y cuaternaria del antígeno, los restos de un epítipo discontinuo están lo suficientemente cerca entre sí que para unirse por una
- 45

proteína de unión a antígeno.

En una realización, una proteína de unión a antígeno tal como se describe en el presente documento de la invención se une a un epítipo dentro de los restos 140-158 del SAP humano.

Para las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos, la expresión "idéntico" o "identidad de secuencia" indica el grado de identidad entre dos secuencias de ácido nucleico o dos secuencias de aminoácidos cuando se alinean óptimamente y se comparan con inserciones o deleciones apropiadas.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de identidad = número de posiciones idénticas/número total de posiciones multiplicado por 100), teniendo en cuenta el número de huecos, y la longitud de cada hueco, que se necesita introducir para el alineamiento óptimo de las dos secuencias. La comparación de secuencias y determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias puede lograrse usando un algoritmo matemático, como se describe a continuación.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos puede determinarse usando el programa GAP del paquete informático GCG, usando una matriz NWSgapdna.CMP y un peso de hueco de 40, 50, 60, 70 u 80 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5, o 6. El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos o de aminoácidos también puede determinarse usando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (Comput. Appl. Biosci., 4:11-17 (1988)) que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0) usando una tabla de peso de restos PAM120, una penalización de longitud de hueco de 12 y una penalización de hueco de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse usando el algoritmo de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. 48:444-453 (1970)) que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete informático GCG, usando una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250, y un peso de hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6, o 4, y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

Como ejemplo, una secuencia de polinucleótidos puede ser idéntica a una secuencia de polinucleótidos de referencia como se describe en el presente documento (véanse, por ejemplo, las SEC ID NO: 8, 10, 18, 20, 45-48, 51-61, 63, 65-73), que tiene una identidad del 100% o puede incluir hasta un determinado número entero de modificaciones de nucleótidos en comparación con la secuencia de referencia, tal como al menos 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o un 99% de identidad. Dichas modificaciones se seleccionan de al menos una deleción, sustitución de nucleótidos, incluyendo transición y transversión, o inserción, y en el que dichas modificaciones pueden producirse en las posiciones 5' o 3' terminales de la secuencia de nucleótidos de referencia o en cualquier sitio entre aquellas posiciones terminales, intercaladas individualmente entre los nucleótidos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. El número de modificaciones de nucleótidos se determina multiplicando el número total de nucleótidos en la secuencia polinucleotídica de referencia, como se describe en el presente documento (véanse, por ejemplo, las SEC ID NO: 8, 10, 18, 20, 45-48, 51-61, 63, 65-73), por el porcentaje numérico de la identidad porcentaje respectiva (dividido entre 100) y restando este producto de dicho número de nucleótidos totales en la secuencia polinucleotídica de referencia como se describe en el presente documento (véanse, por ejemplo, las SEQ ID NO: 8, 10, 18, 20, 45-48, 51-61, 63, 65-73), o:

$$n_n \leq x_n - (x_n \bullet y),$$

en la que n_n es el número de modificaciones nucleotídicas, x_n es el número total de nucleótidos en la secuencia polinucleotídica de referencia, como se describe en el presente documento (véanse, por ejemplo, las SEQ ID NO: 8, 10, 18, 20, 45-48, 51-61, 63, 65-73), e y es 0,50 para el 50%, 0,60 para el 60%, 0,70 para el 70%, 0,75 para el 75%, 0,80 para el 80%, 0,85 para el 85%, 0,90 para el 90%, 0,95 para el 95%, 0,99 para el 99% o 1,00 para el 100%, $\bullet$ es el símbolo para el operador de multiplicación y en el que cualquier producto no entero de x_n e y se redondea a la baja hacia el número entero más cercano antes de restarlo de x_n .

De manera similar, una secuencia polipeptídica puede ser idéntica a una secuencia de referencia polipeptídica como se describe en el presente documento (véanse, por ejemplo, las SEQ ID NO: 1-7, 9, 11-17, 19, 21-24, 27-31, 34-42, 62, 64, 74), que tiene una identidad del 100%, o puede incluir hasta un determinado número entero de modificaciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de referencia de manera que el % de identidad sea menor del 100%, tal como al menos 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o 99% de identidad. Dichas modificaciones se seleccionan del grupo que consiste en al menos una deleción, sustitución de aminoácidos, incluyendo sustitución o inserción conservativa y no conservativa y en el que dichas modificaciones pueden producirse en las posiciones amino- o carboxilo- terminal de la secuencia polipeptídica de referencia o en cualquier sitio entre estas posiciones terminales, intercaladas individualmente entre los aminoácidos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. El número de modificaciones de aminoácidos para un % de identidad proporcionado, se determina multiplicando el número total de aminoácidos en la secuencia polipeptídica codificada por la secuencia de referencia polipeptídica, como se describe en el presente documento (véanse, por ejemplo, las SEQ ID NO: 1-7, 9, 11-17, 19, 21-24, 27-31, 34-42, 62, 64, 74) por el porcentaje numérico de la identidad porcentaje respectiva (dividido entre 100) y después restando este producto de dicho número total de aminoácidos en la secuencia polipeptídica de referencia como se describe en el presente documento (véanse, por ejemplo, las SEQ ID NO: 1-7, 9, 11-17, 19, 21-24, 27-31, 34-42, 62, 64, 74), o:

$$n_a \leq x_a - (x_a \bullet y),$$

en la que n_a es el número de modificaciones de aminoácidos, x_a es el número total de aminoácidos en la secuencia polipeptídica de referencia, como se describe en el presente documento (véanse, por ejemplo, las SEQ ID NO: 1-7, 9, 11-17, 19, 21-24, 27-31, 34-42, 62, 64, 74), e y es 0,50 para el 50%, 0,60 para el 60%, 0,70 para el 70%, 0,75 para el 75%, 0,80 para el 80%, 0,85 para el 85%, 0,90 para el 90%, 0,95 para el 95%, 0,99 para el 99% o 1,00 para el 100%, $\bullet$ es el símbolo para el operador de multiplicación y en el que cualquier producto no entero de x_a e y se redondea a la baja hacia el número entero más cercano antes de restarlo de x_a .

El % de identidad puede determinarse a través de la longitud de la secuencia.

Los términos “péptido”, “polipéptido” y “proteína” se refieren cada uno a una molécula que comprende dos o más restos aminoacídicos. Un péptido puede ser monomérico o polimérico.

En la técnica se reconoce bien que determinadas sustituciones de aminoácidos se considera que son “conservativas”. Los aminoácidos se dividen en grupos basándose en propiedades de cadena lateral comunes y se considera que las sustituciones dentro de grupos que mantienen toda o sustancialmente toda la afinidad de unión de la proteína de unión a antígeno son sustituciones conservativas, véase la siguiente Tabla 2:

Tabla 2

Cadena lateral	Miembros
Hidrófobos	Met, Ala, Val, Leu, Ile
Hidrófilos neutros	Cys, Ser, Thr
Ácidos	Asp, Glu
Básicos	Asn, Gln, His, Lys, Arg
Restos que influyen en la orientación de la cadena	Gly, Pro
Aromáticos	Trp, Tyr, Phe

La proteína de unión a antígeno puede competir por la unión a SAP con un anticuerpo de referencia que comprende una secuencia de región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 7 y una secuencia de región variable de cadena ligera de la secuencia de la SEQ ID NO: 9. Como alternativa, la proteína de unión a antígeno puede competir por la unión a SAP con un anticuerpo de referencia que comprende una secuencia de región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 17 y una secuencia de región variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 19.

La competición entre la proteína de unión a antígeno y el anticuerpo de referencia puede terminarse por ELISA, FMAT o BIAcore de competencia. Una proteína de unión a antígeno competente puede unirse al mismo epítipo, a un epítipo solapante o a un epítipo muy cercano al epítipo al cual se une el anticuerpo de referencia.

La presente invención también proporciona una proteína de unión a antígeno que se une de manera específica a SAP y comprende la CDRH3 de la SEQ ID NO:3 o una variante de CDR de la misma. La proteína de unión a antígeno puede comprender adicionalmente una o más CDR, o todas las CDR, en cualquier combinación, seleccionada de: CDRH1 (SEQ ID NO:1), CDRH2 (SEQ ID NO:2), CDRL1 (SEQ ID NO:4), CDRL2 (SEQ ID NO:5) y CDRL3 (SEQ ID NO:6); o una variante de las mismas.

Por ejemplo, la proteína de unión a antígeno puede comprender CDRH3 (SEQ ID NO:3) y CDRH1 (SEQ ID NO:1), o variantes de las mismas. La proteína de unión a antígeno puede comprender CDRH3 (SEQ ID NO:3) y CDRH2 (SEQ ID NO:2) o variantes de las mismas. La proteína de unión a antígeno puede comprender CDRH1 (SEQ ID NO:1) y CDRH2 (SEQ ID NO:2) y CDRH3 (SEQ ID NO:3), o variantes de las mismas.

La proteína de unión a antígeno puede comprender CDRL1 (SEQ ID NO:4) y CDRL2 (SEQ ID NO:5) o variantes de las mismas. La proteína de unión a antígeno puede comprender CDRL2 (SEQ ID NO:5) y CDRL3 (SEQ ID NO:6) o variantes de las mismas. La proteína de unión a antígeno puede comprender CDRL1 (SEQ ID NO:4), CDRL2 (SEQ ID NO:5) y CDRL3 (SEQ ID NO:6) o variantes de las mismas.

La proteína de unión a antígeno puede comprender CDRH3 (SEQ ID NO:3) y CDRL3 (SEQ ID NO:6) o variantes de las mismas. La proteína de unión a antígeno puede comprender CDRH3 (SEQ ID NO:3), CDRH2 (SEQ ID NO:2) y CDRL3 (SEQ ID NO:6) o variantes de las mismas. La proteína de unión a antígeno puede comprender CDRH3 (SEQ ID NO:3), CDRH2 (SEQ ID NO:2), CDRL2 (SEQ ID NO:5) y CDRL3 (SEQ ID NO:6) o variantes de las mismas.

La proteína de unión a antígeno puede comprender CDRH1 (SEQ ID NO:1), CDRH2 (SEQ ID NO:2), CDRH3 (SEQ ID NO:3), CDRL1 (SEQ NO:4), CDRL2 (SEQ ID NO:5) y CDRL3 (SEQ ID NO:6), o variantes de las mismas.

La presente memoria descriptiva describe una proteína de unión a antígeno que se une de manera específica a SAP y comprende la CDRH3 de la SEQ ID NO:13 o una variante de CDR de la misma. La proteína de unión a antígeno puede comprender adicionalmente una o más CDR, o todas las CDR, en cualquier combinación, seleccionadas de: CDRH1 (SEQ ID NO:11), CDRH2 (SEQ ID NO:12), CDRL1 (SEQ ID NO:14), CDRL2 (SEQ ID NO:15) y CDRL3 (SEQ ID NO:16) o una variante de las mismas.

La presente memoria descriptiva describe una proteína de unión a antígeno que se une específicamente a SAP, en la que la proteína de unión a antígeno es un anticuerpo quimérico o humanizado que comprende la correspondiente CDRH3 de la secuencia del dominio variable de la SEQ ID NO:7, o una variante de CDRH3.

La proteína de unión a antígeno quimérica o humanizada puede comprender adicionalmente uno o más, o todas las correspondientes CDR seleccionadas de la secuencia del dominio variable de la SEQ ID NO:7 o la SEQ ID NO:9 o una variante de CDR de las mismas.

Por ejemplo, la proteína de unión a antígeno puede comprender la correspondiente CDRH3 y la correspondiente CDRH1, o variantes de las mismas. Las proteínas de unión a antígeno pueden comprender la correspondiente CDRH3 y la correspondiente CDRH2 o variantes de las mismas. La proteína de unión a antígeno puede comprender la correspondiente CDRH1, la correspondiente CDRH2 y la correspondiente CDRH3; o variantes de las mismas.

La proteína de unión a antígeno puede comprender la correspondiente CDRL1 y la correspondiente CDRL2 o variantes de las mismas. La proteína de unión a antígeno puede comprender la correspondiente CDRL2 y la correspondiente CDRL3 o variantes de las mismas. La proteína de unión a antígeno puede comprender la correspondiente CDRL1, la correspondiente CDRL2 y la correspondiente CDRL3 o variantes de las mismas.

La proteína de unión a antígeno puede comprender la correspondiente CDRH3 y la correspondiente CDRL3, o variantes de las mismas. La proteína de unión a antígeno puede comprender la correspondiente CDRH3, la correspondiente CDRH2 y la correspondiente CDRL3, o variantes de las mismas. La proteína de unión a antígeno puede comprender la correspondiente CDRH3, la correspondiente CDRH2, la correspondiente CDRL2 y la correspondiente CDRL3 o variantes de las mismas.

La proteína de unión a antígeno puede comprender la correspondiente CDRH1, la correspondiente CDRH2, la correspondiente CDRH3, la correspondiente CDRL1, la correspondiente CDRL2 y la correspondiente CDRL3 o variantes de las mismas.

Las CDR correspondientes pueden definirse por referencia a los procedimientos de Kabat (1987), Chothia (1989), AbM o contact, o una combinación de estos procedimientos. Una definición de cada uno de los procedimientos puede encontrarse en la Tabla 1 y puede aplicarse al dominio variable de cadena pesada de referencia de la SEQ ID NO: 7 y al dominio variable de cadena ligera de referencia de la SEQ ID NO: 9 para determinar la CDR correspondiente.

La presente memoria descriptiva describe una proteína de unión a antígeno que se une específicamente a SAP, en la que la proteína de unión a antígeno es un anticuerpo quimérico o humanizado que comprende la correspondiente CDRH3 de la secuencia del dominio variable de la SEQ ID NO:17 o una variante de CDRH3.

La proteína de unión a antígeno quimérica o humanizada puede comprender adicionalmente uno o más, o todas las CDR correspondientes seleccionadas de la secuencia del dominio variable de la SEQ ID NO:17 o la SEQ ID NO:19, o una variante de CDR de la misma.

La presente memoria descriptiva describe una proteína de unión a antígeno que se une de manera específica a SAP y que comprende una unidad de unión H3 que comprende los restos de Kabat 95-101 de la SEQ ID NO:7, o una variante de H3. La proteína de unión a antígeno puede comprender adicionalmente una o más o todas las unidades de unión seleccionadas de: H1 que comprende los restos de Kabat 31-32 de la SEQ ID NO:7, H2 que comprende los restos de Kabat 52-56 de la SEQ ID NO:7, L1 que comprende los restos de Kabat 30-34 de la SEQ ID NO:9, L2 que comprende los restos de Kabat 50-55 de la SEQ ID NO:9 y L3 que comprende los restos de Kabat 89-96 de la SEQ ID NO:9 o una variante de la unidad de unión.

Por ejemplo, la proteína de unión a antígeno puede comprender una unidad de unión H3 y una unidad de unión H1, o variantes de las mismas. La proteína de unión a antígeno puede comprender una unidad de unión H3 y una unidad de unión H2 o variantes de las mismas. La proteína de unión a antígeno puede comprender una unidad de unión H1, una unidad de unión H2 y una unidad de unión H3; o variantes de la misma.

La proteína de unión a antígeno puede comprender una unidad de unión L1 y una unidad de unión L2 o variantes de las mismas. La proteína de unión a antígeno puede comprender una unidad de unión L2 y una unidad de unión L3 o variantes de las mismas. La proteína de unión a antígeno puede comprender una unidad de unión L1, una unidad de unión L2 y una unidad de unión L3; o variantes de las mismas.

La proteína de unión a antígeno puede comprender una unidad de unión H3 y una unidad de unión L3 o variantes de la misma. La proteína de unión a antígeno puede comprender una unidad de unión H3, una unidad de unión H2 y una unidad de unión L3; o variantes de las mismas. La proteína de unión a antígeno puede comprender una unidad de unión H3, una unidad de unión H2, una unidad de unión L2 y una unidad de unión L3; o variantes de las mismas.

- 5 La proteína de unión a antígeno puede comprender una unidad de unión H1, una unidad de unión H2, una unidad de unión H3, una unidad de unión L1, una unidad de unión L2, y una unidad de unión L3; o variantes de las mismas.

La presente memoria descriptiva describe una proteína de unión a antígeno que se une de manera específica a SAP, y comprende una unidad de unión H3 que comprende los restos de Kabat 95-101 de la SEQ ID NO:17, o una variante de H3. La proteína de unión a antígeno puede comprender adicionalmente una o más o todas las unidades de unión seleccionadas de :H1 que comprende los restos de Kabat 31-32 de la SEQ ID NO:17, H2 que comprende los restos de Kabat 52-56 de la SEQ ID NO:17, L1 que comprende los restos de Kabat 30-34 de la SEQ ID NO:19, L2 que comprende los restos de Kabat 50-55 de la SEQ ID NO:19 y L3 que comprende los restos de Kabat 89-96 de la SEQ ID NO:19; o una variante de la unidad de unión.

- 10

Una variante de CDR o variante de unidad de unión incluye una secuencia de aminoácidos modificada en al menos un aminoácido, en la que dicha modificación puede ser química o una alteración parcial en la secuencia de aminoácidos (por ejemplo en no más de 10 aminoácidos), cuya modificación permite que la variante conserve las características biológicas de la secuencia no modificada. Por ejemplo, la variante es una variante funcional que se une de manera específica a SAP y activa la eliminación de los complejos de SAP unidos al amiloide de los tejidos. Una alteración parcial de la secuencia de aminoácidos de la CDR puede ser mediante delección o sustitución de uno a varios aminoácidos, o mediante adición o inserción de uno a varios aminoácidos, o mediante una combinación de las mismas (por ejemplo, en no más de 10 aminoácidos). La variante de CDR o la variante de la unidad de unión puede contener 1, 2, 3, 4, 5 o 6 sustituciones, adiciones o delecciones de aminoácidos, en cualquier combinación, en la secuencia de aminoácidos. Las sustituciones en los restos de aminoácidos pueden ser sustituciones conservativas, por ejemplo, la sustitución de un aminoácido hidrófobo por un aminoácido hidrófobo alternativo. Por ejemplo, se puede sustituir leucina con valina o isoleucina.

- 15
20
25

Una o más de las CDR, de las correspondientes CDR, de las variantes de CDR o de las unidades de unión descritas en el presente documento pueden estar presentes en el contexto de una región marco humana, por ejemplo, como un dominio variable humanizado o quimérico. Los anticuerpos humanos completos que comprenden una o más de las CDR, de las correspondientes CDR, de las variantes de CDR o de las unidades de unión descritas en el presente documento también se contemplan y están dentro del ámbito de la invención.

- 30

Las CDR L1, L2, L3 H1 y H2 tienden a presentar estructuralmente una de un número finito de conformaciones de la cadena principal. La clase de estructura canónica particular de una CDR se define tanto por la longitud de la CDR como por el empaquetamiento del bucle, determinada por los restos ubicados en las posiciones clave tanto en las CDR como en las regiones marco (restos de determinación estructural o SDR). Martin y Thornton (1996; J Mol Biol 263:800-815) han generado un procedimiento automático para definir los moldes canónicos del "resto clave". El análisis de los grupos se usa para definir las clases canónicas para conjuntos de CDR, y después se identifican los moldes canónicos analizando los restos hidrófobos internos, los de unión a hidrógeno y las glicinas y prolina conservadas. Las CDR de secuencias del anticuerpo se pueden asignar a las clases canónicas mediante la comparación de las secuencias con los moldes de los restos clave y puntuando cada molde usando matrices de identidad o de similitud.

- 35
40

A continuación se dan ejemplos de las CDR canónicas dentro del ámbito de la invención. La numeración de aminoácidos usada es la de Kabat.

Los ejemplos de los canónicos para CDRH1 tal como se establece en la SEQ ID NO:1, una variante de la misma, la CDRH1 de la SEQ ID NO:7 o una CDR correspondiente son: Tyr 32 sustituye a Ile, His, Phe, Thr, Asn, Cys, Glu o Asp; Asn 33 sustituye a Tyr, Ala, Trp, Gly, Thr, Leu o Val; Met 34 sustituye a Ile, Val o Trp; y/o His 35 sustituye a Glu, Asn, Gln, Ser, Tyr o Thr.

- 45

Los ejemplos de los canónicos para CDRH2 tal como se establece en la SEQ ID NO:2, una variante de la misma, la CDRH2 de la SEQ ID NO:7 o una CDR correspondiente son: Tyr 50 sustituye a Arg, Glu, Trp, Gly, Gln, Val, Leu, Asn, Lys o Ala; Ile51 sustituye a Leu, Val, Thr, Ser o Asn; Tyr 52 sustituye a Asp, Leu, Asn o Ser; Gly 53 sustituye a Ala, Tyr, Ser, Lys, Thr o Asn; Asp 54 sustituye a Asn, Ser, Thr, Lys o Gly; Asn 56 sustituye a Tyr, Arg, Glu, Asp, Gly, Val, Ser o Ala; y/o Asn 58 sustituye a Lys, Thr, Ser, Asp, Arg, Gly, Phe o Tyr.

- 50

Los ejemplos de canónicos para CDH3 tal como se establece en la SEQ ID NO:3, una variante de la misma, la CDRH3 de la SEQ ID NO:7 o una CDR correspondiente son: Ser 102 sustituye a Tyr, His, Val, Ile, Asp o Gly.

Los ejemplos de canónicos para CDRL1 tal como se establece en la SEQ ID NO:4, una variante de la misma, la CDRL1 de la SEQ ID NO:9 o una CDR correspondiente son: Asn 28 sustituye a Ser, Asp, Thr o Glu; Ile 29 sustituye a Val; Tyr 30 sustituye a Asp, Leu, Val, Ile, Ser, Asn, Phe, His, Gly o Thr; Ser 31 sustituye a Asn, Thr, Lys o Gly; Tyr 32 sustituye a Phe, Asn, Ala, His, Ser o Arg; Leu 33 sustituye a Met, Val, Ile o Phe; y/o Ala 34 sustituye a Asn, Ser, His, Val o Phe.

- 55

Los ejemplos de canónicos para CDRL2 tal como se establece en la SEQ ID NO:5, una variante de la misma, la CDRL1 de la SEQ ID NO:9 o una CDR correspondiente son: Ala 51 sustituye a Thr, Gly o Val.

Los ejemplos de canónicos para CDRL3 tal como se establece en la SEQ ID NO:6, una variante de la misma, la CDRL1 de la SEQ ID NO:9 o una CDR correspondiente son: Gln 89 sustituye a Ser, Gly, Phe o Leu; His 90 sustituye a Gln o Asn; His 91 sustituye a Asn, Phe, Gly, Ser, Arg, Asp, Thr, Tyr o Val; Tyr 92 sustituye a Asn, Trp, Thr, Ser, Arg, Gln, His, Ala o Asp; Gly 93 sustituye a Glu, Asn, His, Thr, Ser, Arg o Ala; Ala 94 sustituye a Asp, Tyr, Thr, Val, Leu, His, Asn, Ile, Trp, Pro o Ser; y/or Leu 96 sustituye a Pro, Tyr, Arg, Ile, Trp o Phe.

Los ejemplos de canónicos para CDRH1 tal como se establece en la SEQ ID NO:11, una variante de la misma, la CDRH1 de la SEQ ID NO:17 o una CDR correspondiente son: Tyr 32 sustituye a Ile, His, Phe, Thr, Asn, Cys, Glu o Asp; Trp 33 sustituye a Tyr, Ala, Gly, Thr, Leu o Val; Met 34 sustituye a Ile, Val o Trp; y/o His 35 sustituye a Glu, Asn, Gln, Ser, Tyr o Thr.

Los ejemplos de canónicos para CDRH2 tal como se establece en la SEQ ID NO:12, una variante de la misma, la CDRH1 de la SEQ ID NO:17 o una CDR correspondiente son: Met 50 sustituye a Arg, Glu, Trp, Tyr, Gly, Gln, Val, Leu, Asn, Lys o Ala; Ile51 sustituye a Leu, Val, Thr, Ser o Asn; His 52 sustituye a Asp, Leu, Asn, Ser o Tyr; Asn 53 sustituye a Ala, Gly, Tyr, Ser, Lys o Thr; Ser 54 sustituye a Asn, Thr, Lys, Asp o Gly; Asn 56 sustituye a Tyr, Arg, Glu, Asp, Gly, Val, Ser o Ala; y/o Asn 58 sustituye a Lys, Thr, Ser, Asp, Arg, Gly, Phe o Tyr.

Los ejemplos de canónicos para CDRH3 tal como se establece en la SEQ ID NO:13, una variante de la misma, la CDRH1 de la SEQ ID NO:17 o una CDR correspondiente son: Val 102 sustituye a Tyr, His, Ile, Ser, Asp o Gly.

Los ejemplos de canónicos para CDRL1 tal como se establece en la SEQ ID NO:14, una variante de la misma, la CDRL1 de la SEQ ID NO:19 o una CDR correspondiente son: Asn 28 sustituye a Ser, Asp, Thr o Glu; Val 29 sustituye a Ile; Asn 30 sustituye a Asp, Leu, Tyr, Val, Ile, Ser, Phe, His, Gly o Thr; Ser 31 sustituye a Asn, Thr, Lys o Gly; Asn 32 sustituye a Phe, Tyr, Ala, His, Ser o Arg; Val 33 sustituye a Met, Leu, Ile o Phe; Ala 34 sustituye a Gly, Asn, Ser, His, Val o Phe.

Los ejemplos de canónicos para CDRL2 tal como se establece en la SEQ ID NO:15, una variante de la misma, la CDRL1 de la SEQ ID NO:19 o una CDR correspondiente son: Ala 51 sustituye a Thr, Gly o Val.

Los ejemplos de canónicos para CDRL3 tal como se establece en la SEQ ID NO:16, una variante de la misma, la CDRL1 de la SEQ ID NO:19 o una CDR correspondiente son: Gln 89 sustituye a Ser, Gly, Phe o Leu; Gln 90 sustituye a Asn o His; Cys 91 sustituye a Asn, Phe, Gly, Ser, Arg, Asp, His, Thr, Tyr o Val; Asn 92 sustituye a Tyr, Trp, Thr, Ser, Arg, Gln, His, Ala o Asp; Asn 93 sustituye a Glu, Gly, His, Thr, Ser, Arg o Ala; Tyr 94 sustituye a Asp, Thr, Val, Leu, His, Asn, Ile, Trp, Pro o Ser; y/o Phe 96 sustituye a Pro, Leu, Tyr, Arg, Ile o Trp.

Puede haber múltiples posiciones canónicas de la variante de CDR por CDR, por CDR correspondiente, por unidad de unión, por región variable de cadena pesada o ligera, por cadena pesada o ligera y por proteína de unión a antígeno y, por lo tanto, cualquier combinación de sustitución puede estar presente en la proteína de unión a antígeno de la invención, siempre que la estructura canónica de la CDR se mantenga de forma que la proteína de unión a antígeno sea capaz de unirse de manera específica a SAP.

Tal como se trata anteriormente, la clase de estructura canónica particular de una CDR se define tanto por la longitud de la CDR como por el empaquetamiento del bucle, determinado por los restos localizados en posiciones clave tanto en las regiones de CDR como en las regiones marco.

Por lo tanto, además de las CDR enumeradas en las SEQ ID NO: 1-6 o 11-16, las CDR de la SEQ ID NO:7, 9, 17 o 19, las CDR correspondientes, las unidades de unión, o variantes de las mismas, los restos de regiones marco canónicos de una proteína de unión a antígeno de la invención pueden incluir (usando la numeración de Kabat):

Cadena pesada: Val, Ile o Gly en la posición 2; Leu o Val en la posición 4; Leu, Ile, Met o Val en la posición 20; Cys en la posición 22; Thr, Ala, Val, Gly o Ser en la posición 24; Gly en la posición 26; Ile, Phe, Leu o Ser en la posición 29; Trp en la posición 36; Trp o Tyr en la posición 47; Ile, Met, Val o Leu en la posición 48; Ile, Leu, Phe, Met o Val en la posición 69; Val, Ala o Leu en la posición 71; Ala, Leu, Val, Tyr o Phe en la posición 78; Leu o Met en la posición 80; Tyr o Phe en la posición 90; Cys en la posición 92; y/o Arg, Lys, Gly, Ser, His o Asn en la posición 94.

Cadena ligera: Ile, Leu o Val en la posición 2; Val, Gln, Leu o Glu en la posición 3; Met o Leu en la posición 4; Cys en la posición 23; Trp en la posición 35; Tyr, Leu o Phe en la posición 36; Leu, Arg o Val en la posición 46; Tyr, His, Phe o Lys en la posición 49; Tyr o Phe en la posición 71; Cys en la posición 88; y/o Phe en la posición 98.

En una realización particular, la región marco de la cadena pesada comprende los siguientes restos: Val en la posición 2, Leu en la posición 4, Val en la posición 20, Cys en la posición 22, Ala en la posición 24, Gly en la posición 26, Phe en la posición 29, Trp en la posición 36, Trp en la posición 47, Met en la posición 48, Ile en la posición 69, Ala en la posición 71, Ala en la posición 78, Met en la posición 80, Tyr en la posición 90, Cys en la

posición 92, y Arg en la posición 94; y la región marco de la cadena ligera comprende los siguientes restos: Ile en la posición 2, Gln en la posición 3, Met en la posición 4, Cys en la posición 23, Trp en la posición 35, Tyr en la posición 36, Leu en la posición 46, His en la posición 49, Phe en la posición 71, Cys en la posición 88 y Phe en la posición 98.

- 5 Una cualquiera, cualquier combinación o todas las posiciones de la región marco descritas anteriormente pueden estar presentes en la proteína de unión a antígeno tal y como se describe en el presente documento. Puede haber múltiples variantes de las posiciones canónicas de la región marco por región variable de cadena pesada o ligera, por cadena pesada o ligera, y por proteína de unión a antígeno y, por lo tanto, puede estar presente cualquier combinación en la proteína de unión a antígeno de la invención, siempre que la estructura canónica de la región marco se mantenga.

- 10 El dominio variable de la cadena pesada humanizada puede comprender las CDR enumeradas en la SEQ ID NO:1-3; las variantes de CDR, las correspondientes CDR en la SEQ ID NO:7; las unidades de unión, dentro de una región marco de anticuerpo aceptor que tiene el 75 % o más, el 80 % o más, el 85 % o más, el 90 % o más, el 95 % o más, el 98 % o más, el 99 % o más o el 100 % de identidad en las regiones marco con la secuencia del dominio variable del aceptor humano en la SEQ ID NO:25. El dominio variable de la cadena ligera humanizada puede comprender las CDR enumeradas en las SEQ ID NO:4-6; las variantes de CDR; las correspondientes CDR en la SEQ ID NO:9; las unidades de unión; o variantes de las mismas, en una región marco de anticuerpo aceptor que tiene el 75 % o más, el 80 % o más, el 85 % o más, el 90 % o más, el 95 % o más, el 98 % o más, el 99 % o más o el 100 % de identidad en las regiones marco con la secuencia de dominio variable aceptor humano en la SEQ ID NO:32.

- 20 El dominio variable de la cadena pesada humanizada puede comprender las CDR enumeradas en la SEQ ID NO:11-13; las variantes de CDR; las correspondientes CDR en la SEQ ID NO:17; las unidades de unión; o variantes de las mismas, dentro de una región marco de anticuerpo aceptor que tiene el 75 % o más, el 80 % o más, el 85 % o más, el 90 % o más, el 95 % o más, el 98 % o más, el 99 % o más o el 100 % de identidad en las regiones marco con la secuencia del dominio variable aceptor humano en la SEQ ID NO:25. El dominio variable de cadena ligera humanizada puede comprender las CDR enumeradas en la SEQ ID NO:14-16; las variantes de CDR; las correspondientes CDR en la SEQ ID NO:19; las unidades de unión; o variantes de las mismas, dentro de una región marco de anticuerpo aceptor que tiene el 75 % o más, el 80 % o más, el 85 % o más, el 90 % o más, el 95 % o más, el 98 % o más, el 99 % o más o el 100 % de identidad en las regiones marco con la secuencia del dominio variable aceptor humano en la SEQ ID NO:32.

- 30 La presente memoria descriptiva describe una proteína de unión a antígeno que se une de manera específica a SAP y comprende una región variable de cadena pesada seleccionada de una cualquiera de las SEQ ID NO:27-31. La proteína de unión a antígeno puede comprender una región variable de cadena ligera seleccionada de una cualquiera de las SEQ ID NO:34-36. Cualquiera de las regiones variables de la cadena ligera se puede combinar con cualquiera de las regiones variables de la cadena pesada.

- 35 La proteína de unión a antígeno puede comprender una cualquiera de las siguientes combinaciones de región variable de cadena pesada y de cadena ligera: H0L0 (SEQ ID NO:27 y SEQ ID NO:34), H0L1 (SEQ ID NO:27 y SEQ ID NO:35), H0L2 (SEQ ID NO:27 y SEQ ID NO:36), H1L0 (SEQ ID NO:28 y SEQ ID NO:34), H1L1 (SEQ ID NO:28 y SEQ ID NO:35), H1L2 (SEQ ID NO:28 y SEQ ID NO:36), H2L0 (SEQ ID NO:29 y SEQ ID NO:34), H2L1 (SEQ ID NO:29 y SEQ ID NO:35), H2L2 (SEQ ID NO:29 y SEQ ID NO:36), H3L0 (SEQ ID NO:30 y SEQ ID NO:34), H3L1 (SEQ ID NO:30 y SEQ ID NO:35), H3L2 (SEQ ID NO:30 y SEQ ID NO:36), H4L0 (SEQ ID NO:31 y SEQ ID NO:34), H4L1 (SEQ ID NO:31 y SEQ ID NO:35) o H4L2 (SEQ ID NO:31 y SEQ ID NO:36).

- La presente memoria descriptiva describe una proteína de unión a antígeno que se une de manera específica a SAP y comprende una región variable de cadena pesada seleccionada d una cualquiera de las SEQ ID NO:37-40. La proteína de unión a antígeno puede comprender una región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO:41, la SEQ ID NO:42 o la SEQ ID NO:74. Cualquiera de las regiones variables de cadena pesada se pueden combinar con cualquiera de las regiones variables de cadena ligera.

- La proteína de unión a antígeno puede comprender una cualquiera de las siguientes combinaciones de región variable de cadena pesada y de cadena ligera: H0L0 (SEQ ID NO:37 y SEQ ID NO:41), H0L1 (SEQ ID NO:37 y SEQ ID NO:42), H1L0 (SEQ ID NO:38 y SEQ ID NO:41), H1L1 (SEQ ID NO:38 y SEQ ID NO:42), H2L0 (SEQ ID NO:39 y SEQ ID NO:41), H2L1 (SEQ ID NO:39 and SEQ ID NO:42), H3L0 (SEQ ID NO:40 and SEQ ID NO:41), or H3L1 (SEQ ID NO:40 and SEQ ID NO:42).

L0 (SEQ ID NO:41) se puede sustituir con L0 91 A (SEQ ID NO:74).

- La región variable de la cadena pesada del anticuerpo puede tener el 75 % o más, el 80 % o más, el 85 % o más, el 90 % o más, el 95 % o más, el 96 % o más, el 97 % o más, el 98 % o más, el 99 % o más o el 100 % de identidad con la SEQ ID NO:28. La región variable de la cadena ligera del anticuerpo puede tener el 75 % o más, el 80 % o más, el 85 % o más, el 90 % o más, el 95 % o más, el 96 % o más, el 97 % o más, el 98 % o más, el 99 % o más o el 100 % de identidad con la SEQ ID NO:35.

- La región variable de la cadena pesada del anticuerpo puede tener el 75 % o más, el 80 % o más, el 85 % o más, el 90 % o más, el 95 % o más, el 96 % o más, el 97 % o más, el 98 % o más, el 99 % o más o el 100 % de identidad con la SEQ ID NO:40. La región variable de la cadena ligera del anticuerpo puede tener el 75 % o más, el 80 % o más, el 85 % o más, el 90 % o más, el 95 % o más, el 96 % o más, el 97 % o más, el 98 % o más, el 99 % o más o el 100 % de identidad con la SEQ ID NO:41. La región variable de la cadena ligera del anticuerpo puede tener el 75 % o más, el 80 % o más, el 85 % o más, el 90 % o más, el 95 % o más, el 96 % o más, el 97 % o más, el 98 % o más, el 99 % o más o el 100 % de identidad con la SEQ ID NO:74.
- La región variable de la cadena pesada del anticuerpo puede ser una variante de una cualquiera de las SEQ ID NO_27-31 que contiene 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 sustituciones, inserciones o deleciones de aminoácidos. La región variable de la cadena ligera del anticuerpo puede ser una variante de una cualquiera de las SEQ ID NO:34-36 que contiene 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 sustituciones, inserciones o deleciones de aminoácidos.
- La región variable de la cadena pesada del anticuerpo puede ser una variante de una cualquiera de las SEQ ID NO_37-40 que contiene 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 sustituciones, inserciones o deleciones de aminoácidos. La región variable de la cadena ligera del anticuerpo puede ser una variante de una cualquiera de las SEQ ID NO:41, 42 o 74 que contiene 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 sustituciones, inserciones o deleciones de aminoácidos.
- Por ejemplo, las CDR canónicas y las sustituciones canónicas de restos de regiones marco descritas anteriormente también pueden estar presentes en las regiones variables de las variantes de cadena pesada o ligera como variantes de secuencias que son al menos el 75 % idénticas o que contienen hasta 30 sustituciones de aminoácidos.
- Cualquiera de las regiones variables de cadena pesada puede combinarse con una región constante humana adecuada. Cualquiera de las regiones variables de cadena ligera pueden combinarse con una región constante adecuada.
- La proteína de unión a antígeno de la invención puede comprender una cadena pesada de SEQ ID NO: 62 y/o una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 64.
- La cadena pesada del anticuerpo puede tener el 75 % o más, el 80 % o más, el 85 % o más, el 90 % o más, el 95 % o más, el 96 % o más, el 97 % o más, el 98 % o más, el 99 % o más o el 100 % de identidad con la SEQ ID NO:62. La cadena ligera del anticuerpo puede tener el 75 % o más, el 80 % o más, el 85 % o más, el 90 % o más, el 95 % o más, el 96 % o más, el 97 % o más, el 98 % o más, el 99 % o más o el 100 % de identidad con la SEQ ID NO:64.
- La cadena pesada del anticuerpo puede ser una variante de una cualquiera de la SEQ ID NO:62 que contiene 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 sustituciones, inserciones o deleciones de aminoácidos. La cadena ligera puede ser una variante de una cualquiera de las SEQ ID NO:64 que contiene 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 sustituciones, inserciones o deleciones de aminoácidos.
- La molécula SAP de tipo disco tiene dos caras. La hélice alfa sencilla presente en cada uno de los 5 protómeros se localiza en la cara A. La cavidad de unión al ligando dependiente del calcio de cada promotor se localiza en la cara B y por lo tanto esta cara está tapada cuando el SAP está unido a fibrillas amiloides. Para que las proteínas de unión a antígeno de la presente invención tengan utilidad terapéutica, el epítope reconocido por la proteína de unión a antígeno descrita en el presente documento es deseablemente accesible en el SAP cuando el SAP está unido a depósitos amiloides y está por lo tanto localizado en la cara A o en los extremos de la molécula SAP. Por tanto, la proteína de unión a antígeno puede reconocerse y unirse al SAP unido a amiloide, conduciendo a la activación del complemento que desencadena el mecanismo de eliminación dependiente de macrófagos eficaz en el cuerpo. Por consiguiente, en una realización de la invención la proteína de unión a antígeno se une al SAP humano que está unido a fibrillas amiloides *in vivo*. En otra realización de la invención, la proteína de unión a antígeno se une a la cara A del SAP humano.
- La proteína de unión a antígeno puede provenir de rata, de ratón, de conejo, de camello (o de especies de camélidos relacionadas), o de primate (por ejemplo, de cinomolgos, de monos del viejo mundo, de homínidos o del ser humano). En una realización particular, la proteína de unión a antígeno proviene de ratón. En otra realización particular, la proteína de unión a antígeno proviene del ser humano. La proteína de unión a antígeno puede ser un anticuerpo quimérico o humanizado. La proteína de unión a antígeno puede ser un anticuerpo humano. La proteína de unión a antígeno no es un anticuerpo de murino.
- La proteína de unión a antígeno puede comprender una región constante, que puede ser de cualquier isotipo o subclase. La región constante puede ser del isotipo IgG, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 o variantes de las mismas. La región constante de la proteína de unión a antígeno puede ser IgG1. La proteína de unión a antígeno descrita en el presente documento comprende una región constante que es funcional en la activación del complemento, por ejemplo, IgG1, IgG2 o IgG3 de humano.
- La proteína de unión a antígeno descrita en el presente documento comprende una región constante que es funcional en la unión a macrófagos, por ejemplo, IgG1 o IgG3 de humano.

La proteína de unión a antígeno descrita en el presente documento comprende una región constante que es funcional tanto en la activación del complemento como en la unión a macrófagos, por ejemplo, la IgG1 o la IgG3 de humano.

- 5 La proteína de unión a antígeno puede comprender una o más modificaciones seleccionadas de un dominio constante mutado, de manera que la proteína de unión a antígeno tiene funciones efectoras/CCDA y/o de activación del complemento modificadas. En Shields y col. J. Biol. Chem (2001) 276: 6591-6604, Lazar y col. PNAS (2006) 103: 4005-4010 y en los documentos US6737056, WO2004063351 y WO2004029207, se describen ejemplos de modificaciones adecuados.

- 10 La proteína de unión a antígeno puede comprender un dominio constante con un perfil de glucosilación modificado de manera que el anticuerpo tiene funciones efectoras/CCDA y/o activación del complemento modificadas. En los documentos WO2003/011878, WO2006/014679 y EP1229125, se describen ejemplos de metodologías adecuadas para producir una proteína de unión a antígeno con un perfil de glucosilación modificado.

- 15 Las proteínas de unión a antígeno tal como las descritas en el presente documento se seleccionan que no tengan restos en regiones que sean responsables de la unión al antígeno, por ejemplo, las CDR, que son susceptibles de desamidación. Las proteínas de unión a antígeno tal como las descritas en el presente documento se seleccionan que no tengan restos en regiones responsables de la activación del complemento que son susceptibles de desamidación.

- 20 La presente memoria descriptiva describe una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de unión a antígeno Tal como se describe en el presente documento. La molécula de ácido nucleico puede comprender secuencias que codifican tanto la región variable de la cadena pesada o la secuencia de longitud completa; como la región variable de cadena ligera o la secuencia de longitud completa. Como alternativa, la molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de unión a antígeno descrita en el presente documento puede comprender secuencias que codifican la región variable de la cadena pesada o la secuencia de longitud completa; o la región variable de cadena ligera o la secuencia de longitud completa.

- 25 La molécula de ácido nucleico que codifica la región variable de cadena pesada puede comprender una cualquiera de las SEQ ID NO: 51 o 53-57. La molécula de ácido nucleico que codifica la región variable de cadena ligera puede comprender una cualquiera de las SEQ ID NO: 52 o 58-60.

La molécula de ácido nucleico que codifica la cadena pesada puede comprender la SEQ ID NO:61. La molécula de ácido nucleico que codifica la cadena ligera puede comprender la SEQ ID NO:63.

- 30 La molécula de ácido nucleico que codifica la región variable de cadena pesada puede comprender una cualquiera de las SEQ ID NO:65 o 67-70. La molécula de ácido nucleico que codifica la región variable de cadena ligera puede comprender una cualquiera de la SEQ ID NO:6 o 71-73.

La molécula de ácido nucleico también puede contener una o más sustituciones de nucleótidos que no modifica la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada y/o ligera codificada.

- 35 La presente memoria descriptiva describe un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico como se describe en el presente documento. La presente invención proporciona una célula huésped recombinante, que comprende un vector de expresión como se describe en el presente documento.

- 40 La proteína de unión a antígeno descrita en el presente documento puede producirse en una célula huésped adecuada. Un procedimiento para la producción de proteína de unión a antígeno como se describe en el presente documento puede comprender la etapa de cultivar una célula huésped como se describe en el presente documento y recuperar la proteína de unión a antígeno. Una célula huésped recombinante, transformada, transfectada o transducida puede comprender al menos un casete de expresión, mediante la cual dicho casete de expresión comprende un polinucleótido que codifica una cadena pesada de la proteína de unión a antígeno descrita en el presente documento y adicionalmente comprende un polinucleótido que codifica una cadena ligera de la proteína de unión a antígeno descrita en el presente documento. Como alternativa, una célula huésped recombinante, transformada, transfectada o transducida puede comprender al menos un casete de expresión, mediante la cual un primer casete de expresión comprende un polinucleótido que codifica una cadena pesada de la proteína de unión a antígeno descrita en el presente documento y comprende adicionalmente un segundo casete que comprende un polinucleótido que codifica una cadena ligera de la proteína de unión a antígeno descrita en el presente documento.
- 50 Una célula huésped establemente transformada puede comprender un vector que comprende uno o más casetes de expresión que codifican una cadena pesada y/o una cadena ligera de la proteína de unión a antígeno descrita en el presente documento. Por ejemplo dichas células huéspedes pueden comprender un primer vector que codifica la cadena ligera y un segundo lector que codifica la cadena pesada.

- 55 La célula huésped puede ser eucariota, por ejemplo, de mamífero. Los ejemplos de dichas líneas celulares incluyen CHO o NS0. La célula huésped puede cultivarse en un medio de cultivo, por ejemplo, en un medio de cultivo sin suero. La proteína de unión a antígeno puede secretarse por la célula huésped en el medio de cultivo. La proteína de unión a antígeno puede purificarse hasta al menos el 95% o más (por ejemplo el 98% o más) con respecto a

dicho medio de cultivo que contiene la proteína de unión a antígeno.

Puede proporcionarse una composición farmacéutica que comprende la proteína de unión a antígeno y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Puede proporcionarse un kit de partes que comprende la composición farmacéutica junto con instrucciones para su uso. Por comodidad, el kit puede comprender los reactivos en cantidades predeterminadas con instrucciones para su uso.

Estructuras de Anticuerpos

Anticuerpos intactos

Basándose en la secuencia de aminoácidos de la región constante, las cadenas ligeras de anticuerpos de la mayoría de las especies de vertebrados pueden asignarse a uno o dos tipos denominados kappa y lambda. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos de la región constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos humanos pueden asignarse a cinco clases diferentes IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Adicionalmente, IgG e IgA pueden subdividirse en subclases IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4; e IgA1 e IgA2. Existen variantes de especies con ratones y ratas que tienen al menos IgG2a, IgG2b.

Las partes más conservadas de la región variable se denominan regiones marco conservadas (FR). Los dominios variables de cada cadena pesada y ligera intacta pueden comprender cuatro FR conectadas por tres CDR. Las CDR en cada cadena se mantienen unidas en estrecha proximidad por las regiones FR y con las CDR de la otra cadena contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos.

Las regiones constantes no están directamente implicadas en la unión del anticuerpo al antígeno pero presentan diversas funciones efectoras tales como participación en la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (CCDA), fagocitosis por la unión al receptor de Fc γ , índice de semivida/eliminación mediante el receptor de Fc neonatal (FcRn) y activación del complemento mediante el componente C1q, conduciendo a la quimiotaxis, opsonización y potencialmente, en el caso de una diana antigénica celular viable, acciones citolíticas del complemento. Los anticuerpos humanos de la clase IgG1 son los más potentes activando el sistema del complemento y son por lo tanto el isotipo deseable para la aplicación terapéutica de los anticuerpos de la presente invención.

Se ha indicado que la región constante de la IgG2 humana carece esencialmente de la capacidad de activar el complemento mediante la ruta clásica o de mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. Se ha indicado que la región constante de la IgG4 carece de la capacidad de activar el complemento mediante la ruta clásica y apenas media la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. Los anticuerpos que carecen esencialmente de estas funciones efectoras pueden denominarse anticuerpos "no líticos".

Anticuerpos humanos

Los anticuerpos humanos se pueden producir mediante una serie de procedimientos conocidos por los expertos en la materia. Los anticuerpos humanos se pueden preparar mediante el procedimiento del hibridoma usando las líneas celulares de mioma humano o de heteromieloma de humano-ratón (véase Kozbor (1984) J. Immunol 133, 3001, and Brodeur, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, 51-63 (Marcel Dekker Inc, 1987). Los procedimientos alternativos incluyen el uso de bibliotecas de fagos o de ratones transgénicos, que utilizan repertorios de región variable de humano (véase Winter (1994) Annu. Rev. Immunol 12: 433-455; Green (1999) J. Immunol. Methods 231: 11-23).

Actualmente hay disponibles varias cepas de ratones transgénicos en las que sus loci de inmunoglobulina de ratón se han reemplazado con segmentos génicos de inmunoglobulina humana (véase Tomizuka (2000) PNAS 97: 722-727; Fishwild (1996) Nature Biotechnol. 14: 845-851; Mendez (1997) Nature Genetics, 15: 146-156). Tras la exposición al antígeno, tales ratones son capaces de producir un repertorio de anticuerpos humanos del que se pueden seleccionar los anticuerpos de interés.

La tecnología de presentación en fago se puede usar para producir proteínas de unión a antígeno (y fragmentos de las mismas), véase McCafferty (1990) Nature 348: 552-553 and Griffiths et al. (1994) EMBO 13: 3245-3260.

La técnica de maduración por afinidad (Marks Bio/technol (1992) 10: 779-783) se puede usar para mejorar la afinidad de unión en la que la afinidad de los anticuerpos humanos primarios se mejora reemplazando de manera secuencial las regiones variables de cadena pesada (H) y ligera (L) con variantes de origen natural y la selección basada en las afinidades de unión mejoradas. Las variantes de esta técnica tales como la "impronta genómica de epítopes" también están actualmente disponibles, véase, por ejemplo, el documento WO 93/06213; Waterhouse (1993) Nucl. Acids Res. 21: 2265-2266.

Anticuerpos Quiméricos y Humanizados

Los anticuerpos quiméricos se producen típicamente usando procedimientos de ADN recombinante. El ADN que codifica los anticuerpos (por ejemplo ADNc) se aísla y se secuencia usando procedimientos convencionales (por

ejemplo usando sondas oligonucleotídicas que pueden unirse especialmente a genes que codifican las cadenas H y L del anticuerpo. Las células de hibridoma proporcionan una fuente típica de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN se introduce en vectores de expresión que después se transfectan en células huéspedes tales como *E. coli*, células COS, células CHO o células de mieloma que por otro lado no producen la proteína de inmunoglobulina para obtener la síntesis del anticuerpo. El ADN puede modificarse sustituyendo la secuencia codificante para cadenas L y H humanas por las regiones constantes H y L correspondientes no-humanas (por ejemplo murinas) H y L, véase por ejemplo Morrison (1984) PNAS 81: 6851.

Puede conseguirse una gran disminución en inmunogenicidad injertando solamente las CDR de anticuerpos no humanos (por ejemplo murinos) (anticuerpos "donantes") sobre la región marco conservada humana ("región marco conservada aceptora") y regiones constantes para generar anticuerpos humanizados (véase Jones y col. (1986) Nature 321: 522-525; y Verhoeyen y col. (1988) Science 239: 1534-1536).

Sin embargo, de por sí el injerto de una CDR no puede dar como resultado la conservación completa de las propiedades de unión a antígeno y con frecuencia se observa que algunos restos de la región marco conservada (denominados a veces "retromutaciones") del anticuerpo donante deben conservarse en la molécula humanizada si debe recuperarse una afinidad de unión a antígeno significativa (véase Queen y col. (1989) PNAS 86: 10,029-10,033; Co y col. (1991) Nature 351: 501-502). En este caso, las regiones variables humanas que muestran la mayor homología de secuencia con el anticuerpo donante no-humano se seleccionan de una base de datos para proporcionar la región marco conservada (RF) humana. La selección de las RF humanas puede realizarse a partir de anticuerpos consenso humanos o humanos individuales. Si fuera necesario, para conservar conformaciones CDR, pueden sustituirse restos clave del anticuerpo donante en la región marco conservada aceptora humana. Para ayudar a identificar dichos restos estructuralmente importantes, puede usarse la modelación informatizada de los anticuerpos, véase el documento WO 99/48523.

Como alternativa, la humanización puede conseguirse mediante un proceso de "sustitución en superficie". Un análisis estadístico de regiones variables de cadena ligera y pesada de inmunoglobulina humana y murina reveló que los patrones exactos de restos expuestos son diferentes en anticuerpos humanos y murinos, y la mayoría de las posiciones superficiales individuales tienen una fuerte preferencia por un pequeño número de restos diferentes (véase Padlan y col. (1991) Mol. Immunol. 28: 489-498; y Pedersen y col. (1994) J. Mol. Biol. 235: 959-973). Por lo tanto es posible reducir la inmunogenicidad de un Fv no humano sustituyendo restos expuestos en sus regiones marco conservadas que difieren de aquellas normalmente encontradas en anticuerpos humanos. Debido a que la antigenicidad de proteína puede correlacionarse con la accesibilidad superficial, la sustitución de los restos en la superficie puede ser suficiente para hacer "invisible" la región variable de ratón para el sistema inmune humano (véase también Mark y col. (1994) in Handbook of Experimental Pharmacology Vol. 113: The pharmacology of Monoclonal Antibodies, Springer-Verlag, 105-134). Este procedimiento de humanización se denomina "sustitución en superficie" porque solamente se modifica la superficie del anticuerpo, los restos de refuerzo permanecen inalterados. Otras estrategias alternativas incluyen las expuestas en el documento WO04/006955 y en el procedimiento de Humaneering™ (Kalobios) que utiliza sistemas de expresión bacterianos y produce anticuerpos que están próximos a la línea germinal humana en la secuencia (Alfenito-M Advancing Protein Therapeutics January 2007, San Diego, California).

Proteínas de unión a antígeno biespecíficas

Una proteína de unión a antígeno biespecífica es una proteína de unión a antígeno que tiene especificidades de unión por al menos dos epitopes diferentes. Los procedimientos de preparación de tales proteínas de unión a antígeno se conocen en la materia. Tradicionalmente, la producción recombinante de proteínas de unión a antígeno biespecíficas se basa en la coexpresión de dos pares de cadena H-cadena L de inmunoglobulinas, en las que las dos cadenas H tienen diferentes especificidades de unión, véase Millstein col. (1983) Nature 305: 537-539; el documento WO 93/08829; y Traunecker y col. (1991) EMBO 10: 3655-3659. Debido a la variedad aleatoria de las cadenas H y L, se produce una potencial mezcla de diez estructuras de anticuerpos diferentes de las cuales solo una tiene la especificidad de unión deseada. Una estrategia alternativa implica la fusión de los dominios variables con las especificidades de unión deseada a la región constante de la cadena pesada que comprende al menos parte de la región de bisagra, y las regiones de CH2 y CH3. La región de CH1 que contiene el sitio necesario para la unión de la cadena ligera puede estar presente en al menos una de las fusiones. El ADN que codifica esas fusiones y, si se desea, la cadena L se insertan en vectores de expresión separados y después se cotransfectan en un organismo huésped adecuado. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificantes para dos o las tres cadenas en un vector de expresión. En una estrategia, el anticuerpo específico está compuesto de una cadena H con una primera especificidad de unión en un brazo y un par de cadenas H-L, que proporciona una segunda especificidad de unión en el otro brazo, véase el documento WO 94/04690. Véase también Suresh y col. (1986) Methods in Enzymology 121: 210.

Fragmentos de unión a antígeno

Los fragmentos que carecen de la región constante carecen de la capacidad para activar el complemento mediante la vía clásica o para mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se producen mediante la digestión proteolítica de los anticuerpos intactos mediante, por ejemplo, digestión de papaína (véase, por ejemplo, el documento WO 94/29348) pero se pueden producir directamente a partir de las

células huésped transformadas de manera recombinante. Para la producción de ScFv, véase Bird y col. (1988) Science 22: 423-426. Además, los fragmentos de unión a antígeno se pueden producir usando una variedad de técnicas de diseño genético tal como se describe a continuación.

- Los fragmentos Fv parecen tener una menor energía de interacción de sus dos cadenas que los fragmentos Fab.
- 5 Para estabilizar la asociación de los dominios VH y VL, se han enlazado con péptidos (Bird y col. (1988) Science 242: 423-426; Huston y col. (1988) PNAS 85(16): 5879-5883), puentes disulfuro (Glockshuber y col. (1990) Biochemistry 29: 1362-1367) y mutaciones de "pomo en agujero" (Zhu y col. (1997) Protein Sci., 6: 781-788). Los fragmentos ScFv se pueden producir mediante procedimientos bien conocidos por los expertos en la materia, véase Whitlow y col. (1991) Methods Companion Methods Enzymol. 2: 97-105 y Huston et al. (1993) Int.Rev. Immunol 10:
- 10 195-217. Se pueden producir ScFv en células bacterianas tales como E. coli o en células eucariotas. Una desventaja de los ScFv es la monovalencia del producto, que impide un aumento de la avidéz debido a la unión polivalente y a su corta semivida. Los intentos por superar estos problemas incluyen (ScFv)₂ bivalente producido a partir de ScFv que contiene una cisteína adicional en C-terminal mediante acoplamiento químico (Adams et al. (1993) Can. Res 53: 4026-4034; y McCartney et al. (1995) Protein Eng. 8: 301-314) o mediante dimerización espontánea específica de
- 15 sitio de ScFv que contiene un resto de cisteína desemparejado en C-terminal (véase Kipriyanov y col. (1995) Cell. Biophys 26: 187-204). Como alternativa, se puede forzar a que ScFv forme multímeros mediante acortamiento del enlazador de péptidos a 3 a 12 restos para formar "diacuerpos", véase Holliger y col. (1993) PNAS 90: 6444-6448. Reducir más aún el enlazador puede dar como resultado trímeros de ScFv ("triacuerpos", véase Kortt y col. (1997) Protein Eng 10: 423-433) y tetrámeros ("tetracuerpos", véase Le Gall y col. (1999) FEBS Lett, 453: 164-168). La
- 20 construcción de moléculas de ScFv bivalentes también se puede lograr mediante fusión genética con motivos de dimerización de proteínas para formar "minianticuerpos" (véase Pack y col. (1992) Biochemistry 31: 1579-158) y "minicuerpos" (véase Hu y col. (1996) Cancer Res. 56: 3055-3061). Los tándems ScFv-Sc-Fv ((ScFv)₂) también se pueden producir enlazando dos unidades de ScFv mediante un tercer enlazador de péptidos, véase Kurucz y col. (1995) J. Immunol. 154: 4576-4582. Los diacuerpos biespecíficos se pueden producir a través de la asociación no
- 25 covalente de productos de fusión de dos cadenas simples que consisten en el dominio VH de un anticuerpo conectado mediante un enlazador corto al dominio VLL de otro anticuerpo, véase Kipriyanov y col. (1998) Int. J. Can 77: 763-772. La estabilidad de tales diacuerpos biespecíficos se puede mejorar mediante la introducción de puentes disulfuro o mutaciones de "pomo en agujero" tal como se describe anteriormente o mediante la formación de diacuerpos de cadena simple (ScDb) en los que dos fragmentos ScFv híbridos se conectan a través de un enlazador
- 30 de péptidos, véase Kontermann y col. (1999) J. Immunol. Methods 226:179-188. Las moléculas tetravalentes biespecíficas se pueden obtener, por ejemplo, mediante la fusión de un fragmento de ScFv al dominio de CH₃ de una molécula de IgG o a un fragmento Fab a través de la región bisagra, véase Coloma y col. (1997) Nature Biotechnol. 15: 159-163. Como alternativa, las moléculas tetravalentes biespecíficas se han creado mediante la fusión de diacuerpos de cadena simple biespecíficos (véase Alt y col. (1999) FEBS Lett 454: 90-94. Las moléculas
- 35 tetravalentes biespecíficas más pequeñas también se pueden formar mediante la dimerización de bien tándems de ScFv-ScFv con un enlazador que contiene un motivo hélice-bucle-hélice (minianticuerpos DiBi, véase Muller y col. (1998) FEBS Lett 432: 45-49) o una molécula de cadena simple que comprende cuatro dominios variables de anticuerpos (VH y VL) en una orientación que evita el emparejamiento intramolecular (diacuerpo en tándem, véase Kipriyanov y col. (1999) J. Mol. Biol. 293: 41-56). Los fragmentos F(ab')₂ biespecíficos se pueden crear mediante
- 40 acoplamiento químico de fragmentos Fab' o mediante heterodimerización a través de cremalleras de leucina (véase Shalaby y col. (1992) J. Exp. Med, 175: 217-225; y Kosteln y col. (1992), J. Immunol. 148: 1547-1553). También se pueden obtener dominios VH y VL aislados (Domantis plc), véase los documentos US 6.248.516; US 6.291.158; y US 6.172.197.

Anticuerpos heteroconjugados

- 45 Los anticuerpos heteroconjugados se componen de dos anticuerpos unidos de manera covalente que se forman usando cualquiera de los métodos adecuados de reticulación. Véase, por ejemplo, el documento US 4.67.980.

Otras modificaciones

- Las proteínas de unión a antígeno de la presente invención pueden comprender otras modificaciones para mejorar o modificar sus funciones efectoras. Se cree que la interacción entre la región Fc de un anticuerpo y diversos
- 50 receptores de Fc (FcγR) media las funciones efectoras del anticuerpo, lo que incluye la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA), la fijación del complemento, la fagocitosis y la semivida/eliminación del anticuerpo. Se pueden llevar a cabo diversas modificaciones a la región de Fc de los anticuerpos en función de la propiedad deseada. Por ejemplo, las mutaciones específicas en la región Fc para producir un anticuerpo no lítico, que de otro modo sería lítico, se detallan en los documentos EP 0629249 y EP 0307434 o se puede incorporar un
- 55 receptor de rescate que se une al epítipo en el anticuerpo para aumentar la semivida sérica, véase el documento US 5.739.277. Los receptores de Fcγ humanos incluyen FcγR (I), FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa y FcRn neonatal. Shields y col. (2001) J. Biol. Chem 276: 6591-6604 demostraron que un conjunto común de restos de IgG1 está implicado en la unión de todos los FcγR, mientras que FcγRII y FcγRIII utilizan distintos sitios fuera de este conjunto común. Un grupo de restos de IgG1 redujo la unión a todos los FcγR cuando se alteraron a alanina: Pro-238, Asp-
- 60 265, Asp-270, Asn-297 y Pro-239. Todos están en el dominio CH2 de la IgG2 y se agrupan cerca de la bisagra que une CH1 y CH2. Aunque FcγRI solo utiliza el conjunto común de restos de IgG1 para la unión, FcγRII y FcγRIII interactúan con distintos restos, además del conjunto común. La alteración de algunos restos redujo la unión solo

para FcγRII (por ejemplo, Arg-292) o FcγRIII (por ejemplo, Glu-293). Algunas variantes mostraron una unión mejorada a FcγRII o a FcγRIII, pero no afectaron a la unión al otro receptor (por ejemplo, Ser-267Ala mejoró la unión a FcγRII pero la unión a FcγRIII quedó sin afectar). Otras variantes mostraron una unión mejorada a FcγRII o FcγRIII con reducción en la unión al otro receptor (por ejemplo, Ser-298Ala mejoró la unión a FcγRIII y redujo la unión a FcγRII). Para FcγRIIIa, las mejores variantes de IgG1 de unión tenían sustituciones combinadas de alanina en Ser-298, Glu-333 y Lys-334. Se cree que el receptor de FcRn neonatal está implicado tanto en la eliminación del anticuerpo como en la transcitosis a través de tejidos (véase Junghans (1997) *Immunol. Res.* 16: 29-57; y Ghetie y col. (2000) *Annu. Rev. Immunol.* 18: 739-766). Los restos de IgG1 de humano determinados para interactuar directamente con FcRn de humano incluyen Ile253, Ser254, Lys288, Thr307, Gln311, Asn434 y His435. Las sustituciones en cualquiera de las posiciones descritas en esta sección pueden permitir una elevada semivida sérica y/o propiedades efectoras de los anticuerpos alteradas.

Otras modificaciones incluyen las variantes de glucosilación de los anticuerpos. Se sabe que la glucosilación de los anticuerpos en posiciones conservadas en sus regiones constantes tiene un gran efecto sobre la función de los anticuerpos, en particular, en funciones efectoras tales como las descritas anteriormente, véase, por ejemplo, Boyd y col. (1996) *Mol. Immunol.* 32: 1311-1318. Se contemplan las variantes de glucosilación de los anticuerpos o de los fragmentos de unión a antígeno de los mismos en las que se añade, sustituye, deleta o modifica uno o más restos de hidratos de carbono. La introducción de un motivo asparagina-X-serina o asparagina-Xtreonina crea un posible sitio para la unión enzimática de restos de hidratos de carbono y, por lo tanto, se puede usar para manipular la glucosilación de un anticuerpo. En Raju y col. (2001) *Biochemistry* 40: 8868-8876 la sialilación terminal de una inmunoadhesina de TNFR-IgG aumentó a través de un procedimiento de regalactosulación y/o de resialilación usando beta-1,4-galactosiltransferasa y/o alfa, 2,3, sialiltransferasa. Se cree que el aumento de la sialilación terminal aumenta la semivida de la inmunoglobulina. Los anticuerpos, al igual que la mayoría de las glucoproteínas, normalmente se producen como una mezcla de glucoformas. Esta mezcla es particularmente evidente cuando se producen anticuerpos en células eucariotas, en particular, de mamífero. Se han desarrollado una variedad de métodos para fabricar glucoformas definidas, véase Zhang y col. (2004) *Science* 303:371; Sears y col. (2001) *Science* 291: 2344; Wacker y col. (2002) *Science* 298: 1790; Davis y col. (2002) *Chem. Rev.* 102: 579; Hang y col. (2001) *Acc. Chem. Res.* 34: 727. Los anticuerpos (por ejemplo, del isotipo de IgG, por ejemplo IgG1) tal como se describen en el presente documento, pueden comprender un número definido (por ejemplo, 7 o menos, por ejemplo 5 o menos, tal como dos o una sola) de las glucoformas.

Los anticuerpos se pueden acoplar a un polímero no proteico tal como polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol o polioxilalqueno. La conjugación de proteínas con PEG es una técnica establecida para aumentar la semivida de las proteínas, así como para reducir la antigenicidad e inmunogenicidad de las proteínas. El uso de PEGilación con diferentes pesos moleculares y estilos (lineal o ramificado) se ha investigado con anticuerpos intactos, así como con fragmentos Fab', véase Koumenis y col. (2000) *Int. J. Pharmaceut.* 198:83-95.

Métodos de Producción

Las proteínas de unión a antígeno pueden producirse en organismos transgénicos tales como cabras (véase Pollock y col. (1999) *J. Immunol. Methods* 231: 147-157), pollos (véase Morrow (2000) *Genet. Eng. News* 20: 1-55), ratones (véase Pollock y col.) o plantas (véase Doran (2000) *Curr. Opin. Biotechnol.* 11: 199-204; Ma (1998) *Nat. Med.* 4: 601-606; Baez y col. (2000) *BioPharm* 13: 50-54; Stoger y col. (2000) *Plant Mol. Biol.* 42: 583-590).

Las proteínas de unión a antígeno también pueden producirse por síntesis química. Sin embargo, las proteínas de unión a antígeno se producen típicamente usando tecnología de cultivo celular recombinante bien conocida por los expertos en la materia. Un polinucleótido que codifica la proteína de unión a antígeno se aísla y se inserta en un vector que puede replicarse, tal como un plásmido, para clonación posterior (amplificación) o expresión. Un sistema de expresión es un sistema sintetasa glutamato (tal como el comercializado por Lonza Biologics), particularmente en el que la célula huésped es CHO o NS0. El polinucleótido que codifica la proteína de unión a antígeno se aísla y se secuencia fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, sondas oligonucleotídicas). Los vectores que pueden usarse incluyen plásmidos, virus, fagos, transposones, minocromosomas cuyos plásmidos se usan típicamente. Generalmente dichos vectores incluyen adicionalmente una secuencia de señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento amplificador, un promotor y secuencias de terminación de la transcripción unidas operativamente al polinucleótido de la proteína de unión a antígeno para facilitar la expresión. El polinucleótido que codifica las cadenas ligera y pesada puede insertarse en vectores individuales e introducirse (por ejemplo, por transformación, transfección, electroporación o transducción) en la misma célula huésped simultánea o secuencialmente o, si se desea, antes de dicha introducción, la cadena pesada y la cadena ligera pueden insertarse en el mismo vector.

La optimización con codón puede usarse con el propósito de que el nivel total de proteína producido por la célula huésped sea mayor cuando se transfecta con el gen de codón optimizado en comparación con el nivel cuando se transfecta con la secuencia. Se han publicado diversos procedimientos (Nakamura y col. (1996) *Nucleic Acids Research* 24: 214-215; documentos W098/34640; W097/11086). Debido a la redundancia del código genético, polinucleótidos alternativos a los descritos en el presente documento (particularmente los optimizados por codones para la expresión en una célula huésped determinada) también pueden codificar las proteínas de unión a antígeno descritas en el presente documento. Por lo tanto, el uso del codón de la proteína de unión a antígeno de la presente

invención puede modificarse para adaptar desviaciones de codón de la célula huésped de manera que se aumenta la transcripción y/o la producción del producto (por ejemplo Hoekema y col Mol Cell Biol 1987 7(8): 2914-24). La elección de codones puede basarse en la compatibilidad adecuada con la célula huésped usada para expresión.

Secuencias de señal

- 5 Las proteínas de unión a antígeno pueden producirse como una proteína de fusión con una secuencia de señal heteróloga que tiene un sitio de escisión específico en el extremo N de la proteína madura. La célula huésped debe reconocer y procesar la secuencia de señal. Para las células huéspedes procariotas, las secuencias de señal pueden ser, por ejemplo, secuencias líder de fosfatasa alcalina, penicilinasas o de enterotoxina II termoestable. Para la secreción en levaduras las secuencias de señal pueden ser, por ejemplo, una secuencia líder de invertasa de levadura, una secuencia líder de factor α o secuencias líder de ácido fosfatasa, véase, por ejemplo, el documento WO90/13646. En los sistemas celulares de mamíferos, pueden ser adecuadas secuencias líderes secretoras virales, tales como la señal gD del herpes simple y una secuencia de señal de inmunoglobulina natural. Típicamente la secuencia de señal está ligada en fase de lectura al ADN que codifica la proteína de unión a antígeno. Puede usarse una secuencia de señal murina tal como la mostrada en la SEQ ID NO: 79.

Origen de replicación

- 15 En la técnica se conocen orígenes de replicación, siendo adecuado pBR322 para la mayoría de las bacterias gram negativas, el plásmido de 2 μ para la mayoría de las levaduras y diversos orígenes virales, tales como, SV40, polioma, adenovirus, VSV o BPV para la mayoría de las células de mamíferos. Generalmente, para los vectores de expresión en mamíferos no es necesario el componente de origen de replicación, pero puede usarse el SV40 puesto que contiene el promotor temprano.

Marcador de selección

- 25 Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) otorgan resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina o (b) complementan carencias auxiotróficas o proporcionan nutrientes no disponibles en los medios complejos o (c) combinaciones de las dos. El esquema de selección puede implicar la detención del crecimiento de la célula huésped. Las células que se han transformado con éxito con los genes que codifican la proteína de unión a antígeno, sobreviven debido, por ejemplo, a la resistencia a fármacos otorgada por el marcador de selección co-administrado. Un ejemplo es el marcador de selección DHFR en el que los transformantes se cultivan en presencia de metotrexato. Las células pueden cultivarse en presencia de cantidades aumentadas de metotrexato para amplificar el número de copias del gen exógeno de interés. Las células CHO son una línea celular particularmente útil para la selección de DHFR. Otro ejemplo es el sistema de expresión glutamato sintetasa (Lonza Biologics). Un ejemplo de un gen de selección para su uso en levaduras es el gen trp1, véase Stinchcomb y col. (1979) Nature 282: 38.

Promotores

- 35 Para la expresión de proteínas de unión a antígeno, los promotores adecuados están unidos operativamente al ADN/polinucleótido que codifica la proteína de unión a antígeno. Para los huéspedes procariotas los promotores incluyen el promotor phoA, los sistemas promotores beta-lactamasa y lactosa, fosfatasa alcalina, triptófano y promotores híbridos tales como Tac. Los promotores adecuados para la expresión en células de levadura incluyen 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glucolíticas por ejemplo enolasa, gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa 6 fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa y glucoquinasa. Los promotores de levaduras inducibles incluyen alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, metalotioneína y enzimas responsables del metabolismo del nitrógeno o de la utilización de maltosa/galactosa.

- 45 Para la expresión en sistemas celulares de mamíferos, los promotores incluyen promotores virales tales como polioma, viruela aviar y adenovirus (por ejemplo adenovirus 2), papilomavirus bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus (en particular el promotor del gen temprano inmediato), retrovirus, virus de la hepatitis B, actina, promotor del virus del sarcoma de Rous (VSR) y el virus del Simio 40 temprano o tardío. Por supuesto la elección del promotor se basa en la compatibilidad adecuada con la célula huésped usada para la expresión. Un primer plásmido puede comprender un promotor del VSR y/o SV40 y/o CMV, ADN que codifica la región variable de cadena ligera (VL), la región kC junto con marcadores de selección de resistencia a neomicina y ampicilina y un segundo plásmido que comprende un promotor de VSR o SV40, ADN que codifica la región variable de cadena pesada (VH), ADN que codifica la región constante γ 1, DHFR y marcadores de resistencia a ampicilina.

Elemento amplificador

- 55 Cuando resulta apropiado, por ejemplo, para la expresión en eucariotas superiores, en un vector puede usarse un elemento amplificador unido operativamente al elemento promotor. Las secuencias amplificadoras de mamíferos incluyen elementos amplificadores de globina, elastasa, albúmina, fetoproteína e insulina. Como alternativa, puede usarse un elemento amplificador de un virus de una célula eucariota tal como el amplificador del SV40 (en los pb100-270), amplificador del promotor temprano de citomegalovirus, amplificador de polioma, amplificador de

baculovirus o el locus de IgG2a murino (véase el documento WO04/009823). El amplificador puede localizarse, en el vector, en un sitio aguas arriba del promotor. Como alternativa, el amplificador puede localizarse en cualquier parte, por ejemplo dentro de la región no traducida o aguas abajo de la señal de poliadenilación. La elección y ubicación del amplificador puede basarse en la compatibilidad adecuada con la célula huésped usada para la expresión.

5 Poliadenilización/terminación

En sistemas eucariotas, las señales de poliadenilación están unidas operativamente al ADN/polinucleótido que codifica la proteína de unión a antígeno. Dichas señales están típicamente ubicadas en la posición 3' de la fase de lectura abierta. En sistemas de mamíferos, los ejemplos no limitantes incluyen señales derivadas de hormonas del crecimiento, factor de elongación 1 alfa y genes virales (por ejemplo SV40) o largas repeticiones terminales retrovirales. En sistemas de levaduras, los ejemplos no limitantes de señales de poliadenilación/terminación incluyen los derivados de los genes de fosfoglicerato quinasa (PKG) y alcohol deshidrogenasa 1 (ADH). En sistemas procariotas, típicamente no se necesitan señales de poliadenilación y en su lugar es habitual emplear secuencias terminadoras más cortas y más definidas. La elección de las secuencias de poliadenilación/terminación puede basarse en la compatibilidad adecuada con la célula huésped usada para la expresión.

15 Otros procedimientos/elementos para mejorar rendimientos

Además de lo indicado anteriormente, otras características que pueden emplearse para mejorar los rendimientos incluyen elementos de remodelación de la cromatina, intrones y modificación de codones específicos de la célula huésped.

Células huéspedes

20 Las células huéspedes adecuadas para la clonación o vectores de expresión que codifican anticuerpos son células procariotas, de levaduras o de eucariotas superiores. Las células procariotas adecuadas incluyen eubacterias, por ejemplo, enterobacteriáceas tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli* (por ejemplo 31,446; 31,537; 27,325 de la CACT), *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescens* y *Shigella* así como bacilos tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (véase DD 266

25 710), *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa* y *Streptomyces*. En cuanto a células huéspedes de levaduras, también se contemplan, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces* (por ejemplo 16,045; 12,424; 24,178; 56,500 de la CACT), *Yarrowia* (EP402, 226), *Pichia pastoris* (EP 183 070, véase también Peng y col. (2004) J. Biotechnol. 108: 185-192), *Candida*, *Trichoderma reesia* (EP 244 234), Penicilina, *Tolypocladium* y huéspedes de *Aspergillus* tales como *A. nidulans* y *A. niger*.

30 Las células huéspedes eucariotas superiores incluyen células de mamífero tales como COS-1 (CACT N° CRL 1650) COS-7 (CACT CRL 1651), línea humana de riñón embrionario 293, células de riñón de cría de hámster (BHK) (CACT CRL.1632), BHK570 (CACT N°: CRL 10314), 293 (CACT N° CRL 1573), células de ovario de hámster Chino, CHO (por ejemplo CHO-K1, CACT N°: CCL 61, la línea celular DHFR-CHO tal como DG44 (véase Urlaub y col. (1986) Somatic Cell Mol. Genet.12: 555-556), particularmente las de las líneas celulares de CHO adaptadas para

35 cultivos en suspensión, células de Sertoli de ratón, células de riñón de mono, células de riñón de mono verde Africano (CACT CRL-1587), células HELA, células de riñón canino (CACT CCL 34), células de pulmón humano (CACT CCL 75), Hep G2 y células de mieloma o de linfoma, por ejemplo, NS0 (véase el documento US 5.807.715), Sp2/0, YO.

Además, dichas células huéspedes también pueden modificarse por ingeniería genética o adaptarse para modificar la calidad función y/o rendimiento de la proteína de unión a antígeno. Los ejemplos no limitantes incluyen la expresión de enzimas de modificación específicas (por ejemplo glucosilación) y acompañantes del plegamiento de las proteínas.

Procedimientos de Cultivo Celular

45 Las células huéspedes transformadas con vectores que codifican proteínas de unión a antígeno pueden cultivarse por cualquier procedimiento conocido por los expertos en la materia. Las células huéspedes pueden cultivarse en matraces rotativos, frascos de rodillo o sistemas de fibra hueca pero para la producción a gran escala, para los cultivos en suspensión, se usan particularmente reactores de tanque con agitación. Los tanques de agitación pueden adaptarse para ventilar usando rociadores, deflectores o impulsores de baja cizalla. Para las columnas en burbuja y reactores de transporte aéreo pueden usarse la ventilación directa con aire o burbujas de oxígeno. Cuando las

50 células huéspedes se cultivan en un medio de cultivo sin suero, el medio se complementa con un agente protector celular tal como pluronic F-68 para ayudar a impedir el daño celular como resultado del proceso de ventilación. Dependiendo de las características de la célula huésped, pueden usarse micro transportadores como sustratos de cultivo para las líneas celulares dependientes de anclaje o las células pueden adaptarse a cultivos en suspensión (lo que es típico). El cultivo de las células huéspedes, particularmente células huéspedes de invertebrados puede

55 utilizar una diversidad modos funcionales tales como alimentación discontinua, proceso discontinuo repetido (véase Drapeau y col. (1994) Cytotechnology 15: 103-109), proceso discontinuo ampliado o cultivo de perfusión. Aunque las células huéspedes de mamíferos transformadas por recombinación pueden cultivarse en medios que contienen suero tales como suero fetal de ternero (SFT), dichas células huéspedes pueden cultivarse en medios sin suero

sintéticos tal como se describe en Keen y col. (1995) Cytotechnology 17: 153-163, o medios disponibles en el mercado tales como ProCHO-CDM o UltraCHO™ (Cambrex NJ, USA), complementados, si fuera necesario, con una fuente de energía tal como glucosa y factores del crecimiento sintéticos tal como insulina recombinante. El cultivo de células huéspedes sin suero puede precisar que las células se adapten al crecimiento en condiciones aséricas. Una estrategia de adaptación consiste en cultivar dichas células huéspedes en medios que contienen suero e intercambiar repetidamente el 80% del medio de cultivo por medio sin suero de manera que las células huéspedes aprendan a adaptarse en condiciones aséricas (véase, por ejemplo, Scharfenberg y col. (1995) in Animal Cell Technology: Developments towards the 21st century (Beuvery y col. eds, 619-623, Kluwer Academic publishers).

Las proteínas de unión a antígeno secretadas en los medios pueden recuperarse y purificarse usando una diversidad de técnicas para proporcionar un grado de depuración adecuado para el uso deseado. Por ejemplo el uso de proteínas de unión a antígeno para el tratamiento de pacientes humanos exige típicamente una pureza de al menos el 95%, más típicamente del 98% o 99% o una pureza superior (en comparación con el medio de cultivo sin depurar). Los residuos celulares de los medios de cultivo se eliminan típicamente usando centrifugación seguida de una etapa de aclaración del sobrenadante usando, por ejemplo, microfiltración, ultrafiltración y/o filtración intensa. Son posibles otras técnicas diversas, tales como diálisis y electroforesis en gel y técnicas cromatográficas tales como cromatografía en hidroxiapatita (HA), de afinidad (que opcionalmente implica un sistema de marcación por afinidad tal como polihistidina) y/o cromatografía de interacción hidrófoba (CIH, véase el documento US 5.429.746). Después de diversas etapas de aclaración, los anticuerpos pueden capturarse usando cromatografía de afinidad con proteína A o G. Además, pueden proseguir etapas de cromatografía tales como cromatografía por intercambio iónico y/o sobre HA, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía por exclusión por tamaño y precipitación en sulfato de amonio. También pueden emplearse diversas etapas de eliminación de virus (por ejemplo nanofiltración usando, por ejemplo, un filtro DV-20). Después de estas diversas etapas, se proporciona una preparación purificada (por ejemplo una monoclonal) que comprende al menos 75 mg/ml o más o 100 mg/ml o más de la proteína de unión a antígeno. Dichas preparaciones carecen sustancialmente de formas agregadas de proteínas de unión a antígeno.

Para la expresión de fragmentos de unión a antígeno pueden usarse sistemas bacterianos. Dichos fragmentos pueden localizarse intracelularmente dentro del periplasma o secretarse extracelularmente. Pueden extraerse proteínas insolubles y replegarse para formar proteínas activas de acuerdo con procedimientos conocidos por los expertos en la materia, véase Sanchez y col. (1999) J. Biotechnol. 72: 13-20; y Cupit y col. (1999) Lett Appl Microbiol 29: 273-277.

La desamidación es una reacción química en la que se elimina un grupo amida funcional. En bioquímica, la reacción es importante en la degradación de proteínas porque daña las cadenas laterales que contienen amida de los aminoácidos asparragina y glutamina. La asparragina se transforma en una mezcla de isoaspartato y aspartato. La desamidación de restos de glutamina se produce a una velocidad mucho más baja. Se cree que las reacciones de desamidación son uno de los factores que pueden limitar la vida útil conveniente de una proteína, también son una de las modificaciones post-traduccionales más habituales que se producen durante la fabricación de proteínas terapéuticas. Por ejemplo, se ha descrito una reducción o pérdida de actividad biológica *in vitro* o *in vivo* para la DNasa humana recombinante y CD4 soluble recombinante, mientras que otras proteínas recombinantes parece que no se ven afectadas.

Composiciones Farmacéuticas

Las preparaciones purificadas de una proteína de unión a antígeno, como se describe en el presente documento, pueden incorporarse en composiciones farmacéuticas para su uso en el tratamiento de enfermedades, trastornos y afecciones humanas, descritas en el presente documento. Los términos enfermedades, trastornos y afecciones se usan indistintamente. La composición farmacéutica puede usarse en el tratamiento de cualquier enfermedad en la que se presenten depósitos amiloides en los tejidos y que contribuyen a producir lesión estructural y funcional, conduciendo a una enfermedad clínica. El SAP siempre está presente en todos los depósitos amiloides *in vivo* y la composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de unión a antígeno descrita en este documento que puede usarse en el tratamiento de enfermedades sensibles a la eliminación de depósitos amiloides de los tejidos.

La preparación farmacéutica puede comprender una proteína de unión a antígeno en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. La proteína de unión a antígeno puede administrarse solo, o como parte de una composición farmacéutica.

Típicamente dichas composiciones comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable como se conoce y se denomina para la práctica farmacéutica aceptable, véase, por ejemplo, Remingtons Pharmaceutical Sciences, 16ª edición (1980) Mack Publishing Co. Los ejemplos de dichos vehículos incluyen vehículos esterilizados tales como solución salina, solución de Ringer o solución de dextrosa opcionalmente tamponada con tampones adecuados a un pH dentro de un intervalo de 5 a 8.

Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse por inyección o infusión continua (por ejemplo, intravenosa, intraperitoneal, intradérmica, subcutánea, intramuscular o intraportal). Dichas composiciones carecen

adecuadamente de sustancias de partículas visibles. Las composiciones farmacéuticas también pueden administrarse por vía oral, específicamente las que contienen CPHPC.

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender entre 1 mg a 10 g de proteínas de unión a antígeno, por ejemplo entre 5 mg y 1 g de proteína de unión a antígeno. Como alternativa, la composición puede comprender

entre 5 mg y 500 mg, por ejemplo, entre 5 mg y 50 mg.

Los expertos en la materia conocen bien procedimientos para la preparación de dichas composiciones farmacéuticas. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender entre 1 mg a 10 mg de proteína de unión a antígeno en forma de dosificación unitaria, opcionalmente junto con instrucciones para su uso. Las composiciones farmacéuticas pueden estar liofilizadas (deshidratadas por congelación) para la reconstitución antes de la administración de acuerdo con los procedimientos bien conocidos o evidentes para los expertos en la materia. Cuando los anticuerpos tienen un isotipo IgG1, puede añadirse un quelante de cobre, tal como citrato (por ejemplo citrato de sodio) o EDTA o histidina, a la composición farmacéutica para reducir el grado de degradación mediada por cobre de anticuerpos de este isotipo, véase el documento EP0612251. Las composiciones farmacéuticas también pueden comprender un solubilizante tal como base de arginina, un detergente/agente anti-agregación, tal como polisorbato 80 y un gas inerte tal como nitrógeno para sustituir el oxígeno del espacio de la cabeza del vial.

Generalmente, las dosis eficaces y los regímenes de tratamiento para administrar la proteína de unión a antígeno se determinan empíricamente y pueden depender de factores tales como la edad, el peso y el estado de salud del paciente y de la enfermedad o trastorno a tratar. Dichos factores se encuentran dentro del campo de actuación del médico tratante. Pueden encontrarse directrices para la selección de dosis apropiadas, por ejemplo, en Smith y col (1977) *Antibodies in human diagnosis and therapy*, Raven Press, New York.

La dosificación de proteína de unión a antígeno administrada a un sujeto es generalmente entre 1 µg/kg a 150 mg/kg, entre 0,1 mg/kg y 100 mg/kg, entre 0,5 mg/kg y 50 mg/kg, entre 1 y 25 mg/kg o entre 1 y 10 mg/kg del peso corporal del sujeto. Por ejemplo, la dosis puede ser 10 mg/kg, 30 mg/kg o 60 mg/kg. La proteína de unión a antígeno puede administrarse por vía parenteral, por ejemplo, por vía subcutánea, intravenosa o intramuscular.

El compuesto reductor de SAP puede administrarse a una dosis de entre 0,1 mg/kg y 2 mg/kg, dependiendo de su actividad. El compuesto reductor de SAP puede administrarse como una dosis fija, independiente de una dosis por proporción de peso del sujeto. El compuesto reductor de SAP puede administrarse en una o más dosis individuales, parenterales simultáneas o secuenciales, de 100 mg o menos, de 50 mg o menos, 25 mg o menos, o 10 mg o menos.

Si se desea, la dosis diaria eficaz de una composición terapéutica puede administrarse como dos, tres, cuatro, cinco, seis o más subdosis administradas individualmente a intervalos apropiados a lo largo del día, opcionalmente, en formas de dosificación unitarias.

La proteína de unión a antígeno puede administrarse en una sola dosis grande o en dosis más pequeñas repetidas.

La administración de una dosis puede ser por infusión continua lenta durante un periodo de 2 a 24 horas, tal como de 2 a 12 horas, o de 2 a 6 horas. Esto puede dar como resultado efectos secundarios tóxicos reducidos.

La administración de una dosis puede repetirse una o más veces según sea necesario, por ejemplo, tres veces al día, una vez al día, una vez cada 2 días, una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez al mes, una vez cada 3 meses, una vez cada 6 meses o una vez al año. La proteína de unión a antígeno puede administrarse por terapia de mantenimiento, por ejemplo, una vez a la semana durante un periodo de 6 meses o más. La proteína de unión a antígeno puede administrarse por terapia intermitente, por ejemplo, durante un periodo de 3 a 6 meses y después no administrarse la dosis durante 3 a 6 meses, seguido de la administración de la proteína de unión a antígeno de nuevo durante 3 a 6 meses y así sucesivamente en un ciclo.

Por ejemplo, la dosis puede administrarse por vía subcutánea, una vez cada 14 o 28 días en forma de subdosis múltiples cada día de la administración.

La proteína de unión a antígeno puede administrarse al sujeto como una terapia diana en un sitio particular. Por ejemplo, la proteína de unión a antígeno puede inyectarse localmente en una masa amiloide local circunscrita en los tejidos, o infundirse en la sangre suministrándose a un órgano amiloidótico.

La proteína de unión a antígeno debe usarse en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticamente activos, especialmente compuestos reductores de SAP, para el tratamiento de las enfermedades descritas en este documento. La reducción eficaz de SAP de la circulación debe conseguirse antes de la administración de la proteína de unión a SAP con objeto de proporcionar más adelante seguridad y eficacia.

Primero se administra el compuesto reductor de SAP de manera que se elimine casi todo el SAP circulante. Dado que esto permite cantidades sustanciales de SAP asociadas con los depósitos amiloides en los tejidos la administración secuencial de una proteína de unión a antígeno anti-SAP permite la localización y la unión específica a los depósitos amiloides para promover su rápida y amplia regresión. De manera adecuada, la proteína de unión a

antígeno anti-SAP puede administrarse 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20 o 25 o más días después del comienzo del tratamiento (o tratamientos) con el compuesto reductor de SAP.

La administración secuencial puede implicar dos o más tratamientos secuenciales con compuestos reductores de SAP seguido de dos o más tratamientos secuenciales con la proteína de unión a antígeno anti-SAP.

- 5 La administración secuencial puede implicar un tratamiento con un compuesto reductor de SAP seguido de un tratamiento secuencial con la proteína de unión a antígeno anti-SAP, que después se repite una o más veces.

La dosis secuencial/posterior puede ser una cantidad que sea mayor que la dosis inicial/previa o menor que la dosis inicial/previa.

- 10 La administración de una dosis inicial de la proteína del compuesto reductor de SAP puede continuar con la administración de una o más dosis secuenciales (por ejemplo posteriores) del compuesto reductor de SAP y/o proteína de unión a antígeno anti-SAP, y en el que dicha una o más dosis secuenciales pueden ser una cantidad que sea aproximadamente la misma o menor que la dosis inicial.

- 15 Después de la reducción inicial de SAP circulante, la administración de dosis posteriores del compuesto reductor de SAP y la primera dosis de anticuerpo anti-SAP se puede continuar administrando una o más dosis secuenciales (por ejemplo posteriores), y en el que al menos una de las dosis posteriores está en una cantidad que es mayor que la dosis inicial.

- 20 Por consiguiente, la administración puede usar un programa de administración predeterminado o rutinario, dando como resultado por lo tanto un periodo de tiempo denominado predeterminado entre las administraciones de las dosis. El programa puede incluir periodos de tiempo que son idénticos o que difieren en duración, siempre que el programa se predetermine. El programa puede incluir cualquier combinación particular siempre que se determine por adelantado ya que el programa apropiado implica la administración en un día determinado.

La composición farmacéutica puede comprender un kit de partes de la proteína de unión a antígeno junto con otros medicamentos, opcionalmente con instrucciones para su uso. Por comodidad, el kit puede comprender los reactivos en cantidades predeterminadas con instrucciones para su uso.

- 25 En el presente documento, los términos “individuo”, “sujeto” y “paciente” se usan indistintamente. El sujeto puede ser un primate (por ejemplo un titi o simio). El sujeto es típicamente un ser humano.

El tratamiento puede ser terapéutico, profiláctico o preventivo. El sujeto será uno que necesite el tratamiento. Los que necesitan el tratamiento pueden incluir individuos que ya padecen una enfermedad médica particular además de aquellos que pueden desarrollar la enfermedad en el futuro.

- 30 Por tanto, para el tratamiento profiláctico o preventivo, puede usarse el compuesto reductor de SAP seguido por la proteína de unión a antígeno SAP descrita en este documento. En este caso, los tratamientos secuenciales descritos en este documento se administran a un individuo con objeto de impedir o retrasar la aparición de uno o más aspectos o síntomas de la enfermedad. El sujeto puede ser asintomático o puede tener una predisposición genética para la enfermedad, ya que se sabe que los depósitos amiloides se presentan en los tejidos y se acumulan durante periodos de tiempo antes de que causen el daño suficiente para producir los síntomas clínicos. Dicha deposición amiloide subclínica puede detectarse por examen histológico de biopsias de tejidos o por procedimientos no invasivos de formación de imágenes, que incluyen gammagrafía con SAP marcado radiactivamente, ecocardiografía y formación de imagen por resonancia magnética cardíaca. Después de la primera reducción de SAP circulante, a dicho individuo se le administra una cantidad profilácticamente eficaz de la proteína de unión a antígeno. Una cantidad profilácticamente eficaz es una cantidad que impide o retrasa la aparición de uno más aspectos o síntomas de una enfermedad descrita en el presente documento.

- 45 La proteína de unión a antígeno descrita en el presente documento también puede usarse en procedimientos de terapia. El término “terapia” incluye alivio, reducción o prevención de al menos un aspecto o síntoma de una enfermedad. Por ejemplo, la proteína de unión a antígeno descrita en el presente documento puede usarse para mejorar o reducir uno o más aspectos o síntomas de una enfermedad descrita en el presente documento.

- 50 La proteína de unión a antígeno descrita en el presente documento se usa en una cantidad eficaz para el tratamiento terapéutico, profiláctico o preventivo. Una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de unión a antígeno descrita en el presente documento es una cantidad eficaz para mejorar o reducir uno o más aspectos o síntomas de la enfermedad. El anticuerpo descrito en el presente documento también puede usarse para tratar, prevenir o curar la enfermedad descrita en el presente documento.

La proteína de unión a antígeno descrita en el presente documento puede tener un efecto generalmente beneficioso sobre la salud del sujeto, por ejemplo puede aumentar la longevidad esperada del sujeto.

La proteína de unión a antígeno descrita en el presente documento no tiene por qué afectar a una curación completa o erradicar cada síntoma o manifestación de la enfermedad para constituir un tratamiento terapéutico viable. Como

se reconoce en el campo en cuestión, los fármacos empleados como agentes terapéuticos pueden reducir la gravedad de una patología determinada, pero no es necesario que eliminen cada manifestación de la enfermedad para considerarse como agentes terapéuticos útiles. De manera similar, no es necesario que un tratamiento administrado profilácticamente sea completamente eficaz evitando la aparición de una enfermedad con objeto de constituir un agente profiláctico viable. Basta con reducir simplemente el impacto de una enfermedad (por ejemplo, reducir el número o la gravedad de sus síntomas, o aumentar la eficacia de otro tratamiento, o producir otro efecto beneficioso) o reducir la probabilidad de que se produzca la enfermedad (por ejemplo retrasando la aparición de la enfermedad) o el empeoramiento en un sujeto.

Las proteínas de unión a antígeno descritas en el presente documento pueden usarse en el tratamiento o prevención de una enfermedad asociada con la deposición amiloide, es decir, amiloidosis.

La "amiloidosis" es cualquier enfermedad caracterizada por la acumulación extracelular de amiloide en diversos órganos y tejidos del cuerpo.

El término "amiloide" se refiere a depósitos extracelulares en los tejidos de fibras de proteínas insolubles compuestas de fibrillas con morfología ultra estructural característica, una estructura de núcleo de lámina β -cruzada y la propiedad tintórea histoquímica patognomónica de unión al colorante rojo Congo a partir de una solución alcohólica alcalina y después proporcionando dicroísmo rojo-verde cuando se observa microscópicamente con luz fuertemente cruzada polarizada. Se conocen aproximadamente 25 proteínas diferentes no relacionadas que forman las fibrillas amiloides con depósitos en tejidos humanos y todas comparten estas propiedades típicas. Los depósitos amiloides en la sustancia cerebral, amiloide cerebral, difieren un poco de los depósitos amiloides en cualquier otra parte en el cuerpo en que son siempre focales y microscópicos de tamaño y se conocen normalmente como placas amiloides.

La amiloidosis, que es una enfermedad directamente ocasionada por la deposición de amiloide en los tejidos, comprende tanto amiloidosis local, en la que los depósitos están dentro de una región anatómica y/o de un sistema tisular u orgánico como amiloidosis sistémica en la que los depósitos pueden producirse en cualquier órgano o tejido del cuerpo, incluyendo los vasos sanguíneos y tejido conjuntivo. La causa de la amiloidosis puede ser adquirida o hereditaria. La amiloidosis adquirida se presenta como una complicación de una afección médica anterior, que de por sí puede adquirirse o heredarse. Por tanto, la amiloidosis sistémica reactiva, conocida como tipo de proteína amiloide A (AA) es una complicación de enfermedades inflamatorias activas crónicas, tales como artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, enfermedad de Crohn, infecciones crónicas y septicemia crónica, y de síndromes febriles periódicos hereditarios tales como la fiebre Mediterránea familiar, el síndrome de Muckle-Wells y el síndrome CINCA. La amiloidosis relacionada con diálisis está producida por la acumulación de β 2-microglobulina como un resultado de fallo renal terminal. La amiloidosis de cadena ligera (AL) de inmunoglobulina monoclonal es una complicación de mieloma múltiple o de otra manera gammapatía monoclonal benigna (gammapatía monoclonal de significado incierto, GMSI). La amiloidosis adquirida de tipo transtirretina puede producirse sin ninguna dolencia anterior y simplemente es una complicación relacionada con la vejez. La amiloidosis hereditaria está producida por mutaciones en los genes de diversas proteínas que codifican la expresión de proteínas variantes que tienen una propensión aumentada a formar fibrillas amiloides e incluye enfermedades causadas por transtirretina, apolipoproteína AI, gelsolina, lisozima, cistatina C y proteína β amiloide. La comprensión de las descripciones de todas las formas de amiloidosis distintas y las proteínas implicadas se encuentra disponible en los libros de texto y en la bibliografía científica (Pepys, M.B. (2006) *Annu. Rev. Med.*, 57: 223-241; Pepys and Hawkins (2003) *Amyloidosis*. Oxford Textbook of Medicine, 4th Ed., Vol. 2, Oxford University Press, Oxford, pp. 162-173; Pepys and Hawkins (2001) *Amyloidosis*. Samter's Immunologic Diseases, Sixth Ed., Vol. 1, Lippincott Williams & Williams, Philadelphia, pp. 401-412).

La deposición amiloide local, dentro de un órgano o tejido, puede silenciarse clínicamente o puede producir lesión tisular y enfermedades graves. Por ejemplo, la angiopatía cerebral amiloide, en la que los depósitos amiloides vasculares están compuestos por proteína $A\beta$, es normalmente una afección esporádica adquirida que surge debido a razones que no se comprenden en ausencia de cualquier otra patología, y es una causa principal de hemorragia e ictus cerebral. Existen diversas enfermedades comunes muy importantes, particularmente la enfermedad de Alzheimer (AD) y la diabetes de tipo 2, en las que los depósitos amiloides están siempre presentes pero en las que aún se desconocen los mecanismos exactos causantes de estas enfermedades respectivas. Sin embargo, la deposición local de amiloide en el cerebro y en los vasos sanguíneos cerebrales en la enfermedad de Alzheimer y en los islotes pancreáticos en la diabetes es muy probable que agrave la patología y la enfermedad. Por consiguiente, la presente memoria descriptiva describe el tratamiento tanto de la enfermedad de Alzheimer como el de la diabetes de tipo 2, además de cualquier afección asociada con la presencia de depósitos amiloides en los tejidos, con las proteínas de unión a antígeno como se desvela en el presente documento.

Muchas formas de encefalopatía espongiiforme transmisible (enfermedades priónicas) están asociadas con los depósitos amiloides en el cerebro y por lo tanto, la presente invención está relacionada con todas estas afecciones, que incluyen la variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob en seres humanos, la propia enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, kuru y otras formas diversas de enfermedades priónicas humanas, y también encefalopatía bovina espongiiforme, enfermedad debilitante crónica del ciervo-mula y alce y encefalopatía transmisible del visón.

Procedimientos de uso diagnóstico

La proteína de unión a antígeno descrita en el presente documento puede usarse para detectar SAP en una muestra biológica *in vitro* o *in vivo* con fines diagnósticos. Por ejemplo, las proteínas de unión a antígeno anti-SAP pueden usarse para detectar SAP en suero o asociado a amiloide, por ejemplo, en placas amiloideas. El amiloide puede haberse extraído en primer lugar (por ejemplo una biopsia) del cuerpo de un ser humano o de un animal. Pueden emplearse inmunoensayos convencionales, que incluyen ELISA, transferencia de Western, inmunohistoquímica o inmunoprecipitación.

Las proteínas de unión a antígeno pueden proporcionarse en un kit de diagnóstico que comprende una o más proteínas de unión a antígeno, un marcador de selección e instrucciones para el uso del kit. Por comodidad, el kit puede comprender los reactivos en cantidades predeterminadas con instrucciones para su uso.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Secuenciación de dominios Variables de Hibridoma: SAP-E y SAP-K

SAP-E y SAP-K pertenecen a dos grupos anti-SAP monoclonales, habiéndose ensayado cada grupo individualmente para determinar su unión a SAP humano *in vitro*. SAP-E y SAP-K mostraron la unión más fuerte a SAP, dentro de sus grupos y cuando se compararon entre sí en diferentes ensayos.

El primer grupo de anticuerpos comprende anticuerpos de 7 hibridomas generados en una sola inmunización convencional con SAP humano purificado (SEQ ID NO: 43 mostrada a continuación) (en Hawkins y *col.* (1991) Clin. Exp. Immunol. 84, 308-316 se proporcionan detalles del procedimiento para purificar SAP humano) y protocolo de fusión y se denominaron SAP-A a SAP-G. Dos de estos anticuerpos SAP-E y SAP-B, son del isotipo IgG2a mientras que los otros son todos del isotipo IgG1 (véase el Ejemplo 13, Tabla 11).

El segundo grupo de anticuerpos comprende 6 IgG2a monoclonales distintos (SAP-H a SAP-M) derivados por técnicas convencionales de inmunización con SAP humano purificado (SEQ ID NO: 43 mostrada a continuación) (Hawkins y *col.* (1991) Clin. Exp. Immunol. 84, 308-316) y una fusión convencional para producir hibridomas que se clonaron por procedimientos rutinarios.

Secuencia de aminoácidos madura de SAP de *Homo sapiens* (SEQ ID NO: 43)

HTDLSGKVFVFPRESVTDHVNLTPLKPLQNFTLCFRAYSDSLRSYSLFSYNTQGRDNELLVYKERVGEYS
LYIGRHKVTSKVIKFPAPVHICVSWESSSGIAEFWINGTPLVKKGLRQGYFVEAQPKIVLGQEQDSYGGK
FDRSQSFVGEIGDLYMWDSVLPPENILSAYQGTPLPANILDWQALNIEIRGYVIKPLVWV

Con fines comparativos, a continuación se proporciona la secuencia de SAP de ratón, que tiene una identidad del 69,4% con el SAP humano.

Proteína madura de SAP de *Mus musculus* (SEQ ID NO: 44)

QTDLKRKVFVFPRESETHVVKLIPHLKPLQNFTLCFRYSDSLRSQSLFSYSVKGRDNELLYKEKVGEYSLY
IGQSKVTVRGMEEYLSPVHLCTTWESSGIVEFWVNGKPWWKSLQREYTVKAPPSIVLGQEQDNYGG
GFQRSQSFVGEFSDLYMWWDYVLTQDILFVYRDSVPNPNILNWQALNIEINGYVIRPRVW

Se extrajo ARN total de sedimentos celulares de hibridoma de aproximadamente 10⁶ usando el kit RNeasy de Qiagen (Nº 74106). Se usó el Sistema RT-PCR AccessQuick (A1702) para producir el ADNc de las regiones variables pesada y ligera usando cebadores degenerados específicos para las secuencias líder del gen de inmunoglobulina murino y para las regiones constantes de IgG2a/κ murinas. Los fragmentos de la RT-PCR purificados se clonaron usando el kit de clonación TA de Invitrogen (K2000-01). Para cada hibridoma se obtuvo una secuencia consenso por alineamiento de secuencias y alineamiento con secuencias variables de inmunoglobulina conocidas indicadas en KABAT (Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4ª Ed., U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987)). A continuación se muestran las secuencias consenso para SAP-E y SAP-K.

Secuencias de SAP-E

CDRH1 de SAP-E (SEQ ID NO: 1)
TYNMH

CDRH2 de SAP-E (SEQ ID NO: 2)
YIYPGDGNANYNQFKG

CDRH3 de SAP-E (SEQ ID NO: 3)
GDFDYDGGYYFDS

CDRL1 de SAP-E (SEQ ID NO: 4)
RASENIYSYLA

5 CDRL2 de SAP-E (SEQ ID NO: 5)
NAKTLAE

CDRL3 de SAP-E (SEQ ID NO: 6)
QHGYGAPLT

Secuencia de aminoácidos de V_H de SAP-E (SEQ ID NO: 7) con las CDR subrayadas

QASLQQSGTELVRS GASVKMSCKASGFTFATYNMHWIKQTPGQGLEWIGYIYPGDGNANYNQQFKGK
10 **ATLTADTSSNTAYMQISSLTSEDSAVYFCARGD****FDYDGGYYFDS****SWGQGTTLTVSS**

Secuencia de ADN de V_H de SAP-E (SEQ ID NO: 8)

CAGGCTTCTCTACAGCAGTCTGGGACTGAGCTGGTGAGGTCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCCTGC
AAGGCTTCTGGCTTCACATTTGCCACTTACAATATGCACTGGATTAAGCAGACACCCGGACAGGGCC
TGGAATGGATTGGGTATATTTATCCTGGAGATGGTAATGCTAACTACAATCAGCAGTTCAAGGGCAA
GGCCACATTGACTGCAGACACATCCTCCAACACAGCCTACATGCAGATCAGCAGCCTGACATCTGAA
GACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGAGGGGACTTTGATTACGACGGAGGGTACTACTTTGACTCCT
GGGGCCAGGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

Secuencia de aminoácidos de V_L de SAP-E (SEQ ID NO: 9) con las CDR subrayadas

DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIYSYLAWYQQKQGRSPQLLVHNAKTLAEGVPSRVSGSGSGTH
FSLKINGLQPEDFGNYQC**QHGYGAPLTF****GAGTKLELK**

15 Secuencia de ADN de V_L de SAP-E (SEQ ID NO: 10)

GACATCCAGATGACTCAGTCTCCAGCCTCCCTATCTGCATCTGTGGGAGAACTGTCACCATCACATG
TCGAGCAAGTGAGAATATTTACAGTTATTTAGCATGGTATCAGCAGAAACAGGGAAGATCCCCTCAG
CTCCTGGTCCATAATGCAAAAACCTTAGCAGAAGGTGTGCCATCAAGGGTCAGTGGCAGTGGATCA
GGCACACACTTTTCTCTGAAGATCAACGGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGGGAATTATTACTGTCAAC
ATCATTATGGTGCTCCGCTCACGTTCCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAAGTGAAG

Secuencias de SAP-K

CDRH1 de SAP-K (SEQ ID NO: 11)
SYWMH

20 CDRH2 de SAP-K (SEQ ID NO: 12)
MIHPNSVNTNYNEKFKS

CDRH3 de SAP-K (SEQ ID NO: 13)
RNDYYWYFDV

25 CDRL1 de SAP-K (SEQ ID NO: 14)
KASQNVNSNVA

CDRL2 de SAP-K (SEQ ID NO: 15)
SASYRYS

CDRL3 de SAP-K (SEQ ID NO: 16)
QQCNYPFT

30 Secuencia de aminoácidos de V_H de SAP-K (SEQ ID NO: 17) con las CDR subrayadas

QVQLQQPGAELIKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGMIHPNSVNTNYNEKFKSK
ATLTVDKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYYCARRNDYYWYFDVWGTGTTVTSS

Secuencia de ADN de V_H de SAP-K (SEQ ID NO: 18)

CAGGTCCAAGTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTGATAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAA⁶TTGTCTGC
AAGGCTTCTGGCTACACTTTCACCAGCTACTGGATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAAGGC
CTTGAGTGGATTGGAATGATTCATCTAATAGTGTTAATACTAACTACAATGAGAAGTTCAAGAGTA
AGGCCACACTGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTCAACAGCCTGACATCTGA
GGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGACGGAATGATTACTACTGGTACTTCGATGTCTGGGGCACA
GGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

Secuencia de aminoácidos de V_L de SAP-K (SEQ ID NO: 19) con las CDR subrayadas

DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVNSNVAWYQQKPGQSPKALIYSASYRYS⁶GVPDRFTGSGSG
5 TDFTLTITNVQSEDLAEYFCQQCNNYPFTFGSGTKLEIK

Secuencia de ADN de V_L de SAP-K (SEQ ID NO: 20)

GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCT
GCAAGGCCAGTCAGAATGTGAATTCTAATGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGGCAATCTCCTAA
AGCACTGATTTACTCGGCTTCCTACCGGTACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCT
GGGACAGATTTCACTCTCACCATCACCAATGTGCAGTCTGAAGACTTGGCAGAGTATTTCTGTCAGC
AATGTAACAACATATCCATTCACGTTCCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAAA

Ejemplo 2: Construcción de anticuerpos quiméricos

- 10 Se construyeron anticuerpos quiméricos, que comprendían dominios variables murinos parentales injertados sobre regiones constantes de tipo silvestre de IgG1/κ humana por PCR clonando SAP-E y SAP-K. Basándose en la secuencia consenso, se diseñaron cebadores para amplificar los dominios variables murinos, incorporando sitios de restricción necesarios para facilitar la clonación en vectores de expresión mamíferos. Por medio de la introducción del sitio de restricción en FR4 (región marco conservada 4 (secuencia de región V a continuación de CDR3 y anterior al primer dominio constante)) la secuencia de aminoácidos de V_H en SAP-E se cambió de TTLTVSS, como se muestra en la SEQ ID NO: 7, a TLVTVSS y la secuencia de aminoácidos de V_H en SAP-K se cambió de TTVTVSS, como se muestra en la SEQ ID NO: 17, a TLVTVSS. En la cadena ligera variable de SAP-K había un sitio interno EcoRI en la CDRL1 y se diseñaron cebadores de mutagénesis para eliminar este sitio interno EcoRI no deseado cambiando un par de bases - esto no cambió la secuencia de aminoácidos.
- 15

- 20 Las secuencias de proteína de cadena pesada y ligera de longitud completa del anticuerpo quimérico SAP-E (cSAP-E) se proporcionan en la SEQ ID NO: 21 y en la SEQ ID NO: 22 respectivamente. Las secuencias de proteína de cadena pesada y ligera de longitud completa de anticuerpo quimérico SAP-K (cSAP-K) se proporcionan en la SEQ ID NO: 23 y SEQ ID NO: 24 respectivamente.

Secuencia de nucleótidos quimera de VH de SAP-E (SEQ ID NO: 45)

CAGGCTTCTCTACAGCAGTCTGGGACTGAGCTGGTGAGGTCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCCTGC
AAGGCTTCTGGCTTCACATTTGCCACTTACAATATGCACTGGATTAAGCAGACACCCGGACAGGGCC
TGGAATGGATTGGGTATATTTATCCTGGAGATGGTAATGCTAACTACAATCAGCAGTTCAAGGGCAA
GGCCACATTGACTGCAGACACATCCTCCAACACAGCCTACATGCAGATCAGCAGCCTGACATCTGAA
GACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGAGGGGACTTTGATTACGACGGAGGGTACTACTTTGACTCCT
GGGGCCAGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCCCTGG
CCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCC
CCGAACCGGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCG
TGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCAGCAGCAGCCTGGGC
AGCCAGACCTACATCTGTAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAG
CCCAAGAGCTGTGACAAGACCCACACCTGCCCCCCTGCCCTGCCCCGAGCTGCTGGGAGGCCCA
GCGTGTTCTGTTCCCCCAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTG
TGTTGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCTGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGG
AGGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCC
GTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTGTCCAACAAG
GCCCTGCCTGCCCCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCCCAGGTG
TACACCCTGCCCCCTAGCAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAG
GGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCAGAGCAACTACAA
GACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAG
AGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTGAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTAC
ACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCTGGCAAG

Secuencia de aminoácidos quimera de VH de SAP-E (SEQ ID NO: 21)

QASLQQSGTELVRSVASVKMSCKASGFTFATYNMHWIKQTPGQGLEWIGYIYPGDGNANYNQFKGK
ATLTADTSSNTAYMQISSLTSEDSAVYFCARGDFDYDGGYYFDSWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSS
KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVN
HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
5 SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Secuencia de nucleótidos quimera de VL de SAP-E (SEQ ID NO: 46)

GACATCCAGATGACTCAGTCTCCAGCCTCCCTATCTGCATCTGTGGGAGAACTGTCACCATCACATG
TCGAGCAAGTGAGAATATTTACAGTTATTTAGCATGGTATCAGCAGAAACAGGGAAGATCCCCTCAG
CTCCTGGTCCATAATGCAAAAACCTTAGCAGAAGGTGTGCCATCAAGGGTCAGTGGCAGTGGATCA
GGCACACACTTTTCTCTGAAGATCAACGGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGGGAATTATTACTGTCAAC
ATCATTATGGTGCTCCGCTCACGTTCCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAAGTGAACGTACGGTGGCCG
CCCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGATGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGT
GTCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAATGCCCTGCAGA
GCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGC
ACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAG
GGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGC

Secuencia de aminoácidos quimera de VL SAP-E (SEQ ID NO: 22)

DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIYSYLAQYQKQGRSPQLLVHNAKTAEVPSRVSGSGSGTH
FSLKINGLQPEDFGNYCQHHYGAPLTFGAGTKLELRKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP
REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR
GEC

Secuencia de nucleótidos quimera de VH de SAP-K (SEQ ID NO: 47)

CAGGTCCAAGTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTGATAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGTTGCCTGC
AAGGCTTCTGGCTACACTTTACACAGCTACTGGATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAAGGC
CTTGAGTGGATTGGAATGATTATCCTAATAGTGTTAATACTAACTACAATGAGAAGTTCAAGAGTA
AGGCCCACTGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTCAACAGCCTGACATCTGA
GGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGACGGAATGATTACTACTGGTACTTCGATGTCTGGGGCACA
GGGACACTAGTGACCGTGTCCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGC
AGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAACCG
5 GTGACCGTGTCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAG
AGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGAC
CTACATCTGTAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGA
GCTGTGACAAGACCCACACCTGCCCCCCTGCCCTGCCCCGAGCTGCTGGGAGGCCCCAGCGTGT
CCTGTTCCCCCAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGTGTGGTG
GTGGATGTGAGCCACGAGGACCCTGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA
CAATGCCAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGAC
CGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGTAAAGGTGTCAACAAGGCCCTGCC
TGCCCCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCCCAGGTGTACACCTT
GCCCCCTAGCAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTA
CCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACCTACAAGACCACCC
CCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGAT
GGCAGCAGGGCAACGTGTTCACTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACCCAGA
AGAGCCTGAGCCTGTCCCCTGGCAAG

Secuencia de aminoácidos quimera de VH de SAP-K (SEQ ID NO: 23)

QVQLQQPGAELIKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGMIHPNSVNTNYNEKFKSK
ATLTVDKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYYCARRNDYYWYFDVWGTGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST
SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP
SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Secuencia de nucleótidos quimera de VL de SAP-K VL (SEQ ID NO: 48)

GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCT
GCAAGGCCAGTCAGAATGTGAACTCTAATGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGGCAATCTCCTA
AAGCACTGATTTACTCGGCTTCTACCGGTACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATC
TGGGACAGATTTCACTCTACCATCACCAATGTGCAGTCTGAAGACTTGGCAGAGTATTTCTGTCAG
CAATGTAACAACTATCCATTACGTTCTGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAAACGTACGGTGGCC
GCCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGATGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTG
TGTCTGCTGAACAACCTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGAAGGTGGACAATGCCCTGCAG
AGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAG
CACCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCA
5 GGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGC

Secuencia de aminoácidos quimera de VL de SAP-K (SEQ ID NO: 24)

DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVNSNVAWYQQKPGQSPKALIYSASYRYSVGPDRFTGSGSG
TDFTLTITNVQSEDLAEYFCQQCNYPFTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY
PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN
RGEC

Ejemplo 3: Estrategia de Humanización

- 10 Se generaron anticuerpos humanizados mediante un proceso de injertación de CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 y CDRL3 del anticuerpo murino sobre una secuencia de la región marco conservada humana adecuada.

Estrategia de Humanización de SAP-E

Humanización de la cadena pesada de SAP-E

- 15 Para la secuencia de la cadena pesada variable de ratón de SAP-E se seleccionó una región marco conservada aceptora de la línea germinal humana (IGHV1-69, SEQ ID NO: 25) que tenía una identidad del 60% (incluyendo las CDR) con la secuencia de la cadena pesada variable de SAP-E de ratón (SEQ ID NO: 7) junto con el minigen JH1 (Kabat: AEYFQHWGQGTSLTVSS (SEQ ID NO: 26)). Los primeros seis restos de los restos del minigen JH1 estaban dentro de la región CDR3 y se sustituyeron por la CDR procedente del anticuerpo donante.

- 20 Se generaron cinco variantes humanizadas en base a la comparación de secuencias y posible impacto sobre la función del anticuerpo. La construcción H0 era un injerto lineal de las CDR murinas (usando la definición de Kabat) en la región marco conservada aceptora humana seleccionada anteriormente. La construcción H1 tenía

retromutaciones adicionales en los restos 27 y 30. Las construcciones H2 y H3 se basaron en H1 con retromutaciones adicionales en los restos 2 (H2) y 48 y 67 (H3). La construcción H4 se basó en H3 con retromutaciones adicionales en los restos 69, 73 y 91. Véase la Tabla 3.

5 A continuación se proporcionan las secuencias de los dominios pesados variables humanizados de H0, H1, H2, H3 y H4 (SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28 SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30 y SEQ ID NO: 31 respectivamente).

Tabla 3: Resumen de variantes generadas de VH humanizadas de SAP-E

<u>Construcción</u>	<u>Región marco conservada aceptora/molde</u>	<u>Retromutaciones en el aa n° (Kabat)</u>	<u>Número total de retromutaciones</u>	<u>Región marco conservada aceptora/humana</u>	<u>Secuencia original de ratón</u>
<u>H0 (SEQ ID NO: 27)</u>	IGHV-69 (SEQ ID NO: 25)	----	NINGUNA	----	----
<u>H1 (SEQ ID NO: 28)</u>	H0	27 30	2	G S	F A
<u>H1 (SEQ ID NO: 29)</u>	H1	2	3	V	A
<u>H2 (SEQ ID NO: 30)</u>	H1	48 67	4	M V	I A
<u>H4 (SEQ ID NO: 31)</u>	H3	69 73 91	7	I K Y	L T F

Humanización de la cadena ligera de SAP-E

10 Para la secuencia de la cadena ligera variable de ratón de SAP-E se seleccionó una región marco conservada aceptora de la línea germinal humana (IGKV1-39, SEQ ID NO: 32) que tenía un 68% de identidad (incluyendo las CDR) con la secuencia de la cadena ligera variable de SAP-E de ratón (SEQ ID NO: 9) junto con el minigen kappa 2 de la región J (Kabat: YTFGQGKLEIK, SEQ ID NO: 33)) basándose en la similitud de secuencia. Los dos primeros restos de los restos del minigen JK-2 están dentro de la región CDR3 y se sustituyeron por la CDR procedente del anticuerpo donante.

15 Se generaron tres variantes humanizadas en base a la comparación de secuencias y posible impacto sobre la función del anticuerpo. La construcción de L0 era un injerto lineal de las CDR murinas (usando la definición de Kabat) en la región marco conservada aceptora humana seleccionada anteriormente. La construcción L1 tenía una retromutación en el resto 49 y la construcción L2 tenía retromutaciones en las posiciones 48 y 49. Véase la Tabla 4.

A continuación se proporcionan las secuencias de los dominios ligeros variables humanizados de L0, L1 y L2 (SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35 y SEQ ID NO: 36 respectivamente).

20

Tabla 4: Resumen de variantes generadas de VL humanizadas de SAP-E

<u>Construcción</u>	<u>Región marco conservada aceptora/molde</u>	<u>Retromutaciones en el aa n° (Kabat)</u>	<u>Número total de retromutaciones</u>	<u>Región marco conservada aceptora/humana</u>	<u>Secuencia original de ratón</u>
<u>L0 (SEQ ID NO: 34)</u>	IGKV1-39 (SEQ ID NO: 32)	-----	NINGUNA	----	-----
<u>L1 (SEQ ID NO: 35)</u>	L0	49	1	Y	H
<u>L2 (SEQ ID NO: 36)</u>	L1	48 49	2	I Y	V H

Estrategia de Humanización de SAP-KHumanización de la cadena pesada de SAP-K

Para la secuencia de la cadena pesada variable de ratón de SAP-K se seleccionó una región marco conservada aceptora de la línea germinal humana (IGHV1-69, SEQ ID NO: 25) que tenía un 65% de identidad (incluyendo las CDR) con la secuencia de la cadena pesada variable de SAP-K de ratón (SEQ ID NO: 17) junto con el minigen JH1 (Kabat: AEYFQHWGQGTLTVSS (SEQ ID NO: 26)). Los seis primeros restos del minigen JH1 estaban dentro de la región CDR3 y se sustituyeron por las CDR procedentes del anticuerpo donante.

Se generaron cuatro variantes humanizadas basándose en la comparación de secuencia y posible impacto sobre la función de anticuerpo. La construcción H0 era un injerto lineal de las CDR murinas (usando la definición de Kabat) en la región marco conservada aceptora humana seleccionada anteriormente. La construcción H1 tenía retromutaciones adicionales en los restos 27 y 30. La construcción H2 se basó en H1 con retromutaciones adicionales en los restos 48 y 67. La construcción H3 se basó en H2 con retromutaciones adicionales en los restos 69 y 71. Véase la Tabla 5.

A continuación se proporcionan las secuencias de los dominios pesados variables humanizados de H0, H1, H2 y H3 (SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39 y SEQ ID NO: 40 respectivamente).

Tabla 5: Resumen de variantes generadas de VH humanizadas de SAP-K

<u>Construcción</u>	<u>Región marco conservada aceptora/molde</u>	<u>Retromutaciones en el aa n° (Kabat)</u>	<u>Número total de retromutaciones</u>	<u>Región marco conservada aceptora/humana</u>	<u>Secuencia original de ratón</u>
H0 (SEQ ID NO: 37)	IGHV1-69 (SEQ ID NO: 25)	-----	NINGUNA	----	-----
H1 (SEQ ID NO: 38)	H0	27 30	2	G S	Y T
H2 (SEQ ID NO: 39)	H1	48 67	4	M V	I A
H3 (SEQ ID NO: 40)	H2	69 71	6	I A	L V

Humanización de la cadena ligera de SAP-K

Para la secuencia de la cadena ligera variable de ratón de SAP-K se seleccionó una región marco conservada aceptora de la línea germinal humana (IGKV1-39, SEQ ID NO: 32) que tenía un 63% de identidad (incluyendo las CDR) con la secuencia de la cadena ligera variable de SAP-K de ratón (SEQ ID NO: 19) junto con el minigen kappa 2 de la región J (Kabat: YTFGQGTKLEIK, SEQ ID NO: 33) basándose en la similitud de secuencia. Los dos primeros restos de los restos del minigen Jκ-2 estaban dentro de región CDR3 y se sustituyeron por la CDR procedente del anticuerpo donante.

Se generaron dos variantes humanizadas basándose en la comparación de secuencia y posible impacto sobre la función del anticuerpo. La construcción L0 era un injerto lineal de las CDR murinas (usando la definición de Kabat) en la región marco conservada aceptora humana seleccionada anteriormente. La construcción L1 tenía una retromutación en el resto 46.

A continuación se proporcionan las secuencias de los dominios ligeros variables humanizados de L0 y L1 (SEQ ID NO: 41 y SEQ ID NO: 42 respectivamente).

Tabla 6: Resumen de variantes generadas de VL humanizadas de SAP-K

<u>Construcción</u>	<u>Región marco conservada aceptora/molde</u>	<u>Retromutaciones en el aa n° (Kabat)</u>	<u>Número total de retromutaciones</u>	<u>Región marco conservada aceptora/humana</u>	<u>Secuencia original de ratón</u>
L0 (SEQ ID NO: 41)	IGKV1-39 (SEQ ID NO: 32)	-----	NINGUNA	----	-----
L1 (SEQ ID NO: 42)	L0	46	1	L	A

Construcción de vectores de anticuerpos humanizados

Se optimizó la secuencia de las secuencias de ADN de la región variable humanizada. Los fragmentos de ADN que codifican las regiones variables ligera y pesada humanizada se construyeron de nuevo usando una estrategia basada en PCR y oligonucleótidos solapantes. El producto de la PCR se clonó en vectores de expresión mamíferos que contenían la región constante gamma 1 humana y la región constante kappa humana, respectivamente. Esta es la región Fc de tipo silvestre.

Secuencia aceptora de nucleótidos de la línea germinal de la cadena pesada variable humana IGHV1-69 (SEQ ID NO: 49)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTG
CAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGG
GCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACCTACGCACAGAAGTTCCAGGG
CAGAGTCACGATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATC
TGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA

Secuencia aceptora de aminoácidos de la línea germinal de la cadena pesada variable humana IGHV1-69 (SEQ ID NO: 25)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPFGTANYAQKFQGRV
TITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR

Secuencia aceptora de nucleótidos de la línea germinal de la cadena pesada variable humana IGKV1-39 (SEQ ID NO: 50)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTG
CCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAA
GCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCT
GGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACA
GAGTTACAGTACCCCT

Secuencia aceptora de aminoácidos de la línea germinal de la cadena pesada variable humana IGKV1-39 (SEQ ID NO: 32)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDF
TLTISSLQPEDFATYYCQSYSTP

Minigen JH1 (SEQ ID NO: 26)

AEYFQHWGQGLTVTVSS

Minigen Jκ2 (SEQ ID NO: 33)

YTFGQGTKLEIK

Secuencia de nucleótidos de H0 de la variante de la región V de cadena pesada humanizada de SAP-E no optimizada por codones (SEQ ID NO: 51)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTG
CAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCACTTACAATATGCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGG
GCTTGAGTGGATGGGATATATTTATCCTGGAGATGGTAATGCTAACTACAATCAGCAGTTCAAGGGC
AGAGTCACGATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCT
GAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGGGACTTTGATTACGACGGAGGGTACTACTTTGAC
TCCTGGGGCCAGGGCACCTGGTCACCGTCTCCTCA

Secuencia de nucleótidos de L0 de la variante de la región V de cadena ligera humanizada de SAP-E no optimizada por codones (SEQ ID NO: 52)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTG
CCGAGCAAGTGAGAATATTTACAGTTATTTAGCATGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAA
GCTCCTGATCTATAATGCAAAAACCTTAGCAGAAGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCT
GGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACA
TCATTATGGTGTCTCCGCTCACGTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA

5 Secuencia de nucleótidos de H0 de la variante de la región V de cadena pesada humanizada SAP-E (optimizada por codones) (SEQ ID NO: 53)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCCGAGGTGAAGAAACCCGGCAGCAGCGTGAAGGTGAGCT
GCAAGGCTAGCGGGGGCACCTTCTCCACCTACAACATGCACTGGGTCAAGCAGGCACCCGGCCAGG
GCCTGGAGTGGATGGGCTATATCTACCCCGGCGACGGCAACGCCAACTACAACCAGCAGTTCAAGG
GCAGGGTGACCATCACCGCCGACAAGAGCACCAGCACCGCCTACATGGAAGTGAAGCAGCCTGAGG
AGCGAGGATACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGGCGACTTCGACTACGACGGCGGCTACTACTTC
GACAGCTGGGGACAGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGC

Secuencia de aminoácidos de H0 de la variante de la región V de cadena pesada humanizada SAP-E (SEQ ID NO: 27)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGTFSTYNMHWVRQAPGQGLEWMGYIYPGDGNANYNQQFK
GRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGDFDYDGGYYFDSWGQGLTVTVSS

10 Secuencia de nucleótidos de H1 de la variante de la región V de cadena pesada humanizada SAP-E (optimizada por codones) (SEQ ID NO: 54)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCCGAGGTGAAGAAACCCGGCAGCAGCGTGAAGGTGAGCT
GCAAGGCTAGCGGGTTACCTTCGCCACCTACAACATGCACTGGGTCAAGCAGGCACCCGGCCAGG
GCCTGGAGTGGATGGGCTATATCTACCCCGGCGACGGCAACGCCAACTACAACCAGCAGTTCAAGG
GCAGGGTGACCATCACCGCCGACAAGAGCACCAGCACCGCCTACATGGAAGTGAAGCAGCCTGAGG
AGCGAGGATACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGGCGACTTCGACTACGACGGCGGCTACTACTTC
GACAGCTGGGGACAGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGC

Secuencia de aminoácidos de H1 de la variante de la región V de cadena pesada humanizada de SAP-E (SEQ ID NO: 28)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGFTFATYNMHWVRQAPGQGLEWMGYIYPGDGNANYNQQFK
GRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGDFDYDGGYYFDSWGQGLTVTVSS

15 Secuencia de nucleótidos de H2 de la variante de la región V de cadena pesada humanizada de SAP-E (optimizada por codones) (SEQ ID NO: 55)

CAGGCGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCCGAGGTGAAGAAACCCGGCAGCAGCGTGAAGGTGAGCT
GCAAGGCTAGCGGGTTACCTTCGCCACCTACAACATGCACTGGGTCAAGCAGGCACCCGGCCAGG
GCCTGGAGTGGATGGGCTATATCTACCCCGGCGACGGCAACGCCAACTACAACCAGCAGTTCAAGG
GCAGGGTGACCATCACCGCCGACAAGAGCACCAGCACCGCCTACATGGAAGTGAAGCAGCCTGAGG
AGCGAGGATACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGGCGACTTCGACTACGACGGCGGCTACTACTTC
GACAGCTGGGGACAGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGC

Secuencia de aminoácidos de H2 de la variante de la región V de cadena pesada humanizada de SAP-E (SEQ ID NO: 29)

QAQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGFTFATYNMHWVRQAPGQGLEWMGYIYPGDGNANYNQFK
GRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGDFDYDGGYYFDSWGQGLTVTVSS

Secuencia de nucleótidos de H3 de la variante de la región V de cadena pesada humanizada de SAP-E (optimizada por codones) (SEQ ID NO: 56)

5

CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCCGAGGTGAAGAAACCCGGCAGCAGCGTGAAGGTGAGCT
GCAAGGCTAGCGGGTTCACCTTCGCCACCTACAACATGCACTGGGTGAGGCAGGCACCCGGCCAGG
GCCTGGAGTGGATCGGCTATATCTACCCCGGCGACGGCAACGCCAACTACAACCAGCAGTTCAAGG
GCAGGGCCACCATCACCGCCGACAAGAGCACCAGCACCAGCCTACATGGAAGTGAAGCAGCCTGAGGA
GCGAGGATACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGGCGACTTCGACTACGACGGCGGCTACTACTTCG
ACAGCTGGGGACAGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGC

Secuencia de aminoácidos de H3 de la variante de la región V de cadena pesada humanizada de SAP-E (SEQ ID NO: 30)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGFTFATYNMHWVRQAPGQGLEWIGYIYPGDGNANYNQFKG
RATITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGDFDYDGGYYFDSWGQGLTVTVSS

10 Secuencia de nucleótidos de H4 de la variante de la región V de cadena pesada humanizada de SAP-E (optimizada por codones) (SEQ ID NO: 57)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCCGAGGTGAAGAAACCCGGCAGCAGCGTGAAGGTGAGCT
GCAAGGCTAGCGGGTTCACCTTCGCCACCTACAACATGCACTGGGTGAGGCAGGCACCCGGCCAGG
GCCTGGAGTGGATCGGCTATATCTACCCCGGCGACGGCAACGCCAACTACAACCAGCAGTTCAAGG
GCAGGGCCACCCTGACCGCCGACACCAGCACCAGCACCAGCCTACATGGAAGTGAAGCAGCCTGAGGA
GCGAGGATACCGCCGTGTACTTCTGCGCCAGGGGCGACTTCGACTACGACGGCGGCTACTACTTCG
ACAGCTGGGGACAGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGC

Secuencia de aminoácidos de H4 de la variante de la región V de cadena pesada humanizada de SAP-E (SEQ ID NO: 31)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGFTFATYNMHWVRQAPGQGLEWIGYIYPGDGNANYNQFKG
RATLTADTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYFCARGDFDYDGGYYFDSWGQGLTVTVSS

15

Secuencia de nucleótidos de L0 de la variante de la región V de cadena ligera humanizada de SAP-E (optimizada por codones) (SEQ ID NO: 58)

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCTCACTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATTACC
TGCAGGGCCTCCGAGAACATCTACAGCTACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCC
AAGCTGCTGATCTACAACGCCAAGACCCTCGCCGAGGGCGTCCCTAGCAGGTTCTCTGGAAGCGGC
AGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTATTACTGCC
AGCACCCTACGGCGCCCCCTGACCTTTGGCCAGGGCACCAAAGTGGAGATCAAG

20 Secuencia de aminoácidos de L0 de la variante de la región V de cadena ligera humanizada de SAP-E (SEQ ID NO: 34)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASENIYSYLAUWYQQKPGKAPKLLIYNAKTLAEGVPSRFSGSGSGTDF
TLTISSLQPEDFATYYCQHHYGAPLTFGQGKLEIK

Secuencia de nucleótidos de L1 de la variante de la región V de cadena ligera humanizada de SAP-E (optimizada por codones) (SEQ ID NO: 59)

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCTCACTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATTACC
TGCAGGGCCTCCGAGAACATCTACAGCTACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCC
AAGCTGCTGATCCACAACGCCAAGACCCTCGCCGAGGGCGTCCCTAGCAGGTTCTCTGGAAGCGGC
AGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTATTACTGCC
AGCACCACTACGGCGCCCCCTGACCTTTGGCCAGGGCACCAAACTGGAGATCAAG

5 Secuencia de aminoácidos de L1 de la variante de la región V de cadena ligera humanizada de SAP-E (SEQ ID NO: 35)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASENIYSYLAUWYQQKPGKAPKLLIHNAKTLAEGVPSRFSGSGSGTDF
TLTISSLQPEDFATYYCQHHYGAPLTFGQGKLEIK

Secuencia de nucleótidos de L2 de la variante de la región V de cadena ligera humanizada de SAP-E (optimizada por codones) (SEQ ID NO: 60)

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCTCACTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATTACC
TGCAGGGCCTCCGAGAACATCTACAGCTACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCC
AAGCTGCTGGTGCACAACGCCAAGACCCTCGCCGAGGGCGTCCCTAGCAGGTTCTCTGGAAGCGGC
AGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTATTACTGCC
AGCACCACTACGGCGCCCCCTGACCTTTGGCCAGGGCACCAAACTGGAGATCAAG

10 Secuencia de aminoácidos de L2 de la variante de la región V de cadena ligera humanizada de SAP-E (SEQ ID NO: 36)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASENIYSYLAUWYQQKPGKAPKLLVHNAKTLAEGVPSRFSGSGSGTD
FTLTISSLQPEDFATYYCQHHYGAPLTFGQGKLEIK

15 Secuencia madura completa de nucleótidos de H1 de cadena pesada humanizada de SAP-E (optimizada por codones) (SEQ ID NO: 61)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCCGAGGTGAAGAAACCCGGCAGCAGCGTGAAGGTGAGCT
 GCAAGGCTAGCGGGTTCACCTTCGCCACCTACAACATGCACTGGGTGAGGCAGGCACCCGGCCAGG
 GCCTGGAGTGGATGGGCTATATCTACCCCGGCAGCGGCAACGCCAACTACAACCAGCAGTTCAAGG
 GCAGGGTGACCATCACCGCCGACAAGAGCACCAGCACCAGCTACATGGAAGTGAAGCAGCCTGAGG
 AGCGAGGATACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGGCGACTTCGACTACGACGGCGGCTACTACTTC
 GACAGCTGGGGACAGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGCGCCAGCACCAAGGGGCCCCAGCGTGT
 CCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGG
 ACTACTTCCCCGAACCGGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCT
 CCCCCTGGTGTGCAGAGCAGCGGCGCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGGCCAGCAGCAG
 CCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAA
 GGTGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGACCCACACCTGCCCCCCTGCCCTGCCCCCGAGCTGCTGGG
 AGGCCCCAGCGTGTCTCTGTTCCCCCCCCAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCCGAG
 GTGACCTGTGTGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCTGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGA
 CGGCGTGGAGGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGGG
 TGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGACCCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGTAAGGTGT
 CCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGC
 CCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCT
 GGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACA
 ACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCTGTACAGCAAGCTGACCGT
 GGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTGAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACA
 ATCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCTGGCAAG

Secuencia madura completa de aminoácidos de H1 de cadena pesada humanizada de SAP-E (SEQ ID NO: 62)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFTFATYNMHWVRQAPGQGLEWMGYIYPGDGNANYNQFK
 GRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGDFDYDGGYYFDSWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAP
 SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN
 VNHKPSNTKVDKKVEPKCDKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPE
 VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
 QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV
 DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

- 5 Secuencia madura completa de nucleótidos de L1 de cadena ligera humanizada de SAP-E (optimizada por codones) (SEQ ID NO: 63)

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCTCACTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATTACC
TGCAGGGCCTCCGAGAACATCTACAGCTACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCC
AAGCTGCTGATCCACAACGCCAAGACCCTCGCCGAGGGCGTCCCTAGCAGGTTCTCTGGAAGCGGC
AGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTATTACTGCC
AGCACCCTACGGCGCCCCCTGACCTTTGGCCAGGGCACCAAACTGGAGATCAAGCGTACGGTGG
CCGCCCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGATGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGG
TGTGTCTGCTGAACAACCTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAATGCCCTGC
AGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGC
AGCACCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCAC
CAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGC

Secuencia madura completa de aminoácidos de L1 de cadena ligera humanizada de SAP-E (SEQ ID NO: 64)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSYLAWYQQKPGKAPKLLIHNKTAEVPSRFSGSGSGTDF
TLTISSLQPEDFATYYCQHHYGAPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA
KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

5 Secuencia de nucleótidos de H0 de la variante de la región V de cadena pesada humanizada de SAP-K, no optimizada por codones (SEQ ID NO: 65)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCTCGGTGAAGGTCTCCTG
CAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCAGCTACTGGATGCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGG
GCTTGAGTGGATGGGAATGATTCATCCTAATAGTGTTAATACTAACTACAATGAGAAGTTCAAGAGT
AGAGTCACGATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCT
GAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGACGGAATGATTACTACTGGTACTTCGATGTCTGGGGC
CAGGGCACCTGGTCACCGTCTCCTCA

Secuencia de nucleótidos de L0 de la variante de la región V de cadena ligera humanizada de SAP-K, no optimizada por codones (SEQ ID NO: 66)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCTCGGTGAAGGTCTCCTG
CAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCAGCTACTGGATGCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGG
GCTTGAGTGGATGGGAATGATTCATCCTAATAGTGTTAATACTAACTACAATGAGAAGTTCAAGAGT
AGAGTCACGATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCT
GAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGACGGAATGATTACTACTGGTACTTCGATGTCTGGGGC
CAGGGCACCTGGTCACCGTCTCCTCA

10 Secuencia de nucleótidos de H0 de la variante de la región V de cadena pesada humanizada de SAP-K (optimizada por codones) (SEQ ID NO: 67)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCCGAAGTGAAGAAGCCCGGCAGCAGCGTGAAAGTGAGCT
GCAAGGCCAGCGGCGGAACCTTCAGCAGCTACTGGATGCACTGGGTGAGGCAGGCACCCGGCCAG
GGCCTGGAGTGGATGGGCATGATCCACCCCAACAGCGTGAACACCAACTACAACGAGAAGTTCAAG
AGCAGAGTGACCATCACCGCCGACAAGAGCACCAGCACCGCCTATATGGAGCTGAGCTCTCTGAGG
AGCGAGGATACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGAGGAACGACTACTACTGGTACTTCGACGTCTGG
GGCCAGGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGC

Secuencia de aminoácidos de H0 de la variante de la región V de cadena pesada humanizada de SAP-K (SEQ ID NO: 37)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGGTFSSYWMHWVRQAPGQGLEWMGMIHPNSVNTNYNEKFK
SRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARRNDYYWYFDVWGQGLTVTVSS

- 5 Secuencia de nucleótidos de H1 de la variante de la región V de cadena pesada humanizada de SAP-K (optimizada por codones) (SEQ ID NO: 68)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCCGAAGTGAAGAAGCCCGGCAGCAGCGTGAAAGTGAGCT
GCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCAGCTACTGGATGCACTGGGTGAGGCAGGCACCCGGCCAG
GGCCTGGAGTGGATGGGCATGATCCACCCCAACAGCGTGAACACCAACTACAACGAGAAGTTCAAG
AGCAGAGTGACCATCACCGCCGACAAGAGCACCAGCACCGCCTATATGGAGCTGAGCTCTCTGAGG
AGCGAGGATACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGAGGAACGACTACTACTGGTACTTCGACGTCTGG
GGCCAGGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGC

Secuencia de aminoácidos de H1 de la variante de la región V de cadena pesada humanizada de SAP-K (SEQ ID NO: 38)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYTFSSYWMHWVRQAPGQGLEWMGMIHPNSVNTNYNEKFK
SRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARRNDYYWYFDVWGQGLTVTVSS

- 10 Secuencia de nucleótidos de H2 de la variante de la región V de cadena pesada humanizada de SAP-K (optimizada por codones) (SEQ ID NO: 69)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCCGAAGTGAAGAAGCCCGGCAGCAGCGTGAAAGTGAGCT
GCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCAGCTACTGGATGCACTGGGTGAGGCAGGCACCCGGCCAG
GGCCTGGAGTGGATCGGCATGATCCACCCCAACAGCGTGAACACCAACTACAACGAGAAGTTCAAG
AGCAGAGCCACCATCACCGCCGACAAGAGCACCAGCACCGCCTATATGGAGCTGAGCTCTCTGAGG
AGCGAGGATACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGAGGAACGACTACTACTGGTACTTCGACGTCTGG
GGCCAGGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGC

Secuencia de aminoácidos de H2 de la variante de la región V de cadena pesada humanizada de SAP-K (SEQ ID NO: 39)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYTFSSYWMHWVRQAPGQGLEWIGMIHPNSVNTNYNEKFKS
RATITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARRNDYYWYFDVWGQGLTVTVSS

Secuencia de nucleótidos de H3 de la variante de la región V de cadena pesada humanizada de SAP-K (optimizada por codones) (SEQ ID NO: 70)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCCGAAGTGAAGAAGCCCGGCAGCAGCGTGAAAGTGAGCT
GCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCAGCTACTGGATGCACTGGGTGAGGCAGGCACCCGGCCAG
GGCCTGGAGTGGATCGGCATGATCCACCCCAACAGCGTGAACACCAACTACAACGAGAAGTTCAAG
AGCAGAGCCACCCTGACCGTGGACAAGAGCACCAGCACC GCCTATATGGAGCTGAGCTCTCTGAGG
AGCGAGGATACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGAGGAACGACTACTACTGGTACTTCGACGTCTGG
GGCCAGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGC

Secuencia de aminoácidos de H3 de la variante de la región V de cadena pesada humanizada de SAP-K (SEQ ID NO: 40)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWIGMIHPNSVNTNYNEKFKS
RATLTVDKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARRNDYYWYFDVWGQGLTVTVSS

- 5 Secuencia de nucleótidos de L0 de la variante de la región V de cadena ligera humanizada de SAP-K (optimizada por codones) (SEQ ID NO: 71)

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCCTTCTACTGAGCGCTAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACC
TGCAAGGCCAGCCAGAACGTGAACAGCAACGTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCAAAGCCCC
CAAGCTCCTGATCTACAGCGCCAGCTACAGATATAGCGGCGTGCCTAGCAGGTTTAGCGGCAGCGG
AAGCGGGACCGATTTACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCCACTTACTACTGC
CAGCAGTGCAACAACTACCCCTTACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAG

Secuencia de aminoácidos de L0 de la variante de la región V de cadena ligera humanizada de SAP-K (SEQ ID NO: 41)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVNSNVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYSRVPSRFSGSGSGTD

- 10 FTLTISSLQPEDFATYYCQQCNYPFTFGQGTKLEIK

Secuencia de nucleótidos de L1 de la variante de la región V de cadena ligera humanizada de SAP-K (optimizada por codones) (SEQ ID NO: 72)

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCCTTCTACTGAGCGCTAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACC
TGCAAGGCCAGCCAGAACGTGAACAGCAACGTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCAAAGCCCC
CAAGGCCCTGATCTACAGCGCCAGCTACAGATATAGCGGCGTGCCTAGCAGGTTTAGCGGCAGCGG
AAGCGGGACCGATTTACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCCACTTACTACTGC
CAGCAGTGCAACAACTACCCCTTACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAG

- 15 Secuencia de aminoácidos de L1 de la variante de la región V de cadena ligera humanizada de SAP-K (SEQ ID NO: 42)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVNSNVAWYQQKPGKAPKALIYSASYRYSRVPSRFSGSGSGT
DFTLTISSLQPEDFATYYCQQCNYPFTFGQGTKLEIK

Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada de H3 humanizada de SAP-K optimizada por codones (SEQ ID NO: 75)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCCGAAGTGAAGAAGCCCGGCAGCAGCGTGAAAGTGAGCT
 GCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCAGCTACTGGATGCACTGGGTGAGGCAGGCACCCGGCCAG
 GGCCTGGAGTGGATCGGCATGATCCACCCCAACAGCGTGAACACCAACTACAACGAGAAGTTCAAG
 AGCAGAGCCACCCTGACCGTGGACAAGAGCACCAGCACCGCCTATATGGAGCTGAGCTCTCTGAGG
 AGCGAGGATACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGAGGAACGACTACTACTGGTACTTCGACGTCTGG
 GGCCAGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCCCTGGCC
 CCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCC
 GAACCGGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTG
 CTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGCAC
 CCAGACCTACATCTGTAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCC
 CAAGAGCTGTGACAAGACCCACACCTGCCCCCCTGCCCTGCCCCGAGCTGCTGGGAGGCCCCAG
 CGTGTTCTGTTCCCCCCTAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGT
 GTGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCTGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA
 GGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCG
 TGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGTAAAGGTGTCCAACAAGG
 CCCTGCCTGCCCCCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCCCAGGTGT
 ACACCCTGCCCCCTAGCAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGG
 GCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACACTACAAGA
 CCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAG
 CAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCACTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACAC
 CCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCTGGCAAG

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de H3 humanizada de SAP-K (SEQ ID NO: 76)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWIGMIHPNSVNTNYNEKFKS
 RATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARRNDYYWYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS
 TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK
 PSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPÉLLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN
 WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
 PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
 WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

- 5 Secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de L0 humanizada de SAP-K (optimizada por codones) (SEQ ID NO: 77)

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCTCTTCACTGAGCGCTAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACC
 TGCAAGGCCAGCCAGAACGTGAACAGCAACGTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGCAAAGCCCC
 CAAGCTCCTGATCTACAGCGCCAGCTACAGATATAGCGGCGTGCCTAGCAGGTTTAGCGGCAGCGG
 AAGCGGGACCGATTTACCCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCCACTTACTACTGC
 CAGCAGTGCAACAACCTACCCCTTACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGCGTACGGTG
 GCCGCCCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGATGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTG
 GTGTGTCTGCTGAACAACCTTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAATGCCCTG
 CAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAG
 CAGCACCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCA
 CCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGC

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de L0 humanizada de SAP-K (SEQ ID NO: 78)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVNSNVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYSVPSRFSGSGSGTD
 FTLTISSLQPEDFATYYCQQCNYPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE
 AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
 EC

- 5 Secuencia líder para cadenas de inmunoglobulina (SEQ ID NO: 79)
 MGWSCILFLVATATGVHS

Ejemplo 4: Expresión de anticuerpos

Expresión de anticuerpos recombinantes

- 10 Los plásmidos de expresión que codifican las cadenas pesada y ligera respectivamente de anticuerpos quiméricos o humanizados se co-transfectaron transitoriamente en células HEK2936E por transfección lipídica usando Fectin 293. Las células se cultivaron en medios de expresión Freestyle 293 con pluronic F68 al 10% y 50 mg/ml de geneticina, a 37 °C, CO₂ al 5% durante 72-120 horas, el sobrenadante se recogió por centrifugación. En algunos casos el material procedente del sobrenadante se usó como objeto de ensayo en ensayos de unión. En otros casos, el material procedente del sobrenadante se esterilizó por filtración y el anticuerpo se recuperó por cromatografía de afinidad usando una columna de Proteína A MAbSelect SuRE seguido de diálisis en PBS.

Expresión de anticuerpos en hibridomas

- 20 Se cultivaron células de hibridoma en matraces agitadores en medio Ex620 complementado con glutamax 4 mM y SFT de IgG reducido al 10%. Las células se sometieron a pases y se eliminó el suero hasta un buen crecimiento en medio sin suero. Después las células se usaron como una semilla para una bolsa agitadora de 10 l. Las células se cultivaron en la bolsa agitadora a 22 agitaciones/minuto, 37 grados C, CO₂ al 5% en 0,1 l/min hasta que la viabilidad disminuyó al 30%. El medio acondicionado se recogió por filtración estéril. El anticuerpo se recuperó por cromatografía de afinidad usando Proteína A recombinante seguido de diálisis en PBS.

Ejemplos 5-7: Datos comparativos entre los mAb de hibridomas y/o quiméricos y/o los mAb humanizados.

Ejemplo 5: Comparación de hibridomas de SAP-K y SAP-E en ELISA de unión a SAP humano

- 25 Sobre una placa de ensayo ELISA se inmovilizaron directamente 1 µg/ml o 5 µg/ml de SAP humano y se bloquearon con BSA al 1%/TBS más TWEEN20 al 0,05%. Los anticuerpos anti SAP del material purificado se titularon a través de la placa. El anticuerpo unido se detectó por tratamiento con un anticuerpo anti-IgG de ratón de conejo conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Dako, P0260). El ELISA se desarrolló usando sustrato de diclorhidrato de O-fenilendiamina (OPD) peroxidasa (Sigma, P9187).
- 30 La Figura 1 muestra las curvas de unión de los anticuerpos murinos SAP-E y SAP-K a una concentración de recubrimiento de SAP de 1 µg/ml.

La Figura 2 muestra las curvas de unión de los anticuerpos murinos SAP-E y SAP-K a una concentración de recubrimiento de SAP de 5 µg/ml.

A la concentración de recubrimiento de 5 µg/ml, SAP-K y SAP-E mostraron similar unión al SAP humano inmovilizado, mientras que al recubrimiento de menor densidad de 1 µg/ml, SAP-K mostró mayor unión que el SAP-E. Todos los siguientes ELISA de unión a SAP humano usando este formato usaron la menor densidad de concentración de recubrimiento de 1 µg/ml para diferenciar entre las propiedades de unión de los dos anticuerpos.

Ejemplo 6: Comparación de los mAb quiméricos/humanizados de SAP-K y SAP-E en ELISA de unión a SAP humano

Sobre una placa de ensayo ELISA se inmovilizó directamente 1 µg/ml de SAP humano y se bloqueó con BSA al 1%/TBS más TWEEN20 al 0,05%. Los anticuerpos anti SAP de los sobrenadantes del ensayo o del material purificado se titularon a través de la placa. El anticuerpo unido se detectó por tratamiento con anticuerpo anti-cadena ligera Kappa humana de cabra conjugado con peroxidasa (Sigma, A7164). El ELISA se desarrolló usando sustrato de diclorhidrato de O-fenilendiamina (OPD) peroxidasa (Sigma, P9187).

La Figura 3 muestra las curvas de unión de los anticuerpos quiméricos cSAP-E y cSAP-K. El perfil de las curvas de los anticuerpos quiméricos es el mismo que el de los hibridomas equivalentes.

La Figura 4 muestra las curvas de unión de H0L0 de SAP-K, H1L0 de SAP-K, H2L0 de SAP-K y H3L0 de SAP-K en comparación con la quimera de SAP-K y H1L1 de SAP-E en comparación con la quimera de SAP-E. También se ensayó un anticuerpo kappa IgG1 humano intrascendente como un control negativo. Los datos muestran que la humanización del anticuerpo SAP-K da como resultado una pérdida de actividad de unión a SAP humano de aproximadamente 2 veces en comparación con la quimera de SAP-K parental, mientras que el anticuerpo SAP-E humanizado conservó actividad de unión en comparación con la quimera de SAP-E parental.

Ejemplo 7 - ELISA de competencia

Se recubrieron placas ELISA con SAP humano a 1 µg/ml (para la competición con la quimera de SAP-K) o 5 µg/ml (para la competición con la quimera de SAP-E) y se bloquearon con BSA/PBS al 1%. Se mezcló una concentración constante de mAb anti-SAP quimérico con cantidades diluidas en serie (1:1) de los mAb anti-SAP. Las placas se lavaron y la cantidad de anticuerpo quimérico unido al SAP humano inmovilizado se detectó usando anticuerpo anti-cadena ligera Kappa humana de cabra conjugado con peroxidasa (Sigma, A7164). El ELISA se desarrolló usando sustrato de diclorhidrato de O-fenilendiamina (OPD) peroxidasa (Sigma, P9187).

La Figura 5 muestra anticuerpos monoclonales murinos de SAP-K y SAP-E purificados en el ELISA de competencia con la quimera de SAP-E.

La Figura 6 muestra anticuerpos monoclonales murinos de SAP-K y SAP-E purificados en el ELISA de competencia con la quimera de SAP-K.

En las dos figuras 5 y 6 no se observa competición entre los anticuerpos SAP-E y SAP-K lo que demuestra que los dos anticuerpos se unen a epítopes distintos sobre la molécula de SAP humano.

Ejemplo 8: Determinación de cinéticas de unión

Análisis de unión por Biacore de variantes de anticuerpo anti-SAP humanizado a SAP de mono cinomolgo purificado y humano purificado.

En una microplaca C1 de Biacore se inmovilizó SAP humano y de mono cinomolgo por acoplamiento de amina primaria de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los anticuerpos anti-SAP humanizados contenidos en los sobrenadantes de cultivo y los anticuerpos quiméricos purificados a 512 nM se pasaron sobre superficies SAP de mono cinomolgo y humano y se obtuvieron sensogramas de unión. Todos los procesos se relacionaron por duplicado con una inyección de tampón para la muestra purificada o medios para las muestras del sobrenadante sobre las superficies de SAP de humano y cinomolgo. Los análisis se realizaron a 25 °C usando tampón HBS-EP. La regeneración de la superficie se realizó en presencia de MgCl₂ 3 M y no influyó en la capacidad de los anticuerpos para volver a unirse al SAP humano en un ciclo posterior. Los datos se analizaron usando el modelo de disociación 1 a 1 dentro del programa informático de evaluación Biacore T100.

Los datos generados en las Tablas 6a y 6b muestran las velocidades de disociación (kd) de los sobrenadantes de los anticuerpos SAP-E y SAP-K humanizados respectivamente. Los valores se basaban en una sola curva y se usaron con fines de clasificación entre las distintas construcciones para la unión al SAP humano. Los anticuerpos SAP-E humanizados mostraron mejores velocidades de disociación que los anticuerpos SAP-K humanizados para la unión al SAP humano. Diversas variantes de anticuerpos humanizados SAP-K mostraron unión a SAP de mono cinomolgo (N.I. la quimera de SAP-K unida a SAP de mono cinomolgo) mientras que ninguna de las variantes de anticuerpos SAP-E humanizados se unían a SAP de mono cinomolgo (N.I. probablemente la quimera de SAP-E no se une a SAP de mono cinomolgo). Las variantes de SAP-E humanizadas que contenían la cadena pesada

- 5 humanizada de injerto lineal (H0) o la cadena ligera humanizada de injerto lineal (L0) o una combinación de ambas mostraron las peores velocidades de disociación. La cadena ligera L1 humanizada de SAP-E fue la mejor variante de cadena ligera y la combinación de L1 con la variante de cadena pesada H1 proporcionó un anticuerpo humanizado con una velocidad de asociación aceptable conservando al mismo tiempo el número de retromutaciones a un mínimo. La clasificación de la velocidad de disociación de las variantes de SAP-K humanizado mostró que el injerto lineal de L0 era la mejor variante de cadena ligera humanizada y que el injerto lineal de H0 era la peor variante de cadena pesada humanizada.

Tabla 6a

Variante de SAP-E	Kd para SAP humano (s ⁻¹)
Quimera de SAP-E	3,83E-03
H1L1 de SAP-E	4,80E-03
H4L1 de SAP-E	5,43E-03
H1L2 de SAP-E	5,51E-03
H3L1 de SAP-E	5,76E-03
H4L2 de SAP-E	5,80E-03
H2L1 de SAP-E	6,09E-03
H3L2 de SAP-E	6,31E-03
H2L2 de SAP-E	6,52E-03
H1L0 de SAP-E	8,09E-03
H3L0 de SAP-E	9,10E-03
H2L0 de SAP-E	9,79E-03
H4L0 de SAP-E	9,81E-03
H0L1 de SAP-E	4,02E-02
H0L2 de SAP-E	4,29E-02
H0L0 de SAP-E	5,35E-02

10

Tabla 6b

<i>N.I. La Kd es para SAP humano</i>		
	Kd (s ⁻¹)	<i>Unión a SAP de cinomolgo</i>
quimera de SAP-K	6,64E-03	<i>Sí</i>
H1L0 de SAP-K	1,71E-02	<i>Escasa</i>
H3L0 de SAP-K	1,84E-02	<i>Sí</i>
H2L0 de SAP-K	2,04E-02	<i>Sí</i>
H3L1 de SAP-K	2,36E-02	<i>Sí</i>
H0L0 de SAP-K	2,63E-02	<i>No</i>
H1L1 de SAP-K	2,96E-02	<i>Escasa</i>
H2L1 de SAP-K	3,21E-02	<i>Escasa</i>
<i>H0L1 de SAP-K</i>	<i>4,79E-02</i>	<i>No</i>

Análisis de unión por Biacore de anticuerpos anti-SAP a SAP humano purificado directamente inmovilizado en un soporte en fase sólida

En una microplaca CM3 de Biacore se inmovilizó SAP humano por acoplamiento de amina primaria de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los anticuerpos anti-SAP se pasaron sobre esta superficie a 512, 128, 32, 8, 2, 0,5 nM y se obtuvieron sensogramas de unión. Todos los procesos se relacionaron por duplicado con una inyección de tampón sobre la superficie de SAP humano. Los análisis se realizaron a 25 °C usando tampón HBS-EP. La regeneración de la superficie se realizó permitiendo la extensión del tampón sobre la superficie durante algunos minutos y no influyó en la capacidad del SAP humano para volver a unirse a los anticuerpos en un ciclo posterior. Los datos se analizaron desde procesos de 128 - 0,5 nM usando el modelo de analito bivalente intrínseco para el programa informático de evaluación Biacore T100.

Los datos generados y recopilados en la tabla 7 se proporcionan para comparar entre las construcciones y muestran que los anticuerpos anti SAP-K tienen una velocidad de asociación mejor en este ensayo mientras que los anticuerpos SAP-E muestran mejores velocidades de disociación. Además, la humanización no influyó en la cinética de unión del anticuerpo SAP-E mientras que para SAP-K se observó una pérdida de la velocidad de asociación y disociación después de la humanización.

Tabla 7

	Ka (M ⁻¹ .s ⁻¹)	Kd (s ⁻¹)	KD (nM)
Quimera de SAP-K	4,06E+5	7,59E-03	18,7
H0L0 de SAP-K	6,08E+4	4,49E-02	739
H1L0 de SAP-K	1,15E+5	1,78E-02	155
H2L0 de SAP-K	1,15E+5	2,20E-02	191
H3L0 de SAP-K	1,50E+5	1,92E-02	128
Quimera de SAP-E	2,64E+4	2,18E-03	82,6
H1L1 de SAP-E	2,64E+4	2,07E-03	78,3

Análisis de unión por Biacore de anticuerpos anti-SAP a SAP humano purificado capturado en O-fosfoetanolamina inmovilizada

En una microplaca CM5 de Biacore se inmovilizó O-fosfoetanolamina por acoplamiento de amina primaria de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después se capturó SAP humano en la superficie en presencia de cloruro de calcio con objeto de reproducir, en el sistema Biacore *in vitro*, la orientación exacta de las moléculas de SAP unidas a fibrillas amiloides *in vivo*. Después los anticuerpos anti-SAP se pasaron sobre esta superficie a 256, 64, 16, 4, 1nM y se obtuvieron sensogramas de unión. El análisis se realizó a 25 °C usando BSA al 4%, Tris 10 mM, NaCl 140 mM, CaCl₂ 2 mM, tensioactivo P20 al 0,05%, NaN₃ al 0,02%, pH 8,0 como tampón de desarrollo. La regeneración se consiguió usando dos adiciones puntuales de Tris-EDTA (Tris 10 mM, NaCl 140 mM, EDTA 10 mM, pH 8,0) que eliminaron el SAP humano unido pero no influyó de manera significativa en la unión posterior de SAP a la fosfoetanolamina inmovilizada. Los datos generados se relacionaron por duplicado con una inyección de tampón sobre la superficie de SAP humano y se analizaron usando el modelo de analito bivalente en el programa informático de evaluación Biacore T100.

Los datos generados, como se muestra en la Tabla 8, se proporcionan solamente para comparar entre las construcciones. No constituyen valores cinéticos precisos debido a la posible modificación de unión por el efecto de avidéz intrínseco en el formato de ensayo. Es más probable que la avidéz influya a las velocidades de disociación de los anticuerpos, conduciendo a valores calculados de KD más bajos. Adicionalmente, para todos los anticuerpos SAP-E, la velocidad de disociación (kd) obtenida está fuera del límite del intervalo de medición por Biacore. No obstante, los resultados indican fuerte unión de los anticuerpos anti-SAP al SAP humano inmovilizado por interacción del SAP con un ligando en fase sólida, tal como ocurre *in vivo* en los depósitos amiloides, que es la diana terapéutica de la presente invención.

Tabla 8

	K_a ($M^{-1}.s^{-1}$)	K_d (s^{-1})	KD (nM)
Quimera de SAP-K	3,32E+5	2,97E-4	0,895
Quimera de SAP-E	2,03E+4	9,12E-7	4,49E-11
SAP-K de ratón	3,00E+5	2,19E-4	0,730
SAP-E de ratón	3,15E+4	1,51E-8	4,79E-13
H3L0 de SAP-K	1,36E+5	5,01E-3	36,8
H1L1 de SAP-E	1,94E+4	1,58E-7	8,14E-12

Ejemplo 9: Exploración de aminoácidos en la posición 91 de la cadena ligera humanizada L0 de SAP-K

Se usó mutagénesis de saturación dirigida para generar un panel de variantes en el que el resto de cisteína en la posición 91 (numeración de Kabat) se sustituyó posiblemente por los 19 aminoácidos restantes en una reacción sencilla usando un cebador de mutagénesis que codifica NNK en esta posición (en la que N codifica adenosina o citidina o guanosina o timidina y K codifica guanosina o timidina). A partir de la clasificación de la velocidad de disociación de Biacore realizada en el sobrenadante de anticuerpos para las variantes generadas, se seleccionaron cuatro para mejorar en las células HEK2936E y purificación. El análisis cinético de Biacore usando el procedimiento de O-fosfoetanolamina, como se detalla en el Ejemplo 7, mostró que la variante con alanina en la posición 91 (SEQ ID NO: 43) tuvo una afinidad mejorada en comparación con la del tipo silvestre; se midieron valores de KD de 0,436 nM y 36,8 nM respectivamente. N.I. todas las variantes se ensayaron en el mismo experimento usado para producir los resultados mostrados en la Tabla 7.

Otras variantes, por ejemplo glicina, serina y valina mejoraron la unión con respecto a H3L0, pero a un menor grado que la alanina. Además, el hecho de que estas cuatro variantes tuvieran mejores propiedades de unión que L0 también se observó en un ensayo de unión ELISA y en un experimento de clasificación de velocidad de disociación de Biacore cuando las cadenas ligeras se emparejaron con H1.

Secuencia de nucleótidos de L0 91A de la variante de la región V de cadena ligera humanizada de SAP-K (optimizada por codones) (SEQ ID NO: 73)

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCTCTTCACTGAGCGCTAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACC
 TGCAAGGCCAGCCAGAACGTGAACAGCAACGTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCAAGCCCC
 CAAGCTCCTGATCTACAGCGCCAGCTACAGATATAGCGGCGTGCCTAGCAGGTTTAGCGGCAGCGG
 AAGCGGGACCGATTTACCCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACTTACTACTGC
 CAGCAGGCGAACAACCTACCCCTTCACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAG

Secuencia de aminoácidos de L0 91A de la variante de la región V de cadena ligera humanizada de SAP-K (SEQ ID NO: 74)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVNSNVAWYQQKPKAPKLLIYSASYRSGVPSRFSGSGSGTD
 FTLTISSLQPEDFATYYCQQANNYPFTFGQGTKLEIK

Ejemplo 10: Dependencia del complemento de la eliminación de amiloide por el anticuerpo anti-SAP.

Se investigó la función del complemento en la eliminación de amiloide por anticuerpos anti-SAP comparando la eficacia del tratamiento entre ratones carentes de complemento y animales normales no carentes de complemento. La delección diana del gen para C1q bloquea la activación de la ruta clásica del complemento, que se inicia por la unión de C1q a complejos antígeno- anticuerpo, aunque la activación de C3, la etapa funcional principal responsable de la quimiotaxis y opsonización, las principales funciones biológicas del complemento, aún puede realizarse mediante las rutas alternativa y de lecitina así como por escisión directa de C3 mediante serina proteinasas del complemento. La delección diana del gen para C3 anula completamente estas funciones.

Inducción de amiloidosis AA

En dos grupos de ratones carentes de complemento: ratones con C3 suprimido (n=14) y ratones con C1q suprimido (n=12) y en 15 ratones silvestres, se indujo y se confirmó amiloidosis AA. Todos los ratones eran de

línea pura C57BL/6. Cada ratón recibió una sola dosis de factor amplificador amiloide, un extracto de tejido amiloidótico que contiene fibrillas amiloides (Baltz y col, (1986) Plenum Press, New York, págs. 115-121), por inyección intravenosa seguido de 4 días más tarde por 10 inyecciones diarias subcutáneas de caseína al 10% p/v en solución en NaHCO₃ 0,1 M administradas durante un periodo de 12 días (Botto y col, (1997) *Nature Med.*, 3: 855-859). La caseína provoca inflamación aguda persistente y un aumento prolongado de la producción de proteína A amiloide en suero (AAS) lo que conduce a una deposición amiloide de AA en todos los animales. Siete días después de la última inyección de caseína, se introdujo KI en el agua potable de todos los ratones y tres días después cada ratón recibió una inyección intravenosa de una dosis convencional de SAP humano marcado con ¹²⁵I (Hawkins y col, (1990) *J. Clin. Invest.*, 86: 1862-1 869 y Hawkins y col, (1988) *J. Exp. Med.*, 167: 903-913). Todos los ratones se sometieron a recuento completo del cuerpo 24 h y 48 h después de la inyección rastreadora para determinar la retención de radioactividad, un índice exacto de la carga amiloide de todo el cuerpo. Diez días después de la inyección rastreadora de SAP-¹²⁵I, todos los ratones se "cargaron" con SAP humano mediante una sola inyección intraperitoneal de 10 mg por ratón de SAP humano puro asilado. El SAP humano inyectado en ratones amiloidóticos se localiza en los depósitos amiloides y allí persiste con una semivida de aproximadamente 3-4 días mientras que cualquier SAP humano no unido a amiloide se elimina de la circulación con una semivida de aproximadamente 3-4 horas (Hawkins y col, (1988) *J. Exp. Med.*, 167: 903-913 and Pepys y col, (2002) *Nature*, 417: 254-259).

La tinción inmunohistoquímica con anticuerpo anti-SAP humano en el bazo de un ratón amiloidótico después de la inyección de SAP humano puro aislado muestra que hay una fuerte tinción positiva de todos los depósitos amiloides en su distribución en la zona marginal típica. Este SAP humano unido es la diana del anticuerpo anti-SAP terapéutico de acuerdo con la presente invención.

Tratamiento con anti-SAP

Tres días después de la inyección con SAP humano, cuando el SAP humano ya no era detectable en la circulación, todos los ratones excepto dos en cada uno de los grupos carentes de complemento recibieron una sola inyección intraperitoneal de 1 ml de la fracción de IgG completa (lote nº 2866) de antisuero anti-SAP humano de cabra monoespecífico a 50 mg/ml en solución en solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía 7 mg/ml de anticuerpo anti-SAP real. El antisuero se produjo en The Binding Site Ltd, Birmingham, Reino Unido, usando SAP humano (estrictamente purificado al 100% en el Centro Universitario del Colegio de Londres para Amiloidosis y Proteínas de Fase Aguda) y procedimientos de inmunización adecuados. A continuación, todos los animales se sacrificaron 15 días después de la administración de anti-SAP para efectuar un cálculo histológico de la carga amiloide mediante tinción con rojo Congo alcalino alcohólico (Puchtler, H., Sweat, F. and Levine, M. (1962) On the binding of Congo red by amyloid. *J. Histochem. Cytochem.*, 10: 355-364). Uno o más analistas expertos examinaron independientemente, sin conocer el tratamiento que cada ratón había recibido, las secciones de bazo y de hígado, teñidas con rojo Congo, de todos los animales, y puntuaron la cantidad de amiloide presente, como se ha indicado anteriormente (Botto y col, (1997) *Nature Med.*, 3: 855-859). Las puntuaciones de 1-5 representan aproximadamente una escala, de log de base 10, que varía de 1, que corresponde a una o dos motitas de amiloide entre varias secciones de un órgano particular, a 5, que corresponde a abundantes depósitos extendidos que comprenden aproximadamente 10.000 veces más amiloide que el grado 1 (Botto y col, (1997) *Nature Med.*, 3: 855-859). Las puntuaciones de los diferentes analistas fueron siempre muy coincidentes aunque algunos analistas también usaron puntuaciones intermedias de 5. La media aritmética de las puntuaciones de todos los analistas para cada órgano en cada animal se usó para análisis estadísticos.

Resultados

En contraste notable con la eliminación eficaz de depósitos amiloides en ratones de tipo silvestre no carentes de complemento, en los dos grupos de animales carentes de complemento aún había abundante amiloide aunque con tendencia a tener un aspecto más fragmentado que en los dos ratones de control de cada tipo carentes de complemento. Las puntuaciones media, intervalo, de amiloide esplénico eran: tipo silvestre, 1,17, 0,0-1,5, n=15; ratones con C3 suprimido, 1,92, 1,17-4,33, n=12; ratones con C1q suprimido, 1,25, 1,17-3,5, n=10 (ANOVA no paramétrico de Kruskal-Wallis, P<0,001). Las diferencias entre los controles de tipo silvestre y los dos grupos carentes de complemento fueron significativas, P<0,001 para los ratones con C3 suprimido y P=0,036 (con la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples) para los ratones con C1q suprimido, pero la diferencia entre los ratones con C3 y C1q suprimidos no fue significativa, P=0,314 (ensayos de U de Mann-Whitney).

Discusión

El tratamiento con anti-SAP, en los ratones carentes de C1q o C3, no eliminó los depósitos amiloides de manera tan eficaz como en los ratones de tipo silvestre no carentes de complemento. La eficacia terapéutica del anti-SAP es por tanto sustancialmente muy dependiente del complemento y no está mediada solo por la unión al anticuerpo IgG que, en teoría, podría acoplar células fagocíticas mediante sus receptores Fc(γ). Sin embargo el aspecto más fragmentado de los depósitos amiloides persistentes en los ratones carentes de complemento sugiere al menos algún efecto del anticuerpo en solitario. Además la tendencia a una mayor eliminación en animales carentes de C1q en comparación con animales carentes de C3 sugiere que la activación de C3 es crítica y que en ausencia de C1q puede producirse alguna activación del complemento.

Ejemplo 11: Requisito para el anticuerpo anti-SAP de IgG intacto

La activación del complemento por el anticuerpo IgG requiere la molécula intacta completa, incluyendo la región Fc y se produce mediante la ruta clásica iniciada por la unión de C1q. Sin embargo, en algunos sistemas anticuerpo-antígeno, el fragmento F(ab)₂ puede mediar la activación del complemento mediante la ruta alternativa. Con objeto de confirmar la dependencia del complemento de la eliminación amiloide por el anticuerpo anti-SAP y de investigar el requisito posible para la región Fc del anticuerpo, se ensayó el efecto de F(ab)₂ del anticuerpo anti-SAP que se produjo por escisión con pepsina, a un pH de 4,0, de la fracción de IgG del antisuero anti-SAP humano policlonal de cabra (lote 2866) y se purificó mediante procedimientos convencionales.

Inducción y tratamiento de amiloidosis AA

En ratones de tipo silvestre C57BL/6, se indujo y se confirmó amiloidosis AA, como se detalla en el Ejemplo 10 anterior. Después de cargar los depósitos amiloides con SAP humano, como también se detalla en el Ejemplo 10, se trataron grupos de ratones con la fracción de IgG completa del antisuero anti-SAP humano policlonal de cabra, solo con vehículo tampón o con el fragmento F(ab)₂ de la fracción de IgG. La dosis de actividad de anticuerpo anti-SAP inyectada fue de 7,28 mg por ratón que recibía F(ab)₂ y 7 mg (50 mg de IgG total como habitual) por ratón que recibía IgG completa. Todos los ratones se sacrificaron 14 días después para calcular la carga amiloide por tinción con rojo Congo.

Resultados

La eliminación de los depósitos amiloides era casi completa en ratones que habían recibido anticuerpo anti-SAP de IgG en comparación con los depósitos amiloides masivos en los ratones de control que habían recibido solo vehículo. Los ratones que habían recibido F(ab)₂ tenían menos amiloide que los controles no tratados, pero aun sustancialmente más que los ratones tratados con anti-anticuerpo SAP de IgG completa (Tabla 9).

Tabla 9. Eficacia reducida de F(ab)₂ de anti-SAP en comparación con el anticuerpo de IgG intacta en la eliminación de depósitos amiloides.

Grupo (tratamiento, tamaño del grupo)	Puntuación amiloide media, intervalo	
	Bazo	Hígado
1 (sin anticuerpo, n=10)	4,0, 4,0-4,33	3,5, 2,67-4,67
2 (anticuerpo anti-SAP de IgG, n=8)	1,0, 1,0-3,67*	1,25, 1,0-1,5
3 (F(ab) ₂ del anticuerpo anti-SAP, n=5)	2,17, 1,33-3,0	1,67, 1,33-1,67
Ensayo de Kruskal-Wallis: bazo, P<0,001; hígado P<0,001 Ensayos de Mann-Whitney**: 1 frente a 2, bazo e hígado, P<0,001; 1 frente a 3, bazo e hígado, P=0,001; 2 frente a 3, bazo, P=0,284; hígado, P=0,019 * Único valor atípico en el grupo 2 con intenso amiloide esplénico a pesar del tratamiento anti-SAP de IgG. Sin tener en cuenta este animal, existe una diferencia muy significativa entre la eficacia del tratamiento con el anticuerpo anti-SAP de IgG y F(ab) ₂ . **Debido a las comparaciones múltiples, se necesita un valor significativo de P de 0,01 o inferior.		

Discusión

La dosis molar de F(ab)₂ del anticuerpo anti-SAP usada en este estudio era aproximadamente un tercio superior a la del anticuerpo de IgG, debido al peso molecular más bajo del fragmento F(ab)₂ en comparación con la IgG completa. Para un efecto óptimo en la eliminación amiloide se necesita Fc. Esto no se debe a la implicación directa del reconocimiento celular por los receptores de Fc(γ) ya que la IgG completa era incluso menos eficaz en ratones carentes de complemento a como lo era F(ab)₂ en ratones no carentes de complemento. Esto probablemente es porque la dosis elevada de F(ab)₂ que se administró pudo activar cierto complemento mediante la ruta alternativa.

Ejemplo 12: Necesidad de macrófagos

Estudios histológicos e histoquímicas descritos en el documento US 2009/0191196 muestran que las células que infiltran, envuelven y fagocitan los depósitos amiloides en ratones tratados con anticuerpo anti-SAP son macrófagos. Con objeto de confirmar que los macrófagos son ciertamente los responsables de la eliminación del amiloide, se ensayó el efecto del tratamiento con la fracción IgG completa del antisuero anti-SAP humano policlonal de cabra (lote 2866) en ratones en los que se había inhibido toda la actividad de macrófagos por administración de clodronato liposomal. Los reactivos, protocolo experimental y efectos en la función de macrófagos del clodronato liposomal están bien establecidos y ampliamente documentados (Van Rooijen y col, (2002) *J. Liposome Research*. Vol. 12. Págs. 81-94).

Inducción y tratamiento de amiloidosis AA

Después de la inducción y confirmación de amiloidosis AA en ratones de tipo silvestre, usando el protocolo detallado en el Ejemplo 10 anterior, todos los animales recibieron una sola dosis intraperitoneal de 10 mg de SAP humano puro aislado para cargar sus depósitos con SAP humano. Inmediatamente después, los grupos de ensayo recibieron 0,3 ml de clodronato liposomal por vía intraperitoneal y los días 2, 7 y 14 posteriores. Un grupo de control y el grupo de ensayo recibieron una sola dosis intraperitoneal de 50 mg de la fracción de IgG de antisero anti-SAP humano de cabra el día 3 después de la inyección de SAP humano. Un segundo grupo de control no recibió ni anti-SAP ni ningún otro tratamiento adicional. Todos los ratones se sacrificaron para calcular la carga amiloide por tinción con rojo Congo 14 días después de la administración del anti-SAP en los grupos de ensayo y de control con anticuerpo.

Resultados

El tratamiento con anti-SAP produjo eliminación casi completa de depósitos amiloides en comparación con el grupo que no recibió el anticuerpo. Sin embargo, en ratones que recibieron el clodronato liposomal en un régimen conocido para anular completamente la función de macrófagos, no hubo eliminación de depósitos amiloides (Tabla 10).

Tabla 10. La reducción de macrófagos inhibe la eliminación de depósitos amiloides por el anticuerpo anti-SAP.

Grupo (tratamiento, tamaño del grupo)	Puntuación amiloide media, intervalo	
	Bazo	Hígado
1 (clodronato más anti-SAP, n=13)	4,83, 2,0-5,0	3,17, 2,0-3,5
2 (solo anti-SAP, n=12)	1,33, 0,67-3,5	1,0, 0,67-2,5
3 (sin tratamiento, n=12)	4,0, 3,5-4,5	2,83, 1,0-3,17
Ensayo de Kruskal-Wallis: bazo, $P < 0,001$; hígado $P < 0,001$ Ensayos de Mann-Whitney con corrección de Bonferroni: 1 frente a 2: bazo e hígado, $P < 0,003$; 1 frente a 3: bazo, $P = 0,078$; hígado $P = 0,411$; 2 frente a 3, bazo e hígado $P < 0,003$		

Discusión

El resultado en este experimento particular confirmó que la función de macrófagos es necesaria para la eliminación de depósitos amiloides por el anticuerpo anti-SAP humano.

Ejemplo 13: Eficacia del anticuerpo anti-SAP humano monoclonal de ratón, SAP-E, en la eliminación de depósitos amiloides AA sistémicos en ratón.

Se investigó la capacidad de diversos anticuerpos monoclonales para mediar la eliminación de depósitos amiloides AA murinos que contenían SAP humano en comparación con el anticuerpo anti-SAP humano policlonal de oveja convencional como un control positivo.

Inducción de amiloidosis AA y tratamiento

Se crearon ratones transgénicos C57BL/6 con SAP suprimido, para SAP humano cruzando animales de línea pura C57BL/6 en los que el gen SAP de los ratones se había delecionado (Botto y col, (1997) *Nature Med.*, 3: 855-859) llevando los ratones C57BL/6 un transgén SAP humano (Yamamura y col, (1993) *Mol. Reprod. Dev.*, 36: 248-250 y Gillmore y col, (2004) *Immunology*, 112: 255-264). Por tanto, estos ratones carecen de SAP de ratón pero expresan SAP humano a concentraciones significativamente superiores que las observadas en seres humanos. En los ratones transgénicos con SAP de ratón suprimido para SAP humano, se indujo amiloidosis AA sistémica, como se describe en el Ejemplo 10, y 9 días después de la inyección final de caseína en los ratones, se confirmó la presencia y el grado de la deposición amiloide como de costumbre por recuento corporal completo de amiloide después de la inyección de una dosis rastreadora de SAP humano marcado con ^{125}I . Todos los ratones tenían cantidades sustanciales y comparables de amiloide y se distribuyeron en grupos estrechamente emparejados para recibir los diferentes tratamientos. Una semana después de la inyección rastreadora, cada ratón recibió una sola dosis de 5 mg de CPHPC por inyección intraperitoneal, para reducir su SAP humano circulante, seguido de 5 horas después mediante la misma ruta por la fracción de IgG de anti-SAP humano policlonal de oveja convencional (lote 2866, 1 ml a 50 mg/ml de proteína total que contenía 7 mg/ml de anticuerpo anti-SAP humano) o 5 mg de uno de nueve diferentes anticuerpos anti-SAP humanos monoclonales puros aislados (Tabla 11). Todos los ratones se sacrificaron 21 días después de la inyección del anticuerpo y se determinó la carga amiloide por histología con rojo Congo de sus bazos.

Tabla 11. Presencia de amiloide en bazo de ratones con amiloidosis AA sistémica después del tratamiento con CPHPC y diversos anticuerpos anti-SAP humanos.

Tratamiento con anticuerpo	Isotipo del anticuerpo	Puntuación amiloide media, intervalo
sin tratamiento		3, 3-5
policlonal	NA	1, 1-1
SAP-A monoclonal	IgG1	3, 2-4
SAP-B monoclonal	IgG2a	3, 2-4
SAP-C monoclonal	IgG1	4, 2-4
SAP-D monoclonal (n=1)	IgG1	4
SAP-E monoclonal	IgG2a	1, 1-1
SAP-F monoclonal (n=1)	IgG1	2
SAP-G monoclonal	IgG1	3, 2-4

Entre los anticuerpos monoclonales ensayados, solamente SAP-E produjo eliminación de los depósitos amiloides pero su efecto era el mismo que el de la función altamente reproducible y drástica del anticuerpo policlonal de oveja. Cabe destacar que SAP-E es del isotipo IgG2a de ratón que se sabe que activa el complemento del ratón mientras que los otros monoclonales, excepto SAP-B, eran del isotipo IgG1 de ratón no activadores del complemento. Aunque SAP-B es un isotipo de IgG2a de ratón, su unión a SAP *in vitro* fue notablemente inferior que la de SAP-E y evidentemente no fue suficiente para ser eficaz *in vivo*.

10 Discusión

Estos resultados demuestran que un anticuerpo anti-SAP humano monoclonal de IgG2a de ratón, con suficiente avidéz, activador del complemento, media la eliminación amiloide *in vivo* de manera tan eficaz como el anticuerpo anti-SAP humano policlonal de oveja.

15 **Ejemplo 14: Caracterización comparativa de anticuerpos anti-SAP humano de ratón monoclonales, SAP-K y SAP-E, *in vitro*.**

Se seleccionó SAP-K de entre los 6 monoclonales de IgG2a diferentes de ratón, de mayor avidéz, derivado por técnicas convencionales de inmunización con SAP humano purificado y una fusión convencional para producir hibridomas que se clonaron por procedimientos rutinarios. Entre estos anticuerpos IgG2a, SAP-K, mostró la mayor unión a SAP humano inmovilizado. Sea cual fuera el caso de si el SAP humano se había inmovilizado directamente sobre superficies plásticas por adherencia no específica o por unión covalente o mediante la unión, dependiente del calcio específica, de SAP a ligandos inmovilizados, ya sea a fibrillas amiloides o a la pequeña molécula de ligando, fosfoetanolamina. SAP-K también se unió bien a SAP directamente inmovilizado en presencia o ausencia de calcio y si SAP había formado anteriormente complejos con CPHPC y después "fijado" de manera covalente en el complejo SAP-CPHPC decamérico (Pepys, M.B. y *col* (2002) Targeted pharmacological depletion of serum amyloid P component for treatment of human amyloidosis. *Nature*, 417: 254-259; Kolstoe, S.E. y *col* (2009) Molecular dissection of Alzheimer's disease neuropathology by depletion of serum amyloid P component. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106: 7619-7623). SAP-E también se unió bien al SAP humano en todas estas configuraciones diferentes. Sin embargo los dos anticuerpos difieren significativamente en que SAP-K se unió mucho más que SAP-E cuando SAP humano estaba solo escasamente disponible, por ejemplo cuando las placas se expusieron solo a 1 µg/ml de SAP humano por recubrimiento, mientras que cuando había más abundancia de SAP inmovilizado, por ejemplo cuando la solución de recubrimiento contenía 100 µg/ml de SAP, entonces había más unión de SAP-E que de SAP-K. Esta diferencia sugiere que SAP-E se une óptimamente cuando más de una molécula de SAP se encuentra estrechamente asociada con otra mientras que SAP-K se une ávidamente a moléculas de SAP individuales aisladas. Este mecanismo se basa en el hallazgo de que cuando SAP humano se inmovilizó por captura en placas recubiertas

con anti-SAP humano de oveja policlona (lote 2866), que proporciona pares de moléculas de SAP sostenidas estrechamente entre sí en los dos brazos de cada molécula de anticuerpo IgG de oveja, SAP-E se une mejor que SAP-K a todos los niveles de aporte de SAP humano (Figura 7).

La Figura 7 muestra un ensayo inmunorradiométrico para la unión de anticuerpos de ratón monoclonales a SAP humano capturados por el anticuerpo anti-SAP humano policlona de oveja inmovilizado. Sustancialmente a todas las concentraciones de SAP humano ofrecidas se une más SAP-E que SAP-K. Cada punto es la media de 3 repeticiones.

Cabe destacar que, tanto SAP-E como SAP-K se unieron aparentemente igual de bien a SAP humano original, mostrado por inmunoprecipitación similar de los dos anticuerpos en inmunodifusión doble en gel de agarosa frente a SAP humano puro aislado y suero humano completo. La unión similar de estos dos anticuerpos monoclonales de ratón se reflejó en los parámetros similares medidos en el instrumento Biacore (BiacoreX, Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia) usando SAP humano inmovilizado de manera covalente en la microplaca (Tabla 12).

Tabla 12. Afinidad de anticuerpos monoclonales para SAP humano determinada por Biacore

	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (M)
SAP-E	$2 \pm 5 \times 10^4$	$6 \pm 4 \times 10^{-5}$	$5 \pm 4 \times 10^{-9}$
SAP-K	$3,18 \pm 5 \times 10^4$	$1,7 \pm 0,9 \times 10^{-5}$	$1 \pm 1,7 \times 10^{-9}$
Los valores observados son la media y la DT de 3 mediciones repetidas			

Sin embargo, aunque los dos anticuerpos se unen a SAP humano nativo en transferencia de western después de electroforesis en gel de agarosa en tampones fisiológicos, solamente SAP-E se une a SAP humano en transferencia de western de SDS-PAGE reducida. Por tanto, SAP-E reconoce al SAP humano desnaturalizado mientras que SAP-K solamente reconoce al SAP humano original y debe unirse a un epítipo conformacional.

La digestión de SAP humano con CNBr da como resultado la escisión entre 159M y 160W dando como resultado un nuevo péptido en el que la posición 159 se ha convertido de metionina a homoserina lactona (denominada 150-158-homoserina lactona). En una transferencia de western de SDS-PAGE, SAP-E unido al extremo N del polipéptido 1-158-homoserina lactona se eliminó por escisión de SAP con CNBr en el resto Met159, que apenas reaccionó con el fragmento 1-140 eliminado por digestión con quimiotripsina en ausencia de calcio (Figura 8). El epítipo reconocido por SAP-E debe por lo tanto estar en la región 140-158 que evidentemente comprende alguna estructura secundaria resistente a la desnaturalización ya los péptidos 136-147, 138-149, 140-151 y 112-119, en solución, no inhiben posiblemente la unión de SAP-E. Esto concuerda con la estabilidad y resistencia cinética a la desnaturalización de SAP (Manning, M. and Colón, W. (2004) *Biochemistry*, 43: 11248-11254).

La Figura 8 muestra el mapeo epitópico para el anticuerpo anti-SAP humano monoclonal, SAP-E. **A**, secuencia completa de aminoácidos de SAP humano mostrando los puntos en los cuales este se escinde por CNBr en TFA al 70% (resto 159M) y por quimiotripsina, sin reducción/carbamidometilación, en bicarbonato de amonio en ausencia de calcio, (restos 140Y y 144F). **B**, análisis SDS-PAGE de SAP escindido con CNBr. Panel izquierdo: Tinción con azul de Coomassie; carril 1, SAP de control no tratado; carril 2, SAP después de la escisión con CNBr, mostrando un promotor intacto no escindido residual traza y los fragmentos esperados de aproximadamente 20 kD (restos 1-158-homoserina-lactona) y 5kD (160-204) respectivamente. Esto se confirmó exactamente por espectrometría de masas. Panel derecho: transferencia de Western con 5 tinciones intensas de SAP de SAP no tratado intacto en los carriles 1 (cargado con 100 ng) y 2 (10 ng), y también SAP intacto residual y el fragmento del resto más largo de 1-158-homoserina-lactona en SAP escindido por CNBr en los carriles 3 (600 ng), 4 (130 ng) y 5 (64 ng). El carril 6 contenía CRP humana aislada pura con la que no reaccionó ninguno de los 5-SAP. **C**, análisis SDS-PAGE de SAP digerido con quimiotripsina. Panel izquierdo: Tinción con azul de Coomassie; carril 1, SAP de control no tratado; carril 2, SAP después de la digestión con quimiotripsina, mostrando los fragmentos principales esperados correspondientes a los restos 1-140 y 145-204. Esto se confirmó exactamente por espectrometría de masas. Panel derecho: transferencia de Western con SAP-E mostrando tinción intensa de SAP no tratado intacto en los carriles 1 (cargados con 500 ng) y 2 (100 ng), y también SAP intacto residual en los carriles 3 y 4 que contenían SAP digerido con quimiotripsina a diferentes cargas. Solo se observó una unión muy débil de SAP-E al resto del fragmento 1-140 en el carril 3 que estaba más fuertemente cargado. Los carriles 5 (500 ng) y 6 (100 ng) contenían CRP humana pura aislada con la que SAP-E no reaccionó del todo. **D**, Comparación de secuencia entre SAP humano (h) y SAP de ratón (m) para los restos 136-147. Panel superior, diferencias indicadas anteriormente por restos mostrados en negrita en la secuencia murina. Panel inferior, posición de este bucle extendido con 140Y en su ápice mostrando en blanco la estructura subunitaria en 3D de SAP humano. Los restos diferentes en la secuencia murina se muestran en negrita. Las esferas en gris representan los átomos de calcio unidos en la cavidad de unión al ligando.

El epítipo conformacional reconocido por SAP-K se identificó por tecnología CLIPS® de mapeo epitópico (Pepscan Presto BV) y el bucle periférico expuesto, restos 121-131, en la circunferencia de la molécula de SAP original pentamérica de tipo disco.

La Figura 9 muestra la localización de los epítopes en el SAP humano reconocidos por SAP-K (A, destacado en negrita, como se determina mediante tecnología CLIPS®) y SAP-E (B, mostrado en blanco, 140-158 como se determina por los resultados de unión con el producto de escisión CNBr de SAP y el fragmento eliminado por digestión con quimiotripsina en ausencia de calcio).

5 Ejemplo 15: Eficacia de anticuerpo anti SAP humano monoclonal de ratón SAP-K en la eliminación de depósitos amiloides *in vivo* en el modelo de amiloidosis AA de ratón.

Se comparó la fuerza de SAP-K con la acción del anticuerpo policlonal de oveja convencional en la eliminación de depósitos amiloides AA sistémicos establecidos en ratones.

Inducción de amiloidosis AA y tratamiento

- 10 Se indujo y se confirmó la amiloidosis AA en ratones C57BL/6 silvestres como se ha detallado en el Ejemplo 10 anterior. Después de cargar los depósitos amiloides con SAP humano, también detallado en el Ejemplo 10, se trataron grupos de ratones con 50 mg de IgG total por ratón como la fracción de IgG completa (lote 2866) del antisero anti-SAP humano policlonal de oveja proporcionando una dosis de 7 mg de anticuerpo anti-SAP real, SAP-K purificado aislado a una dosis de 5 mg por ratón, SAP-K purificado aislado a una dosis de 1 mg por ratón y como
- 15 un control negativo, anticuerpo IgG2a de ratón monoclonal purificado aislado específico para un antígeno humano no relacionado y que no reacciona ni con SAP humano ni con ningún antígeno murino. Todos los ratones se sacrificaron 17 días después para calcular la carga amiloide por tinción con rojo Congo.

Resultados

- 20 Los ratones tratados con 5 mg de SAP-K mostraron la misma notable eliminación de depósitos amiloides esplénicos y hepáticos como se observa con la dosis de 7 mg de anticuerpo policlonal de oveja. Solamente motitas de amiloide permanecieron en los bazo de los ratones tratados y no se detectó ninguna de estas en la mayoría de los hígados, lo que contrasta fuertemente con los extensos depósitos amiloides esplénicos y hepáticos en todos los animales que recibieron el anticuerpo IgG2a de ratón de control irrelevante (Tabla 13). Con dosis más bajas de 1 mg, 0,5 mg y 0,1 mg (datos no mostrados para 0,5 mg y 0,1 mg) de SAP-K por ratón, no hubo efecto significativo.

25 **Tabla 13. Efecto del anticuerpo anti-SAP humano de IgG2a de ratón monoclonal en depósitos amiloides viscerales en ratones con amiloidosis AA sistémica.**

Grupo (tratamiento, tamaño del grupo)	Puntuación amiloide media, intervalo	
	Bazo	Hígado
1 (IgG2a de ratón control negativo, n=8)	4,08, 1,5-4,50	2,42, 2,0-2,67
2 (7 mg de anticuerpo anti-SAP humano de IgG policlonal de oveja, n=5)	1,17, 1,0-1,5	1,0, 0,67-1,17
3 (1 mg de anticuerpo anti-SAP humano de IgG2a de ratón monoclonal, SAP-K, n=10)	3,5, 2,83-4,5	1,83, 1,0-2,83
4 (5 mg de anticuerpo anti-SAP humano de IgG2a de ratón monoclonal, SAP-K, n=10)	1,25, 1,0-2,0	1,0, 1,0-1,33

Ensayo de Kruskal-Wallis: bazo, $P < 0,001$; hígado $P = 0,001$

Ensayos de Mann-Whitney*: 1 frente a 2, bazo, $P < 0,002$; hígado, $P = 0,002$; 1 frente a 3, bazo, $P = 0,173$; hígado, $P = 0,083$; 1 frente a 4, bazo, $P < 0,001$; hígado, $P < 0,001$; 2 frente a 3, hígado, $P = 0,0001$; hígado, $P = 0,019$; 2 frente a 4, bazo, $P = 0,513$; hígado, $P = 0,768$; 3 frente a 4, bazo, $P < 0,001$; hígado, $P = 0,004$. *Debido a las múltiples comparaciones, se necesita un valor significativo de P de 0,01 o inferior.

Discusión

- 30 Estos resultados demuestran la eficacia en la eliminación de depósitos amiloides *in vivo* de un anticuerpo anti-SAP humano monoclonal del isotipo IgG2a de ratón activador del complemento, que reconoce específicamente un epítipo conformacional. Por tanto, los anticuerpos anti-SAP humanos monoclonales, para su uso de acuerdo con la presente invención, pueden dirigirse predominantemente a epítipes de secuencia, tales como el anticuerpo SAP-E o a epítipes completamente conformacionales, tales como SAP-K.

35 **Ejemplo 16: Comparación de la eficacia de SAP-E y SA-K en la eliminación de depósitos amiloides AA sistémicos en ratones y cálculo de concentraciones de anticuerpo anti-SAP en plasma.**

Inducción de amiloidosis AA y tratamiento

- 40 Se indujo y se confirmó la amiloidosis AA en ratones C57BL/6 silvestres como se ha detallado en el Ejemplo 10 anterior. Después de cargar los depósitos amiloides con SAP humano, también detallado en el Ejemplo 10, se trataron grupos de ratones con 3 mg y 1 mg por ratón de los dos diferentes anticuerpos. Un grupo de control, en el que también se indujo amiloide, recibió solo PBS en lugar de anticuerpo y a los otros dos grupos se les proporcionó la dosis eficaz conocida de 5 mg/ratón de cada anticuerpo. A todos los ratones se les extrajo sangre para ensayar el

anticuerpo anti-SAP circulante los días 1, 5 y 15 después de la dosificación con el anticuerpo y todos se sacrificaron el día 21 para calcular la carga amiloide por tinción con rojo Congo. Todos los sueros se ensayaron para determinar la actividad anti-SAP usando un fuerte ensayo inmunoradiométrico normalizado con SAP-E y SAP-K purificados respectivamente, añadidos a concentraciones conocidas en suero de ratón normal.

5 Resultados

Cuatro expertos analistas independientes, que desconocían la identidad de cada tejido examinado, puntuaron la carga amiloide. Las puntuaciones de todos los analistas fueron, como de costumbre muy coincidentes y para el análisis estadístico, se sumaron las puntuaciones totales de todos los analistas del bazo e hígado de cada ratón. Los dos anticuerpos fueron eficaces, como se ha demostrado anteriormente, y hubo un claro efecto dependiente de la dosis aunque SAP-E fue aparentemente más fuerte que SAP-K a dosis inferiores.

Tabla 14. Comparación de la fuerza entre SAP-E y SAP-K en la eliminación de depósitos amiloides AA viscerales

Grupo (tratamiento, nº de ratón)	Puntuación amiloide, bazo más hígado media, intervalo
C (control negativo, solo PBS)	6,81, 4,25-8,0
K5 (5 mg de SAP-K, n=5)	2,25, 2,25-2,5
K3 (3 mg de SAP-K, n=10)	2,81, 2,0-4,25
K1 (1 mg de SAP-K, n=10)	5,63, 4,0-6,5
E5 (5 mg de SAP-E, n=5)	2,0, 1,5-2,38
E3 (3 mg de SAP-E, n=10)	2,5, 2,0-5,0
E1 (1 mg de SAP-E, n=10)	3,38, 2,5-5,63
Ensayo de Kruskal-Wallis: $P < 0,001$ Ensayos de Mann-Whitney*: K5 frente a E5 $P = 0,095$; K3 frente a E3, $P = 0,684$; K1 frente a E1, $P = 0,001$; K5 frente a K3, $P = 0,594$; K5 frente a K1, $P = 0,001$; K3 frente a K1, $P < 0,001$; E5 frente a E3, $P = 0,008$; E5 frente a E1, $P = 0,001$; E3 frente a E1, $P = 0,004$; K5 frente a C, $P = 0,001$; E5 frente a C, $P = 0,001$; K3 frente a C, $P < 0,001$; E3 frente a C, $P < 0,001$; K1 frente a C, $P = 0,043$; E1 frente a C, $P < 0,001$. *Debido a las múltiples comparaciones, se necesita un valor significativo de P de 0,01 o inferior	

Las concentraciones de actividad del anticuerpo anti-SAP circulante fueron fuerte y sistemáticamente dependientes después de la única dosis administrada a todos los animales, exceptuando un solo individuo aislado en cada uno de los grupos de dosis inferior. Generalmente, después de una dosis de 1 mg por ratón, en la mayoría de los ratones no pudo detectarse nada por encima del fondo incluso el día 1. Sin embargo, después de la dosis de 5 mg a los 15 días aún había anticuerpo abundante y después de 3 mg la mayoría de los ratones tenían anticuerpo circulante el día 5 pero poco después de 15 días (Tabla 15). No hubo diferencias significativas entre los patrones para SAP-E y SAP-K.

Tabla 15. Concentración en suero del anticuerpo anti-SAP después de una sola dosis intraperitoneal.

Grupo (dosis de anticuerpo anti-SAP)	Concentración de anti-SAP después de la dosificación media, intervalo ($\mu\text{g/ml}$)*		
	1 día	5 días	15 días
K5 (5 mg de SAP-K)	950, 840-1200	400, 300-480	45, 25-90
E5 (5 mg de SAP-E)	1000, 800-1500	600, 360-700	80, 15-113
K3 (3 mg de SAP-K)	240, 50-600	40, 8-280	8, 6-30
E3 (3 mg de SAP-E)	275, 4-480	48, 0-240	4, 2-68
K1 (1 mg de SAP-K)	7, 7-90	6, 5-38	4, 2-9
E1 (1 mg de SAP-E)	7, 6-280	7, 6-120	5, 3-12
C (solamente PBS)	5, 5-7	5, 5-13	5, 5-16
*Las concentraciones apreciables del anticuerpo anti-SAP por debajo de $17 \mu\text{g/ml}$ son de fondo para el ensayo y no representan actividad genuina.			

Discusión

En un estudio comparativo directo hubo pruebas coherentes de que SAP-E era ligera aunque significativamente más fuerte que SAP-K. Después de la administración de 1 mg por ratón la actividad de anticuerpo anti-SAP no circulante era detectable un día después, teniendo evidentemente todo localizado en el SAP humano dentro de los depósitos amiloides. Después de la dosis de 3 mg había abundante anti-SAP en la circulación el día 1 y todavía había el día 5. Después de 5 mg por ratón todavía había una concentración significativa de anti-SAP en la sangre después de 15 días. Estas observaciones sugieren que para inducir la eliminación amiloide pueden ser suficientes dosis pequeñas repetidas del anticuerpo anti-SAP.

Ejemplo 17: Comparación de la eficacia de SAP-E y SAP-K a dosis bajas en la eliminación de depósitos amiloides AA sistémicos en ratones

Inducción de amiloidosis AA y tratamiento

Se indujo y se confirmó la amiloidosis AA en ratones C57BL/6 silvestres como se ha detallado en el Ejemplo 10 anterior. Después cargar los depósitos amiloides con SAP humano, también detallado en el Ejemplo 10, se trataron grupos de ratones (n=10 cada uno) con dosis únicas de 0,5 mg y 1 mg por ratón de los dos anticuerpos diferentes, o 6 dosis repetidas de 0,15 mg, proporcionadas a intervalos de 3 o 4 días. Un grupo de control (n=9), en el que también se indujo amiloide, solo recibió PBS en lugar de anticuerpo y dos grupos más (n=3 cada uno) recibieron la dosis eficaz conocida de 5 mg/ratón de cada anticuerpo. Todos se sacrificaron el día 25 para calcular la carga amiloide por tinción con rojo de Congo.

Resultados

Las dosis bajas, incluyendo la dosis muy baja repetida, mostraron eficacia significativa en cuanto a la reducción de la carga amiloide, especialmente en el hígado, de nuevo SAP-E fue aparentemente más fuerte que SAP-K.

Tabla 16. Comparación de fuerza entre dosis bajas de SAP-E y SAP-K en cuanto a la eliminación de depósitos amiloides AA viscerales

Grupo	Puntuación amiloide, (media, intervalo)	
	Bazo	Hígado
C, control negativo solo PBS	4,5, 4,0-4,75	3,25, 2,0-4,0
E1, 1 mg de SAP-E	1,25, 1,0-4,25	1,0, 0,5-1,25
E0,5, 0,5 mg de SAP-E	4,75, 1,0-5,0	1,0, 0,5-3,5
Erep, 6x0,15 mg de SAP-E	3,5, 2,0-4,5	0,5, 0,0-3,25
K1, 1 mg de SAP-K	4,13, 1,0-5,0	1,0, 0,0-4,0
K0,5, 0,5 mg de SAP-K	4,25, 1,75-4,5	1,13, 0,0-2,75
Krep, 6x0,15 mg de SAP-K	4,38, 1,5-4,75	1,0, 0,0-2,25

Ensayo de Kruskal-Wallis: bazo, $P < 0,001$; hígado, $P = 0,001$

Ensayos de Mann-Whitney*: E1 frente a C: bazo, $P < 0,001$; hígado, $P < 0,001$; E0,5 frente a C: bazo, $P = 0,604$; hígado $P = 0,004$; Erep frente a C: bazo, $P = 0,002$; hígado, $P < 0,001$; K1 frente a C: bazo, $P = 0,065$; hígado, $P = 0,001$; K0,5 frente a C: bazo, $P = 0,022$; hígado, $P = 0,001$; Krep frente a C: bazo, $P = 0,079$; hígado, $P < 0,001$; E1 frente a E0,5: bazo, $P = 0,005$; hígado $P = 0,143$; E1 frente a Erep: bazo, $P = 0,043$; hígado, $P = 0,280$; E0,5 frente a Erep: bazo, $P = 0,019$; hígado, $P = 0,043$; K1 frente a K0,5: diferencias no significativas; K1 frente a Krep: diferencias no significativas; K0,5 frente a Krep: diferencias no significativas; E1 frente a K1: bazo, $P = 0,015$; hígado, $P = 0,353$; E0,5 frente a K0,5: diferencias no significativas; Erep frente a Krep: diferencias no significativas, *Debido a las múltiples comparaciones, se necesita un valor significativo de P de 0,01 o inferior.

Discusión

La fuerza significativamente mayor de SAP-con respecto a SAP-K parece ser reproducible. La eficacia incluso de dosis más bajas cuando se administra de manera repetida y la sugerencia de efectos mayores en depósitos amiloides hepáticos que en esplénicos es de interés y posible significado clínico.

Ejemplo 18: Activación del complemento por anticuerpos anti-SAP humanos monoclonales humanizados *in vitro*.

De acuerdo con la presente invención, la activación del complemento es esencial para la eficacia de la eliminación amiloide por anticuerpos anti-SAP humanos. La capacidad de los anticuerpos monoclonales humanizados, H1L1 de

- 5 SAP-E y H3L0 de SAP-K, para activar C3 en suero humano y de ratón se comparó *in vitro* añadiendo diferentes cantidades de los anticuerpos puros aislados al suero humano completo que contenía una concentración SAP de 30 mg/l o al suero de ratón completo que se había aumentado con SAP humano puro aislado a esta misma concentración. En ambos casos el suero era recién preparado y con suficiente complemento y las condiciones experimentales eran óptimas para la activación del complemento con tampón de ensayo de fijación de complemento (CFT) como diluyente.

Se realizaron las siguientes mezclas (Tabla 17):

Tubo nº	Suero	Anticuerpo anti-SAP monoclonal	Concentraciones finales (µg/ml)	
			Anti-SAP	SAP Humano
M1	SAP de ratón + humano	H1L1 de SAP-E	15	30
M2	SAP de ratón + humano	H1L1 de SAP-E	30	30
M3	SAP de ratón + humano	H1L1 de SAP-E	60	30
M4	SAP de ratón + humano	H1L1 de SAP-E	120	30
M5	SAP de ratón + humano	H3L0 de SAP-K	15	30
M6	SAP de ratón + humano	H3L0 de SAP-K	30	30
M7	SAP de ratón + humano	H3L0 de SAP-K	60	30
M8	SAP de ratón + humano	H3L0 de SAP-K	120	30
M9	SAP de ratón + humano	Ninguno	0	30
H1	humano	H1L1 de SAP-E	15	30
H2	humano	H1L1 de SAP-E	30	30
H3	humano	H1L1 de SAP-E	60	30
H4	humano	H1L1 de SAP-E	120	30
H5	humano	H3L0 de SAP-K	15	30
H6	humano	H3L0 de SAP-K	30	30
H7	humano	H3L0 de SAP-K	60	30
H8	humano	H3L0 de SAP-K	120	30
H9	humano	Ninguno	0	30

- 10 Todos los tubos se incubaron a 37°C durante 2 horas para permitir que se produjera la activación del complemento. Dado que siempre se produce la activación espontánea lenta en suero, se proporcionaron dos controles adicionales, repeticiones de M9 y H9, denominados M10 y H10, que no se incubaron sino que se congelaron a -80°C inmediatamente después de mezclar y después se descongelaron justo antes de ensayar la escisión de C3. La comparación entre M/H9 y M/H10 permite distinguir entre escisión de C3 espontánea y cualquier activación adicional producida por el anticuerpo anti-SAP así como cualquier efecto de adición de SAP humano solo en suero de ratón.

- 15 La escisión C3 en suero humano se ensayó por electroinmunoforesis bidimensional usando anticuerpo monoespecífico contra C3 humano. Este procedimiento es de baja sensibilidad para la escisión de C3 de ratón porque las diferentes movilidades electroforéticas de C3 de ratón son más difíciles de diferenciar de manera fiable que en el caso de C3 humano. La escisión de C3 de ratón se ensayó por lo tanto mediante electroforesis en gel de agarosa seguido de inmunotransferencia con el anticuerpo anti-C3 de ratón monoespecífico.

20 Resultados

Los dos anticuerpos humanizados activaron de manera eficaz el complemento humano, lo cual se probó por una escisión de C3 dependiente de la dosis principal, una producción en la reducción del tamaño del pico de inmunoprecipitación de C3 original de menor movilidad y aumento del tamaño del pico de C3c escindido más rápido. (Figura 10).

- 25 La Figura 10 muestra la activación de C3 por anticuerpos anti-SAP humanos monoclonales humanizados en suero humano completo.

En un ensayo que incluye el control para la escisión de C3 inicial en la muestra H10, es evidente que incluso la dosis más baja de los dos anticuerpos anti-SAP produce más escisión de C3 que la observada en el control, sin anticuerpo, de escisión espontánea (Figura 11).

- 30 La Figura 11 muestra la activación de C3 por anticuerpos anti-SAP humanos monoclonales humanizados a dosis bajas en suero humano completo.

Se obtuvieron resultados muy similares para la escisión de C3 de ratón en suero de ratón completo complementado con SAP humano. Los dos anticuerpos mostraron escisión dependiente de la dosis de C3 de ratón original lo que conduce a una intensidad disminuida de la banda de C3 original de movilidad lenta y a una intensidad aumentada de la forma activada de movilidad más rápida. Incluso también la dosis más baja de cada anticuerpo produjo más escisión de C3 que la observada en el control de activación espontánea sin anticuerpo (Figura 12).

5

La Figura 12 muestra la activación de C3 por anticuerpos anti-SAP humanos monoclonales humanizados en suero de ratón completo complementado con SAP humano puro.

Discusión

Los dos anticuerpos anti-SAP humanos monoclonales humanizados activan eficazmente el complemento en presencia de SAP humano y son por tanto candidatos adecuados para su uso en el tratamiento de amiloidosis sistémica y cualquier otra enfermedad producida por depósitos amiloides extracelulares en los tejidos, de acuerdo con la presente invención.

10

CONCORDANCIA DE SECUENCIAS

SEQ ID NO	Descripción de la secuencia
1	Secuencia de aminoácidos de CDRH1 de SAP-E
2	Secuencia de aminoácidos de CDRH2 de SAP-E
3	Secuencia de aminoácidos de CDRH3 de SAP-E
4	Secuencia de aminoácidos de CDRL1 de SAP-E
5	Secuencia de aminoácidos de CDRL2 de SAP-E
6	Secuencia de aminoácidos de CDRL3 de SAP-E
7	Secuencia de aminoácidos de V _H de SAP-E
8	Secuencia de ADN de V _H de SAP-E
9	Secuencia de aminoácidos de V _L de SAP-E
10	Secuencia de ADN de V _L de SAP-E
11	Secuencia de aminoácidos de CDRH1 de SAP-K
12	Secuencia de aminoácidos de CDRH2 de SAP-K
13	Secuencia de aminoácidos de CDRH3 de SAP-K
14	Secuencia de aminoácidos de CDRL1 de SAP-K
15	Secuencia de aminoácidos de CDRL2 de SAP-K
16	Secuencia de aminoácidos de CDRL3 de SAP-K
17	Secuencia de aminoácidos de V _H de SAP-K
18	Secuencia de ADN de V _H de SAP-K
19	Secuencia de aminoácidos de V _L de SAP-K
20	Secuencia de ADN de V _L de SAP-K
21	Secuencia de aminoácidos de la quimera de V _H de SAP-E
22	Secuencia de aminoácidos de la quimera de V _L de SAP-E
23	Secuencia de aminoácidos de la quimera de V _H de SAP-K
24	Secuencia de aminoácidos de la quimera de V _L de SAP-K

(continuación)

SEQ ID NO	Descripción de la secuencia
25	Secuencia de aminoácidos aceptora de la línea germinal de la cadena pesada variable huma de IGHV1-69
26	Minigen JH1
27	Secuencia de aminoácidos de H0 de la variante de V _H humanizada de SAP-E
28	Secuencia de aminoácidos de H1 de la variante de V _H humanizada de SAP-E
29	Secuencia de aminoácidos de H2 de la variante de V _H humanizada de SAP-E
30	Secuencia de aminoácidos de H3 de la variante de V _H humanizada de SAP-E
31	Secuencia de aminoácidos de H4 de la variante de V _H humanizada de SAP-E
32	Secuencia de aminoácidos aceptora de la línea germinal de la cadena ligera variable humana de IGKV1-39
33	Minigen JK2
34	Secuencia de aminoácidos de L0 de la variante de V _L humanizada de SAP-E
35	Secuencia de aminoácidos de L1 de la variante de V _L humanizada de SAP-E
36	Secuencia de aminoácidos de L2 de la variante de V _L humanizada de SAP-E
37	Secuencia de aminoácidos de H0 de la variante de V _H humanizada de SAP-K
38	Secuencia de aminoácidos de H1 de la variante de V _H humanizada de SAP-K
39	Secuencia de aminoácidos de H2 de la variante de V _H humanizada de SAP-K
40	Secuencia de aminoácidos de H3 de la variante de V _H humanizada de SAP-K
41	Secuencia de aminoácidos de L0 de la variante de V _L humanizada de SAP-K
42	Secuencia de aminoácidos de L1 de la variante de V _L humanizada de SAP-K
43	Secuencia de aminoácidos de SAP de Homo sapiens
44	Secuencia de aminoácidos de SAP de Mus musculus
45	Secuencia de nucleótidos de la quimera de VH de SAP-E
46	Secuencia de nucleótidos de la quimera de VL de SAP-E
47	Secuencia de nucleótidos de la quimera de VH de SAP-K
48	Secuencia de nucleótidos de la quimera de VL de SAP-K
49	Secuencia aceptora de nucleótidos de la línea germinal de la cadena pesada variable huma de IGHV1-69
50	Secuencia aceptora de nucleótidos de la línea germinal de la cadena pesada variable huma de IGHV1-39
51	Secuencia de nucleótidos de H0 de la variante de la región V de cadena pesada humanizada de SAP-E no optimizada por codones
52	Secuencia de nucleótidos de L0 de la variante de la región V de cadena ligera humanizada de SAP-E no optimizada por codones

(continuación)

SEQ ID NO	Descripción de la secuencia
53	Secuencia de nucleótidos de H0 de la variante de la región V de cadena pesada humanizada de SAP-E (optimizada por codones)
54	Secuencia de nucleótidos de H1 de la variante de la región V de cadena pesada humanizada de SAP-E (optimizada por codones)
55	Secuencia de nucleótidos de H2 de la variante de la región V de cadena pesada humanizada de SAP-E (optimizada por codones)
56	Secuencia de nucleótidos de H3 de la variante de la región V de cadena pesada humanizada de SAP-E (optimizada por codones)
57	Secuencia de nucleótidos de H4 de la variante de la región V de cadena pesada humanizada de SAP-E (optimizada por codones)
58	Secuencia de nucleótidos de L0 de la variante de la región V de cadena ligera humanizada de SAP-E (optimizada por codones)
59	Secuencia de nucleótidos de L1 de la variante de la región V de cadena ligera humanizada de SAP-E no optimizada por codones
60	Secuencia de nucleótidos de L2 de la variante de la región V de cadena ligera humanizada de SAP-E (optimizada por codones)
61	Secuencia madura completa de nucleótidos de H1 de cadena pesada humanizada de SAP-E (optimizada por codones)
62	Secuencia madura completa de aminoácidos de H1 de cadena pesada humanizada de SAP-E
63	Secuencia madura completa de nucleótidos de L1 de cadena ligera humanizada de SAP-E (optimizada por codones)
64	Secuencia madura completa de aminoácidos de L1 de cadena ligera humanizada de SAP-E
65	Secuencia de nucleótidos de H0 de la variante de la región V de cadena pesada humanizada de SAP-K no optimizada por codones
66	Secuencia de nucleótidos de L0 de la variante de la región V de cadena ligera humanizada de SAP-K no optimizada por codones
67	Secuencia de nucleótidos de H0 de la variante de la región V de cadena pesada humanizada de SAP-K (optimizada por codones)
68	Secuencia de nucleótidos de H1 de la variante de la región V de cadena pesada humanizada de SAP-K (optimizada por codones)
69	Secuencia de nucleótidos de H2 de la variante de la región V de cadena pesada humanizada de SAP-K (optimizada por codones)
70	Secuencia de nucleótidos de H3 de la variante de la región V de cadena pesada humanizada de SAP-K (optimizada por codones)
71	Secuencia de nucleótidos de L0 de la variante de la región V de cadena ligera humanizada de SAP-K (optimizada por codones)
72	Secuencia de nucleótidos de L1 de la variante de la región V de cadena ligera humanizada de SAP-K (optimizada por codones)
73	Secuencia de nucleótidos de L0 91A de la variante de la región V de cadena ligera humanizada de SAP-K (optimizada por codones)
74	Secuencia de aminoácidos de L0 91A de la variante de la región V de cadena ligera humanizada de SAP-K

(continuación)

SEQ ID NO	Descripción de la secuencia
75	Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada de H3 humanizada de SAP-K (optimizada por codones)
76	Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de H3 humanizada de SAP-K
77	Secuencia de nucleótidos de cadena ligera de L0 humanizada de SAP-K (optimizada por codones)
78	Secuencia de aminoácidos de cadena ligera de L0 humanizada de SAP-K
79	Secuencia de señal para cadenas de inmunoglobulina

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> Glaxo Group Limited Tejinder Kaur BHINDER Susannah Karen FORD Volker GERMASCHEWSKI Alan Peter LEWIS Mark PEPYS

<120> mab anti-SAP

10 <130> PB63944 WO

<150> 61/309957

<151> 03-03-2010

15 <160> 79

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

20 <210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia de *Mus musculus*

25 <220>

<223> Secuencia de aminoácidos de CDRH1 de SAP-E

<400> 1

Thr Tyr Asn Met His

1 5

30 <210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia de *Mus musculus*

35 <220>

<223> Secuencia de aminoácidos de CDRH2 de SAP-E

<400> 2

Tyr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asn Ala Asn Tyr Asn Gln Gln Phe Lys

1 5 10 15

40 **Gly**

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

45 <213> Secuencia de *Mus musculus*

<223> Secuencia de aminoácidos de CDRH3 de SAP-E

<400> 3

5

Gly Asp Phe Asp Tyr Asp Gly Gly Tyr Tyr Phe Asp Ser
1 5 10

$\langle 211 \rangle$ 11

10

<212> PRT

<213> Secuencia de *Mus musculus*

<223> Secuencia de aminoácidos de CDRL1 de SAP-E

15

<400> 4

Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

20

<210> 5

 $\langle 211 \rangle$ 7

<212> PRT

<213> Secuencia de *Mus musculus*

25

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de CDRL2 de SAP-E

<400> 5

Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu
1 5

30

$\langle 211 \rangle$ 9

$\langle 212 \rangle$ P

<213> Secu

35

<213> Secuencia de *Mus musculus*

<223> Secuencia de aminoácidos de CDRL3 de SAP-E

<223> Secuencia de aminoácidos de CDRL3 de SAP-E

40

<400> 6

Gln His His Tyr Gly Ala Pro Leu Thr
1 5

45

 $\langle 211 \rangle$ 13

$\langle 211 \rangle$ 120

<212> PRT

<213> Secuencia de *Mus musculus*

<223> Secuencia de aminoácidos de VH de SAP-E

50

<223> Secuencia de aminoácidos de VH de SAP-E

<400> 7

[illegible]

<210> 8
<211> 366
<212> ADN
<213> Secuencia de *Mus musculus*

<220>
<223> Secuencia de ADN de VH de SAP-E
<400> 8

caggcttctc	tacagcagtc	tgggactgag	ctggtgaggt	ctggggcctc	agtgaagatg	60
tctctgaagg	cttctggctt	cacatttggc	acttacaata	tgcactggat	taagcagaca	120
cccggaacagg	gcttggaatg	gattgggtat	atttatcctg	gagatggtaa	tgctaactac	180
aatcagcagtc	tcaagggcaa	ggccacattg	actgcagaca	catcctccaa	cacagcctac	240
atgcagatca	gcagcctgac	atctgaagac	tctgcggtct	atttctgtgc	aagagggggac	300
tttgattacg	acggagggta	ctactttgac	tcttggggcc	agggcaccac	tctcacagtc	360
tcttca						366

<210> 9
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia de *Mus musculus*

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos de VL de SAP-E
<400> 9

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

<210> 10

<211> 321
 <212> ADN
 <213> Secuencia de *Mus musculus*

5 <220>
 <223> Secuencia de ADN de VL de SAP-E

<400> 10

```

gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgcat ctgtgggaga aactgtcacc 60
atcacatgtc gagcaagtga gaatatttac agttatttag catggtatca gcagaaacag 120
ggaagatccc ctcagctcct ggtccataat gcaaaaacct tagcagaagg tgtgccatca 180
agggtcagtg gcagtggatc aggcacacac ttttctctga agatcaacgg cctgcagcct 240
gaagattttg ggaattatta ctgtcaacat cattatgggtg ctccgctcac gttcggtgct 300
gggaccaagc tggaactgaa a                                     321
  
```

10

<210> 11
 <211> 5
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia de *Mus musculus*

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de CDRH1 de SAP-K

20 <400> 11

```

                Ser Tyr Trp Met His
                  1             5
  
```

25 <210> 12
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia de *Mus musculus*

30 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de CDRH2 de SAP-K

<400> 12

```

Met Ile His Pro Asn Ser Val Asn Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
  1             5             10             15
Ser
  
```

35 <210> 13
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia de *Mus musculus*

40 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de CDRH3 de SAP-K

<400> 13

45

```

Arg Asn Asp Tyr Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
  1             5             10
  
```

50 <210> 14
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia de *Mus musculus*

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de CDRL1 de SAP-K

<400> 14

Lys Ala Ser Gln Asn Val Asn Ser Asn Val Ala
1 5 10

5 <210> 15
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia de *Mus musculus*

10 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos de CDRL2 de SAP-K

<400> 15

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser
1 5

15 <210> 16
<211> 9
20 <212> PRT
<213> Secuencia de *Mus musculus*

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos de CDRL3 de SAP-K

25 <400> 16

Gln Gln Cys Asn Asn Tyr Pro Phe Thr
1 5

30 <210> 17
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia de *Mus musculus*

35 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos de VH de SAP-K

<400> 17

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

40 <210> 18
<211> 357
<212> ADN
45 <213> Secuencia de *Mus musculus*

<220>

<223> Secuencia de AND de VH de SAP-K

<400> 18

5

```
caggccaac tgcagcagcc tggggctgag ctgataaagc ctgggggttc agtgaagttg 60
tcctgcaagg cttctggcta cactttcacc agctactgga tgcactgggt gaagcagagg 120
cctggacaag gccttgagtg gattggaatg attcatccta atagtgttaa tactaactac 180
aatgagaagt tcaagagtaa ggccacactg actgtagaca aatcctccag cacagcctac 240
atgcaactca acagcctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagacggaat 300
gattactact ggtacttcga tgtctggggc acagggacca cggtcacogt ctctca 357
```

<210> 19

<211> 107

10

<212> PRT

<213> Secuencia de *Mus musculus*

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de VL de SAP-K

15

<400> 19

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

20

<210> 20

<211> 321

<212> ADN

<213> Secuencia de *Mus musculus*

25

<220>

<223> Secuencia de AND de VL de SAP-K

<400> 20

30

```
gacattgtga tgaccagtc tcaaaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 60
gtcacctgca aggcagtc gaattgtgaat tctaattgtag cctgggtatca acagaaacca 120
gggcaatctc ctaaagcact gatttactcg gcttcctacc ggtacagtgg agtccctgat 180
cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcaccaa tgtgcagtc 240
gaagacttgg cagagtattt ctgtcagcaa tgtaacaact atccattcac gttcggctcg 300
gggacaaagt tggaataaaa a 321
```

<210> 21

<211> 444

<212> PRT

35

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de la quimera de VH de SAP-E

40

<400> 21

```

Gln Ala Ser Leu Gln Gln Ser Gly Thr Glu Leu Val Arg Ser Gly Ala
 1      5      10      15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ala Thr Tyr
      20      25      30
Asn Met His Trp Ile Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
      35      40      45
Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asn Ala Asn Tyr Asn Gln Gln Phe
      50      55      60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Asn Thr Ala Tyr
65      70      75      80
Met Gln Ile Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
      85      90      95
Arg Asp Phe Asp Tyr Asp Gly Gly Tyr Tyr Phe Asp Ser Trp Gly Gln
      100      105      110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
      115      120      125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
      130      135      140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145      150      155      160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
      165      170      175
Leu Gln Ser Ser Gly Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
      180      185      190
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
      195      200      205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210      215      220
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225      230      235      240
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
      245      250      255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
      260      265      270
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
      275      280      285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Tyr Val Val Ser Val
290      295      300
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305      310      315      320
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
      325      330      335
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
      340      345      350
Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
      355      360      365
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370      375      380
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385      390      400
Gly Ser Phe Phe Lys Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
      405      410      415
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
      420      425      430
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
      435      440

```

5 <210> 22
 <211> 214
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de la quimera de VL de SAP-E

5

<400> 22

```

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

```

10

<210> 23

<211> 443

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de la quimera de VH de SAP-K

<400> 23

20

Gln 1	Val	Gln	Leu	Gln 5	Gln	Pro	Gly	Ala	Glu 10	Leu	Ile	Lys	Pro	Gly 15	Ala
Ser	Val	Lys	Leu 20	Ser	Cys	Lys	Ala 25	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe 30	Thr	Ser	Tyr
Trp	Met	His 35	Trp	Val	Lys	Gln 40	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly 45	Leu	Glu	Trp	Ile
Gly	Met 50	Ile	His	Pro	Asn 55	Ser	Val	Asn	Thr	Asn 60	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe
Lys 65	Ser	Lys	Ala	Thr 70	Leu	Thr	Val	Asp	Lys 75	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr 80
Met	Gln	Leu	Asn 85	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp 90	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr 95	Cys
Ala	Arg	Arg	Asn 100	Asp	Tyr	Tyr	Trp	Tyr 105	Phe	Asp	Val	Trp	Gly 110	Thr	Gly
Thr	Leu 115	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala 120	Ser	Thr	Lys	Gly 125	Pro	Ser	Val	Phe
Pro	Leu 130	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys 135	Ser	Thr	Ser	Gly 140	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu
Gly 145	Cys	Leu	Val	Lys 150	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu 155	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp 160
Asn	Ser	Gly	Ala 165	Leu	Thr	Ser	Gly	Val 170	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val 175	Leu
Gln	Ser	Ser	Gly 180	Ser	Leu	Ser	Ser 185	Val	Val	Thr	Val 190	Pro	Ser	Ser	Ser
Leu	Gly 195	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile 200	Cys	Asn	Val	Asn	His 205	Lys	Pro	Ser	Asn
Thr	Lys 210	Val	Asp	Lys	Lys	Val 215	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys 220	Asp	Lys	Thr	His
Thr 225	Cys	Pro	Pro	Cys 230	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu 235	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val 240
Phe	Leu	Phe	Pro 245	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp 250	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg 255	Thr
Pro	Glu	Val	Thr 260	Cys	Val	Val	Val 265	Asp	Val	Ser	His 270	Glu	Asp	Pro	Glu
Val	Lys 275	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val 280	Asp	Gly	Val	Glu	Val 285	His	Asn	Ala	Lys
Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Tyr	Val	Val	Ser	Val	Leu
	290					295					300				
Thr 305	Val	Leu	His 310	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly 315	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys 320
Val	Ser	Asn	Lys 325	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile 330	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys 335
Ala	Lys	Gly	Gln 340	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln 345	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser
Arg	Asp	Glu 355	Leu	Thr	Lys	Asn 360	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys 365	Leu	Val	Lys
Gly	Phe 370	Tyr	Pro	Ser	Asp 375	Ile	Ala	Val	Glu 380	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln
Pro 385	Glu	Asn	Asn 390	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro 395	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly 400
Ser	Phe	Phe	Lys 405	Lys	Leu	Thr	Val	Asp 410	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly 415
Asn	Val	Phe	Ser 420	Cys	Ser	Val	Met	His 425	Glu	Ala	Leu	His 430	Asn	His	Tyr
Thr	Gln 435	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser 440	Pro	Gly	Lys					

```
<210> 24
<211> 214
<212> PRT
```

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de la quimera de VL de SAP-K

5

<400> 24

```

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

```

10

<210> 25

<211> 98

<212> PRT

<213> Secuencia de *Homo sapiens*

15

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos aceptora de la línea germinal de la cadena pesada variable humana de IGHV1-69

<400> 25

20

```

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1           5           10           15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
          20           25           30
Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
          35           40           45
Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Thr Ala Gln Lys Phe
50           55           60
Gln Gly Arg Val Thr Ile 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 Tyr Cys
          85           90           95
Ala Arg

```

<210> 26

<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia de *Homo sapiens*

5 $\langle 220 \rangle$
 $\langle 223 \rangle$ Minigen JH1

<400> 26

10 Ala Glu Tyr Phe Gln His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
1 5 10 15
Ser

```
<210> 27
<211> 120
<212> PRT
```

15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos de H0 de la variante de VH humanizada de SAP-E

20 <400> 27

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

<210> 28
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <211> 120
 <212> PRT

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos de H1 de la variante de VH humanizada de SAP-E

30 <223> Secuencia de aminoácidos de H1 de la variante de VH humanizada de SAP-E

<400> 28

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

<210> 29

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de H2 de la variante de VH humanizada de SAP-E

<400> 29

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

<210> 30

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de H3 de la variante de VH humanizada de SAP-E

<400> 30

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

<210> 31
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de H4 de la variante de VH humanizada de SAP-E
 <400> 31

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ala	Thr	Tyr
			20				25						30		
Asn	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
		35					40					45			
Gly	Tyr	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asp	Gly	Asn	Ala	Asn	Tyr	Asn	Gln	Gln	Phe
	50					55					60				
Lys	Gly	Arg	Ala	Thr	Leu	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	
Arg	Asp	Phe	Asp	Tyr	Asp	Gly	Gly	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Ser	Trp	Gly	Gln
			100					105					110		
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
		115					120								

<210> 32
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> Secuencia de *Homo sapiens*

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos aceptora de la línea germinal de la cadena variable humana de IGKV1-39
 <400> 32

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5					10					15	
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser	Ser	Tyr
			20					25					30		
Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
		35					40					45			

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro
85 90 95

<210> 33
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia de *Homo sapiens*

<220>
<223> Minigen JK2

<400> 33

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 34
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos de L0 de la variante de VL humanizada de SAP-E

<400> 34

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 Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Ala Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 35
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos de L1 de la variante de VL humanizada de SAP-E

<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 Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr
20           25           30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35           40           45
His Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50           55           60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Ala Pro Leu
85           90           95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100           105

```

<210> 36
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de L2 de la variante de VL humanizada de SAP-E
 <400> 36

```

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 Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr
20           25           30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Val
35           40           45
His Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50           55           60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Ala Pro Leu
85           90           95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100           105

```

<210> 37
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de H0 de la variante de VH humanizada de SAP-K
 <400> 37

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

<210> 38
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de H1 de la variante de VH humanizada de SAP-K

<400> 38

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

<210> 39
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de H2 de la variante de VH humanizada de SAP-K

<400> 39

```

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

```

<210> 40

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de H3 de la variante de VH humanizada de SAP-K

<400> 40

```

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

```

<210> 41

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de L0 de la variante de VL humanizada de SAP-K

<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 Lys Ala Ser Gln Asn Val Asn Ser Asn
          20           25           30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
          35           40           45
Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50           55           60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Cys Asn Asn Tyr Pro Phe
          85           90           95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
          100           105

```

<210> 42

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de L1 de la variante de VL humanizada de SAP-K

<400> 42

```

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 Lys Ala Ser Gln Asn Val Asn Ser Asn
          20           25           30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ala Leu Ile
          35           40           45
Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50           55           60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Cys Asn Asn Tyr Pro Phe
          85           90           95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
          100           105

```

<210> 43

<211> 204

<212> PRT

<213> Secuencia de *Homo sapiens*

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de SAP de *Homo sapiens*

<400> 43

```

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

```

<210> 44

<211> 203

<212> PRT

<213> Secuencia de *Mus musculus*

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de SAP de *Mus musculus*

<400> 44

```

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

```

			115				120				125				
Pro	Ser	Ile	Val	Leu	Gly	Gln	Glu	Gln	Asp	Asn	Tyr	Gly	Gly	Gly	Phe
	130					135					140				
Gln	Arg	Ser	Gln	Ser	Phe	Val	Gly	Glu	Phe	Ser	Asp	Leu	Tyr	Met	Trp
145					150					155					160
Asp	Tyr	Val	Leu	Thr	Pro	Gln	Asp	Ile	Leu	Phe	Val	Tyr	Arg	Asp	Ser
				165					170					175	
Pro	Val	Asn	Pro	Asn	Ile	Leu	Asn	Trp	Gln	Ala	Leu	Asn	Tyr	Glu	Ile
			180					185					190		
Asn	Gly	Tyr	Val	Val	Ile	Arg	Pro	Arg	Val	Trp					
		195					200								

<210> 45
<211> 1356
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de nucleótidos de la quimera de VH de SAP-E

<400> 45

caggcttctc	tacacagctc	tgggactgag	ctggtgaggt	ctggggcctc	agtgaagatg	60
tcctgcaagg	cttctggctt	cacatttgcc	acttacaata	tgcactggat	taagcagaca	120
cccgacaggg	gcctggaatg	gattgggtat	atttatcctg	gagatggtaa	tgctaactac	180
aatcagcagt	tcaagggcaa	ggccacattg	actgcagaca	catcctccaa	cacagcctac	240
atgcagatca	gcagcctgac	atctgaagac	tctgcggtct	atttctgtgc	aagagggggac	300
tttgattacg	acggagggtg	ctactttgac	tcctggggcc	agggcacact	agtgaccgtg	360
tccagcgcca	gcaccaaggg	cccagcgtg	ttccccctgg	ccccagcag	caagagcacc	420
agcggcgcca	cagcgcctt	gggtgcctg	gtgaaggact	acttccccga	accggtgacc	480
gtgtcctgga	acagcggagc	cctgaccagc	ggcgtgcaca	ccttccccgc	cgtgctgcag	540
agcagcgcc	tgtacagcct	gagcagcgtg	gtgaccgtgc	ccagcagcag	cgtgggcacc	600
cagacctaca	tctgtaacgt	gaaccacaag	cccagcaaca	ccaaggtgga	caagaaggtg	660
gagcccaaga	gctgtgacaa	gacccacacc	tgccccccct	gccttgcccc	cgagctgctg	720
ggaggcccca	gcgtgttctt	gttccccccc	aagcctaagg	acacctgat	gatcagcaga	780
acccccgagg	tgacctgtgt	ggtggtggat	gtgagccacg	aggacctga	ggtgaagttc	840
aactggtacg	tggacggcgt	ggaggtgcac	aatgccaa	ccaagcccag	ggaggagcag	900
tacaacagca	cctaccgggt	ggtgtccgtg	ctgaccgtgc	tgcaccagga	ttggtgaac	960
ggcaaggagt	acaagtgtaa	ggtgtccaac	aaggccctgc	ctgcccctat	cgagaaaacc	1020
atcagcaagg	ccaagggcca	gccagagag	cccaggtgt	acacctgcc	ccctagcaga	1080
gatgagctga	ccaagaacca	ggtgtccctg	acctgcctgg	tgaagggctt	ctaccccagc	1140
gacatcgccg	tggagtggga	gagcaacggc	cagcccga	acaactacaa	gaccaccccc	1200
cctgtgctgg	acagcgatgg	cagctctctt	ctgtacaga	agctgaccgt	ggacaagagc	1260
agatggcagc	aggggcaacgt	gttcagctgc	tccgtgatgc	acgaggccct	gcacaatcac	1320
tacaccaga	agagcctgag	cctgtccctt	ggcaag			1356

<210> 46
<211> 642
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de nucleótidos de la quimera de VL de SAP-E

<400> 46

```

gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgcat ctgtgggaga aactgtcacc 60
atcacatgtc gagcaagtga gaatatttac agttatttag catggtatca gcagaaacag 120
ggaagatccc ctgagctcct ggtccataat gcaaaaacct tagcagaagg tgtgccatca 180
agggtcagtg gcagtggatc aggcacacac ttttctctga agatcaacgg cctgcagcct 240
gaagattttg ggaattatta ctgtcaacat cattatgggtg ctccgctcac gttcgggtgct 300
gggaccaagc tggaactgaa acgtacgggtg gccgccccca gcgtgttcat cttccccccc 360
agcgatgagc agctgaagag cggcaccgcc agcgtgggtg gtctgctgaa caacttctac 420
ccccgggagg ccaaggtgca gtggaagggtg gacaatgccc tgcagagcgg caacagccag 480

```

```

gagagcgtga ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag caccctgacc 540
ctgagcaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gtgaggtgac ccaccagggc 600
ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac cggggcgagt gc 642

```

<210> 47
 <211> 1347
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de nucleótidos de la quimera de VH de SAP-K

<400> 47

```

cagggtccaac tgcagcagcc tggggctgag ctgataaagc ctggggcttc agtgaagttg 60
tcttgcaagg cttctggcta cactttcacc agctactgga tgcactgggt gaagcagagg 120
cctggacaag gccttgagtg gattggaatg attcatccta atagtgttaa tactaactac 180
aatgagaagt tcaagagtaa ggccacactg actgtagaca aatcctccag cacagcctac 240
atgcaactca acagcctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagacggaat 300
gattactact ggtacttoga tgtctggggc acagggacac tagtgaccgt gtccagcgcc 360
agcaccaagg gccccagcgt gttccccctg gccccagca gcaagagcac cagcggcggc 420
acagccgccc tgggctgcct ggtgaaggac tacttccccg aaccggtgac cgtgtcctgg 480
aacagcggag coctgaccag cggcgtgcac accttccccg ccgtgctgca gagcagcggc 540
ctgtacagoc tgagcagcgt ggtgaccgtg cccagcagca gcctgggcac ccagacctac 600
atctgttaac agaaccacaa gccagcaac accaaggtgg acaagaaggt ggagcccaag 660
agctgtgaca agaccacac ctgccccccc tgccctgccc ccgagctgct gggaggcccc 720
agcgtgttcc tgttcccccc caagcctaag gacaccctga tgatcagcag aacccccgag 780
gtgacctgtg tgggtggtgga tgtgagccac gaggaccctg aggtgaagtt caactggtac 840
gtggacggcg tggaggtgca caatgccaa accaagccca gggaggagca gtacaacagc 900
acctaccggg tgggtgtccgt gctgaccgtg ctgcaccagg attggctgaa cggcaaggag 960
tacaagtgtg aggtgtccaa caaggccctg cctgccccta tcgagaaaac catcagcaag 1020
gccaaaggcc agccagaga gccccaggtg tacaccctgc ccctagcag agatgagctg 1080
accaagaacc aggtgtccct gacctgcctg gtgaagggtc tctaccccag cgacatcgcc 1140
gtggagtggg agagcaacgg ccagcccag aacaactaca agaccacccc coctgtgctg 1200
gacagcgatg gcagcttctt cctgtacagc aagctgaccg tggacaagag cagatggcag 1260
cagggcaacg tgttcagctg ctccgtgatg cacgaggccc tgcacaatca ctacaccag 1320
aagagcctga gcctgtcccc tggcaag 1347

```

<210> 48
 <211> 642
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de nucleótidos de la quimera de VL de SAP-K

<400> 48

```

gacattgtga tgaccagtc tcaaaaatto atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 60
gtcacctgca aggccagtc gaattgtgaac tctaattgtag cctgggtatca acagaaacca 120
gggcaatctc ctaaagcact gatttactcg gcttcctacc ggtacagtgg agtccctgat 180
cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcaccaa tgtgcagtc 240
gaagacttgg cagagtattt ctgtcagcaa tgtaacaact atccattcac gttcggctcg 300
gggacaaagt tggaaataaa acgtacgggtg gccgccccca gcgtgttcat cttccccccc 360
agcgatgagc agctgaagag cggcacggcc agcgtggtgt gtctgctgaa caacttctac 420
ccccgggagg ccaagggtgca gtggaagggtg gacaatgcc tgcagagcgg caacagccag 480
gagagcgtga ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag caccctgacc 540
ctgagcaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gtgaggtgac ccaccagggc 600
ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac cggggcgagt gc 642

```

<210> 49

<211> 294

<212> ADN

<213> Secuencia de *Homo sapiens*

<220>

<223> Secuencia de nucleótidos aceptora de la línea germinal de la cadena pesada variable humana de IGHV1-69

<400> 49

```

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggagg caccttcagc agctatgcta tcagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggg atcatccta tctttggtac agcaaactac 180
gcacagaagt tccagggcag agtcacgatt accgcgga aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gaga 294

```

<210> 50

<211> 285

<212> ADN

<213> Secuencia de *Homo sapiens*

<220>

<223> Secuencia de nucleótidos aceptora de la línea germinal de la cadena pesada variable humana de IGHV1-39

<400> 50

```

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attgggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatocagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta ccct 285

```

<210> 51

<211> 366

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de nucleótidos de H0 de la variante de región V de la cadena pesada humanizada de SAP-E no optimizada por codones

<400> 51

```

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggagg caccttcagc acttacaata tgcactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatat atttatcctg gagatggtaa tgctaaactac 180
aatcagcagt tcaagggcag agtcacgatt accgcggaaca aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagaggggac 300
tttgattacg acggagggta ctactttgac tcctggggcc agggcaccct ggtcacccgc 360
tcctca

```

<210> 52

<211> 321

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia de nucleótidos de L0 de la variante de región V de la cadena ligera humanizada de SAP-E no optimizada por codones

<400> 52

```

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gagcaagtga gaatatattac agttatttag catgggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctataat gcaaaaacct tagcagaagg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacat cattatgggtg ctccgctcac gtttggccag 300
gggaccaagc tggagatcaa a

```

15

<210> 53

<211> 366

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Secuencia de nucleótidos de H0 de la variante de región V de la cadena pesada humanizada de SAP-E (optimizada por codones)

25

<400> 53

```

caggtgcagc tgggtgcagag cggcgccgag gtgaagaaac ccggcagcag cgtgaagggtg 60
agctgcaagg ctagcggggg caccttctcc acctacaaca tgcactgggt caggcaggca 120
cccgccagg gcctggagtg gatgggctat atctaccccg gcgacggcaa cgccaactac 180
aaccagcagt tcaagggcag ggtgaccatc accgcccaga agagcaccag caccgcctac 240
atggaactga gcagcctgag gagcgaggat accgcccgtgt actactgcgc caggggagac 300
ttcgactacg acggcggcta ctacttcgac agctggggac agggcacact agtgaccgtg 360
tcacag

```

30

<210> 54

<211> 366

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Secuencia de nucleótidos de H1 de la variante de región V de cadena pesada humanizada de SAP-E (optimizada por codones)

<400> 54

```

caggtgcagc tgggtgcagag cggcgccgag gtgaagaaac ccggcagcag cgtgaagggtg 60
agctgcaagg ctagcggggtt caccttcgcc acctacaaca tgcactgggt caggcaggca 120
cccgccaggg gcctggagtg gatgggctat atctaccccg gcgacggcaa cgccaactac 180
aaccagcagt tcaagggcag ggtgaccatc accgcgcaca agagcaccag caccgcctac 240
atggaactga gcagcctgag gagcgaggat accgcggtgt actactgcgc caggggcgac 300
ttcgactacg acggcgggcta ctacttcgac agctgggggac agggcacact agtgaccgtg 360
tccagc                                     366

```

<210> 55

<211> 366

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia de nucleótidos de H2 de la variante de región V de cadena pesada humanizada de SAP-E (optimizada por codones)

<400> 55

```

cagggcgagc tgggtgcagag cggcgccgag gtgaagaaac ccggcagcag cgtgaagggtg 60
agctgcaagg ctagcggggtt caccttcgcc acctacaaca tgcactgggt caggcaggca 120
cccgccaggg gcctggagtg gatgggctat atctaccccg gcgacggcaa cgccaactac 180
aaccagcagt tcaagggcag ggtgaccatc accgcgcaca agagcaccag caccgcctac 240
atggaactga gcagcctgag gagcgaggat accgcggtgt actactgcgc caggggcgac 300
ttcgactacg acggcgggcta ctacttcgac agctgggggac agggcacact agtgaccgtg 360
tccagc                                     366

```

15

<210> 56

<211> 366

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Secuencia de nucleótidos de H3 de la variante de región V de la cadena pesada humanizada de SAP-E (optimizada por codones)

<400> 56

25

```

caggtgcagc tgggtgcagag cggcgccgag gtgaagaaac ccggcagcag cgtgaagggtg 60
agctgcaagg ctagcggggtt caccttcgcc acctacaaca tgcactgggt caggcaggca 120
cccgccaggg gcctggagtg gatcggctat atctaccccg gcgacggcaa cgccaactac 180
aaccagcagt tcaagggcag ggccaccatc accgccgaca agagcaccag caccgcctac 240
atggaactga gcagcctgag gagcgaggat accgcggtgt actactgcgc caggggcgac 300
ttcgactacg acggcgggcta ctacttcgac agctgggggac agggcacact agtgaccgtg 360
tccagc                                     366

```

<210> 57

<211> 366

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30

<220>

35 <223> Secuencia de nucleótidos de H4 de la variante de la región V de la cadena pesada humanizada de SAP-E (optimizada por codones)

<400> 57

```

caggtgcagc tgggtgcagag cggcgccgag gtgaagaaac cgggcagcag cgtgaagggtg 60
agctgcaagg ctacggggtt caccttcgcc acctacaaca tgcactgggt caggcaggca 120
cccgccaggg gcctggagtg gatcggttat atctaccccg gcgacggcaa cgccaactac 180
aaccagcagt tcaagggcag ggccaccctg accgccgaca ccagcaccag caccgcctac 240
atggaactga gcagcctgag gagcgaggat accgccgtgt acttctgcgc cagggggcgac 300
ttcgactacg acggcggcta ctacttcgac agctggggac agggcacact agtgaccgtg 360
tccagc

```

<210> 58

<211> 321

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia de nucleótidos de L0 de la variante de región V de la cadena ligera humanizada de SAP-E (optimizada por codones)

<400> 58

```

gacatccaga tgacccagag cccagctca ctgagcgcca gcgtgggcca cagggtgacc 60
attacctgca gggcctccga gaacatctac agctacctgg cctggtacca gcagaagccc 120
ggcaaggccc ccaagctgct gatctacaac gccaaagccc tcgccgaggg cgtccctagc 180
aggttctctg gaagcggcag cggcacccgac ttcacctga ccatcagcag cctgcagccc 240
gaggacttcg ccacctatta ctgccagcac cactacggcg cccccctgac ctttggccag 300
ggcaccaaac tggagatcaa g

```

15

<210> 59

<211> 321

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Secuencia de nucleótidos de L1 de la variante de región V de la cadena ligera humanizada de SAP-E (optimizada por codones)

<400> 59

25

```

gacatccaga tgacccagag cccagctca ctgagcgcca gcgtgggcca cagggtgacc 60
attacctgca gggcctccga gaacatctac agctacctgg cctggtacca gcagaagccc 120
ggcaaggccc ccaagctgct gatccacaac gccaaagccc tcgccgaggg cgtccctagc 180
aggttctctg gaagcggcag cggcacccgac ttcacctga ccatcagcag cctgcagccc 240
gaggacttcg ccacctatta ctgccagcac cactacggcg cccccctgac ctttggccag 300
ggcaccaaac tggagatcaa g

```

<210> 60

<211> 321

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30

<220>

35 <223> Secuencia de nucleótidos de L2 de la variante de región V de cadena ligera humanizada de SAP-E (optimizada por codones)

<400> 60

```

gacatccaga tgacccagag cccagctca ctgagcgcca gcgtgggcca cagggtgacc 60
attacctgca gggcctccga gaacatctac agctacctgg cctggtacca gcagaagccc 120
ggcaaggccc ccaagctgct ggtgcacaac gccaaagccc tcgccgaggg cgtccctagc 180
aggttctctg gaagcggcag cggcacccgac ttcacctga ccatcagcag cctgcagccc 240
gaggacttcg ccacctatta ctgccagcac cactacggcg cccccctgac ctttggccag 300
ggcaccaaac tggagatcaa g

```

40

<210> 61
 <211> 1356
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Secuencia madura completa de nucleótidos de H1 de la cadena pesada humanizada de SAP-E (optimizada por codones)

10 <400> 61

```

caggtgcagc tgggtgcagag cggcgccgag gtgaagaaac ccggcagcag cgtgaagggtg 60
agctgcaagg ctagcggggtt caccttcgcc acctacaaca tgcactgggt caggcaggca 120
ccgggccagg gcctggagtg gatgggctat atctaccccg gcgacggcaa cgccaactac 180
aaccagcagt tcaagggcag ggtgaccatc accgccgaca agagcaccag caccgcctac 240
atggaactga gcagcctgag gagcgaggat accgccgtgt actactgcgc caggggacgac 300
ttcgactaag acggcggtta ctacttcgac agctggggac agggcacact agtgaccgtg 360
tccagcgcca gcaccaaggg cccagcgtg ttccccctgg ccccgagcag caagagcacc 420
agcggcgcca cagccgccct gggctgcctg gtgaaggact acttccccga accggtgacc 480
gtgtcctgga acagcggagc cctgaccagc ggctgtgcaca ccttccccgc cgtgctgcag 540
agcagcggcc tgtacagcct gagcagcgtg gtgaccgtgc ccagcagcag cctgggcacc 600
cagacctaca tctgtaacgt gaaccacaag cccagcaaca ccaagggtga caagaagggtg 660
gagcccaaga gctgtgacaa gaccacacc tgccccccct gccctgcccc cgagctgctg 720
ggaggcccca gcgtgttcct gttccccccc aagcctaagg acaccctgat gatcagcaga 780
acccccgagg tgacctgtgt ggtggtggat gtgagccacg aggaccctga ggtgaagttc 840
aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcac aatgccaaga ccaagcccag ggaggagcag 900
tacaacagca cctaccgggt ggtgtccgtg ctgaccgtgc tgcaccagga ttggctgaac 960
ggcaaggagt acaagtgtaa ggtgtccaac aaggccctgc ctgccctat cgagaaaacc 1020
atcagcaagg ccaagggcca gccagagag cccaggtgt acaccctgcc cctagcaga 1080
gatgagctga ccaagaacca ggtgtccctg acctgcctgg tgaagggtt ctaccccagc 1140
gacatcgccg tggagtggga gagcaacggc cagcccaga acaactaaa gaccaccccc 1200
cctgtgctgg acagcgatgg cagcttcttc ctgtacagca agctgaccgt ggacaagagc 1260
agatggcagc agggcaacgt gttcagctgc tccgtgatgc acgaggccct gcacaatcac 1320
tacaccagca agagcctgag cctgtcccct ggcaag 1356
    
```

<210> 62
 <211> 444
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 20 <223> Secuencia madura completa de aminoácidos de H1 de la cadena pesada humanizada de SAP-E

<400> 62

```

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1           5           10           15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ala Thr Tyr
           20           25           30
Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
    
```

		35				40				45					
Gly	Tyr	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asp	Gly	Asn	Ala	Asn	Tyr	Asn	Gln	Gln	Phe
	50					55					60				
Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	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	Tyr	Cys
				85					90					95	
Arg	Asp	Phe	Asp	Tyr	Asp	Gly	Gly	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Ser	Trp	Gly	Gln
			100					105					110		
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val
		115					120					125			
Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala
	130					135					140				
Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser
145					150					155					160
Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val
			165					170						175	
Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser
			180					185					190		
Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser
	195					200					205				
Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr
	210				215						220				
His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser
225					230					235					240
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg
			245					250						255	
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro
			260					265					270		
Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala
	275						280					285			
Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Tyr	Val	Val	Ser	Val
	290				295						300				
Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys
305					310					315					320
Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser
			325					330						335	
Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro
			340				345						350		
Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val
		355				360						365			
Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly
	370				375					380					
Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp
385					390					395					400
Gly	Ser	Phe	Phe	Lys	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln
			405					410						415	
Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His
		420						425					430		
Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys				
		435					440								

<210> 63

<211> 642

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia madura completa de nucleótidos de L1 de la cadena ligera humanizada de SAP-E (optimizada por codones)

<400> 63

```

gacatccaga tgaccagag cccagctca ctgagcgcca gcgtgggcca cagggtgacc 60
attacctgca gggcctcoga gaacatctac agctacctgg cctgggtacca gcagaagccc 120
ggcaaggccc ccaagctgct gatccacaac gccaaagacc tcgccgaggg cgtccctagc 180
aggttctctg gaagcggcag cggcaccgac ttcacctga ccatcagcag cctgcagccc 240
gaggacttcg ccacctatta ctgccagcac cactacggcg cccccctgac ctttggccag 300
ggcaccaaac tggagatcaa gcgtacgggtg gccgccccca gcgtgttcat cttccccccc 360
agcgatgagc agctgaagag cggcaccgcc agcgtgggtg gtctgctgaa caacttttac 420
ccccgggagg ccaaggtgca gtggaagggtg gacaatgccc tgcagagcgg caacagccag 480
gagagcgtga ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag caccctgacc 540
ctgagcaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gtgaggtgac ccaccagggc 600
ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac cggggcgagt gc 642

```

<210> 64

5 <211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia madura completa de aminoácidos de L1 de la cadena ligera humanizada de SAP-E

<400> 64

```

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

```

<210> 65

<211> 357

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de nucleótidos de H0 de la variante de región V de la cadena pesada humanizada de SAP-K no optimizada por codones

<400> 65

```

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggagg caccttcagc agctactgga tgcactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggaatg attcatccta atagtgttaa tactaactac 180
aatgagaagt tcaagagtag agtcacgatt accgcggaaca aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagacggaat 300
gattactact ggtacttcga tgtctggggc cagggcaccc tggtcaccgt ctccctca 357

```

<210> 66

5 <211> 321

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia de nucleótidos de L0 de la variante de región V de la cadena ligera humanizada de SAP-K no optimizada por codones

<400> 66

```

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgca aggccagtc gaagtgtgaa tctaattgtag cctgggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctattcg gcttcctacc ggtacagtgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg caacttacta ctgtcagcaa tgtaacaact atccattcac gtttggccag 300
gggaccaagc tggagatcaa a 321

```

15

<210> 67

<211> 357

<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Secuencia de nucleótidos de H0 de la variante de región V de la cadena pesada humanizada de SAP-K (optimizada por codones)

<400> 67

```

caggtgcagc tgggtgcagag cggcgccgaa gtgaagaagc ccggcagcag cgtgaaagtg 60
agctgcaagg ccagcggcgg aaccttcagc agctactgga tgcactgggt gaggcaggca 120
cccggccagg gcctggagtg gatgggcatg atccacccca acagcgtgaa caccaactac 180
aacgagaagt tcaagagcag agtgaccatc accgccgaca agagcaccag caccgcctat 240
atggagctga gctctctgag gagcgaggat accgccgtgt actactgcgc caggaggaac 300
gactactact ggtacttcga cgtctggggc cagggcacac tagtgaccgt gtccagc 357

```

30

<210> 68

<211> 357

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Secuencia de nucleótidos de H1 de la variante de región V de la cadena pesada humanizada de SAP-K (optimizada por codones)

<400> 68

40

```

caggtgcagc tgggtgcagag cggcgccgaa gtgaagaagc ccggcagcag cgtgaaagtg 60
agctgcaagg ccagcggcta caccttcacc agctactgga tgcactgggt gaggcaggca 120
cccggccagg gcctggagtg gatgggcatg atccacccca acagcgtgaa caccaactac 180
aacgagaagt tcaagagcag agtgaccatc accgccgaca agagcaccag caccgcctat 240
atggagctga gctctctgag gagcgaggat accgccgtgt actactgcgc caggaggaac 300
gactactact ggtacttcga cgtctggggc cagggcacac tagtgaccgt gtccagc 357

```

<210> 69

<211> 357
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Secuencia de nucleótidos de H2 de la variante de región V de la cadena pesada humanizada de SAP-K (optimizada por codones)

<400> 69

10
caggtgcagc tgggtgcagag cggcgccgaa gtgaagaagc ccggcagcag cgtgaaagtg 60
agctgcaagg ccagcggcta caccttcacc agctactgga tgcactgggt gaggcaggca 120
cccggccagg gcctggagtg gatcggcatg atccacccca acagcgtgaa caccaactac 180
aacgagaagt tcaagagcag agccaccatc accgcccaca agagcaccag caccgcctat 240
atggagctga gctctctgag gagcgaggat accgcccgtgt actactgcgc caggaggaac 300
gactactact ggtacttcga cgtctggggc cagggcacac tagtgaccgt gtccagc 357

<210> 70
<211> 357
15 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
20 <223> Secuencia de nucleótidos de H3 de la variante de región V de la cadena pesada humanizada de SAP-K (optimizada por codones)

<400> 70

25
caggtgcagc tgggtgcagag cggcgccgaa gtgaagaagc ccggcagcag cgtgaaagtg 60
agctgcaagg ccagcggcta caccttcacc agctactgga tgcactgggt gaggcaggca 120
cccggccagg gcctggagtg gatcggcatg atccacccca acagcgtgaa caccaactac 180
aacgagaagt tcaagagcag agccaccctg accgtggaca agagcaccag caccgcctat 240
atggagctga gctctctgag gagcgaggat accgcccgtgt actactgcgc caggaggaac 300
gactactact ggtacttcga cgtctggggc cagggcacac tagtgaccgt gtccagc 357

<210> 71
<211> 321
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> Secuencia de nucleótidos de L0 de la variante de región V de cadena ligera humanizada de SAP-K (optimizada por codones)

<400> 71

gacatccaga tgacccagag cccctcttca ctgagcgcta gcgtgggcca cagggtgacc 60
atcacctgca aggccagcca gaacgtgaac agcaacgtgg cctggtacca gcagaagccc 120
ggcaaagccc ccaagtcctt gatctacagc gccagctaca gatatagcgg cgtgcctagc 180
aggtttagcg gcagcggag cgggaccgat ttcaccctga ccatacagcag cctgcagccc 240
gaggacttcg ccacttacta ctgccagcag tgcaacaact accccttcac cttcggccag 300
ggcaccaagc tggagatcaa g 321

<210> 72
<211> 321
40 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
45 <223> Secuencia de nucleótidos de L1 de la variante de región V de cadena ligera humanizada de SAP-K (optimizada por codones)

<400> 72

```

gacatccaga tgacccagag cccctcttca ctgagcgcta gcgtgggcga cagggtgacc 60
atcacctgca aggccagcca gaacgtgaac agcaacgtgg cctggtacca gcagaagccc 120
ggcaaagccc ccaaggccct gatctacagc gccagctaca gatatagcgg cgtgcctagc 180
aggttttagcg gcagcggaag cgggaccgat ttcaccctga ccatcagcag cctgcagccc 240
gaggacttcg ccacttacta ctgccagcag tgcaacaact accccttcac cttcggccag 300
ggcaccaagc tggagatcaa g                                     321

```

<210> 73

<211> 321

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de nucleótidos de L0 91A de la variante de región V de cadena ligera humanizada de SAP-K (optimizada por codones)

<400> 73

```

gacatccaga tgacccagag cccctcttca ctgagcgcta gcgtgggcga cagggtgacc 60
atcacctgca aggccagcca gaacgtgaac agcaacgtgg cctggtacca gcagaagccc 120
ggcaaagccc ccaagctcct gatctacagc gccagctaca gatatagcgg cgtgcctagc 180
aggttttagcg gcagcggaag cgggaccgat ttcaccctga ccatcagcag cctgcagccc 240
gaggacttcg ccacttacta ctgccagcag gcgaacaact accccttcac cttcggccag 300
ggcaccaagc tggagatcaa g                                     321

```

<210> 74

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de L0 91A de la variante de región V de la cadena ligera humanizada de SAP-K

<400> 74

```

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 Lys Ala Ser Gln Asn Val Asn Ser Asn
20     25     30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35     40     45
Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50     55     60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65     70     75     80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Asn Tyr Pro Phe
85     90     95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100    105

```

<210> 75

<211> 1347

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada de H3 humanizada de SAP-K (optimizada por codones)

<400> 75

```

caggtgcagc tgggtgcagag cggcgccgaa gtgaagaagc ccggcagcag cgtgaaagtg 60
agctgcaagg ccagcggcta caccttcacc agctactgga tgcactgggt gaggcaggca 120
cccggccagg gcctggagtg gatcggcatg atccaccca acagcgtgaa caccaactac 180
aacgagaagt tcaagagcag agccaccctg accgtggaca agagcaccag caccgcctat 240
atggagctga gctctctgag gagcgaggat accgccgtgt actactgcgc caggaggaac 300
gactactact ggtacttcga cgtctggggc cagggcacac tagtgaccgt gtccagcgcc 360
agcaccaagg gcccagcgt gttccccctg gcccagca gcaagagcac cagcggcggc 420
acagccgccc tgggctgcct ggtgaaggac tacttccccg aaccggtgac cgtgtcctgg 480
aacagcggag ccctgaccag cggcgtgcac accttccccg ccgtgctgca gagcagcggc 540
ctgtacagcc tgagcagcgt ggtgaccgtg cccagcagca gcctgggac ccagacctac 600
atctgtaacg tgaaccacaa gcccagcaac accaaggtgg acaagaaggt ggagcccaag 660
agctgtgaca agaccacac ctgccccccc tgccctgccc ccgagctgct gggaggcccc 720
agcgtgttcc tgttcccccc caagcctaag gacaccctga tgatcagcag aacccccgag 780
gtgacctgtg tgggtggtgga tgtgagccac gaggaccctg aggtgaagtt caactggtac 840
gtggacggcg tggaggtgca caatgccaa gccaagccca gggaggagca gtacaacagc 900
acctaccggg tgggtgtcgt gctgaccgtg ctgcaccagg attggctgaa cggcaaggag 960
tacaagtgtg aggtgtccaa caaggccctg cctgccccta tcgagaaaac catcagcaag 1020
gccaaaggcc agcccagaga gcccaggtg tacaccctgc cccctagcag agatgagctg 1080
accaagaacc aggtgtccct gacctgcctg gtgaagggct tctaccccag cgacatcgcc 1140
gtggagtggg agagcaacgg ccagcccgag aacaactaca agaccacccc cctgtgctg 1200
gacagcgatg gcagcttctt cctgtacagc aagctgaccg tggacaagag cagatggcag 1260
cagggcaacg tgttcagctg ctccgtgatg cacgaggccc tgcacaatca ctacaccag 1320
aagagcctga gcctgtcccc tggcaag 1347

```

<210> 76

5 <211> 443

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia de aminoácidos de cadena pesada de H3 humanizada de SAP-K

<400> 76

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Met Ile His Pro Asn Ser Val Asn Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Ser Arg Ala Thr Leu Thr Val 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 Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Arg Asn Asp Tyr Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Ser Leu Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 180 185 190
 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 195 200 205
 Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 210 215 220
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 260 265 270
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 275 280 285
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Tyr Val Val Ser Val Leu
 290 295 300
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320
 Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350
 Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400
 Ser Phe Phe Lys Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 405 410 415
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 420 425 430
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440

<210> 77
 <211> 642
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de L0 humanizada de SAP-K (optimizada por codones)

5

<400> 77

```

gacatccaga tgacccagag cccctcttca ctgagcgcta gcgtgggcca cagggtgacc 60
atcacctgca aggccagcca gaacgtgaac agcaacgtgg cctgggtacca gcagaagccc 120
ggcaaaagccc ccaagctcct gatctacagc gccagctaca gatatagcgg cgtgcctagc 180
aggttttagcg gcagcgggaag cgggaccgat ttcaccctga ccatcagcag cctgcagccc 240
gaggacttcg ccacttacta ctgccagcag tgcaacaact accccttcac cttcggccag 300
ggcaccaagc tggagatcaa gcgtacggtg gccgccccca gcgtgttcat cttccccccc 360
agcgatgagc agctgaagag cggcaccgcc agcgtggtgt gtctgctgaa caacttctac 420
ccccgggagg ccaaggtgca gtggaaggtg gacaatgccc tgcaagagcgg caacagccag 480
gagagcgtga ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag caccctgacc 540
ctgagcaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gtgaggtgac ccaccagggc 600
ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac cggggcgagt gc 642

```

10

<210> 78

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de L0 humanizada de SAP-K

<400> 78

20

```

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

```

<210> 79

<211> 19

25

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<220>

<223> Secuencia señal para cadenas de inmunoglobulina

<400> 79

5

Met	Gly	Trp	Ser	Cys	Ile	Ile	Leu	Phe	Leu	Val	Ala	Thr	Ala	Thr	Gly
1				5					10					15	
Val	His	Ser													

REIVINDICACIONES

1. Una célula huésped recombinante transformada, transfectada o transducida que comprende un primer vector que codifica la cadena ligera y un segundo vector que codifica la cadena pesada de un anticuerpo, en la que el anticuerpo tiene la región variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 35, la región variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 28 y en la que el anticuerpo comprende un dominio constante de IgG1 o IgG3 humano.
2. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el primer vector codifica una cadena ligera de la SEQ ID NO: 64 y el segundo vector codifica una cadena pesada de la SEQ ID NO:62.
3. Una célula huésped de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en la que el primer vector comprende una molécula de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 59.
4. Una célula huésped de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el segundo vector comprende una molécula de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 54.
5. Una célula huésped de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en la que el primer vector comprende una molécula de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 63.
6. Una célula huésped de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 o 5, en la que el segundo vector comprende una molécula de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 61.
7. Una célula huésped de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la célula huésped es eucariota.
8. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 7, en la que la célula huésped es una célula CHO.
9. Un procedimiento de producción de un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, procedimiento que comprende la etapa de cultivar una célula huésped definida en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y recuperar el anticuerpo.

Figura 1

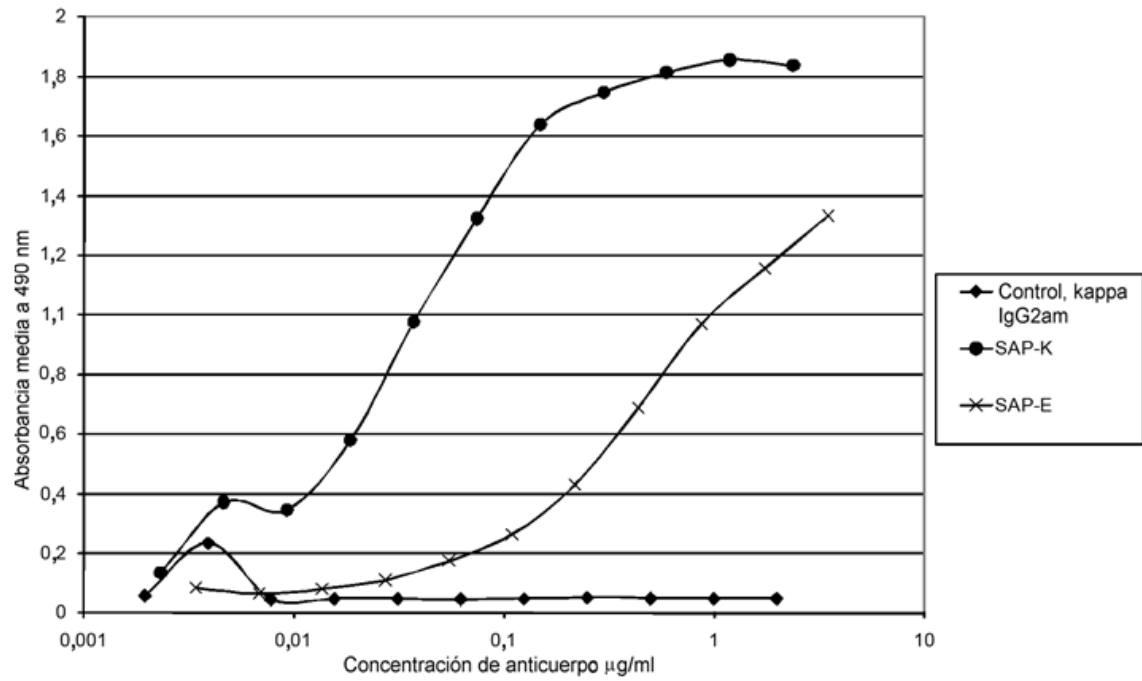


Figura 2

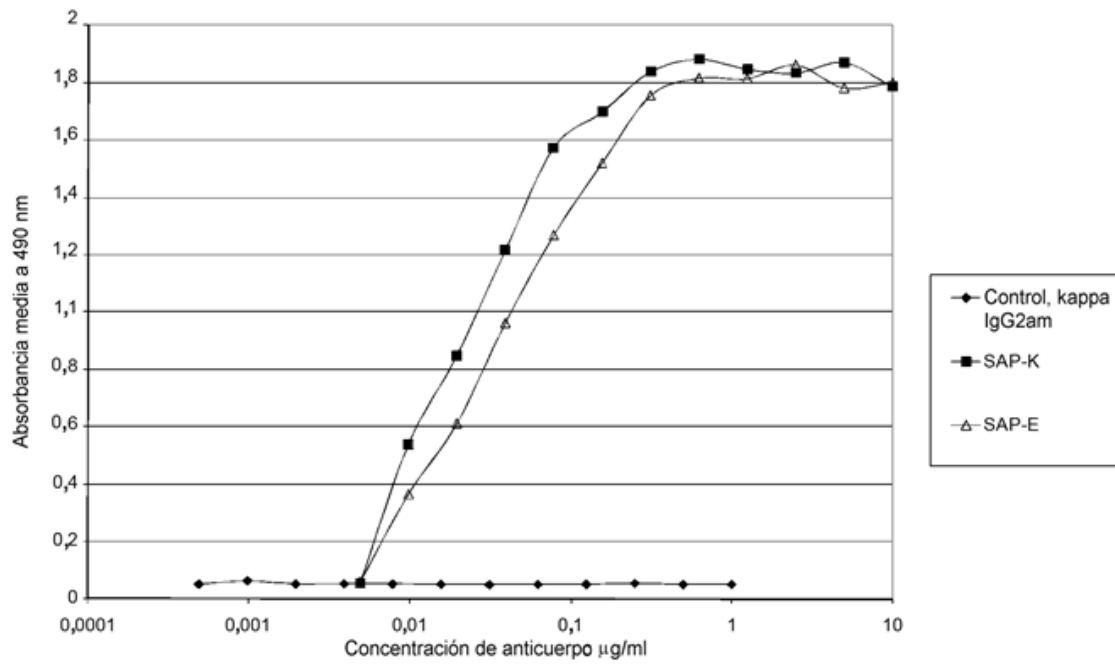


Figura 3

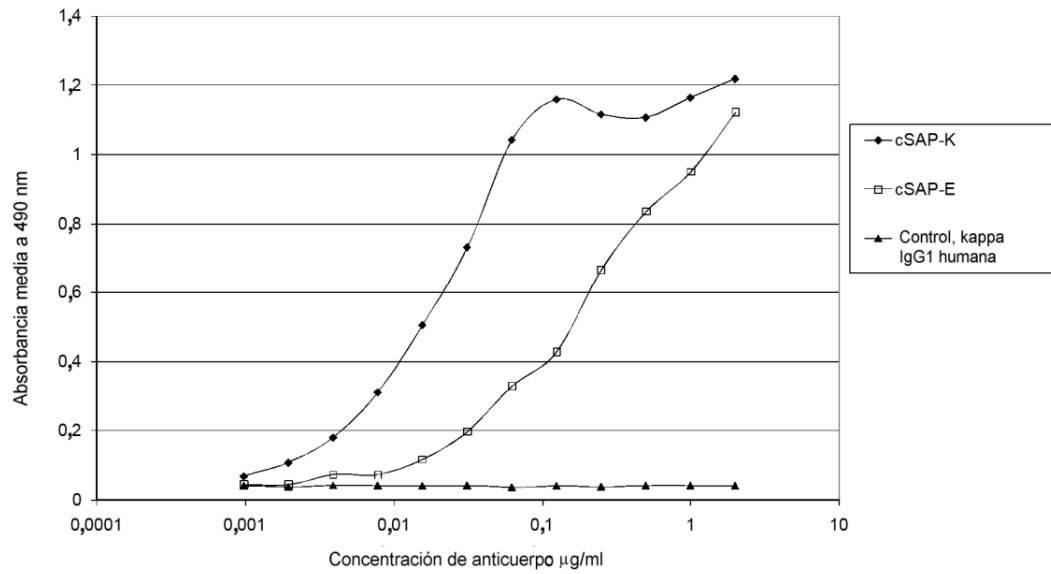


Figura 4

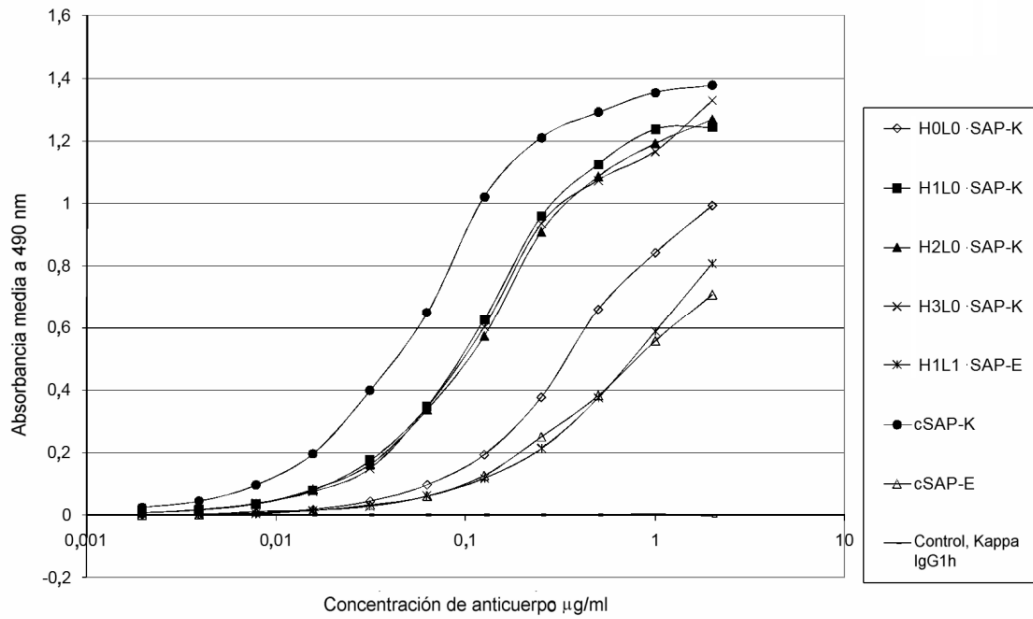


Figura 5

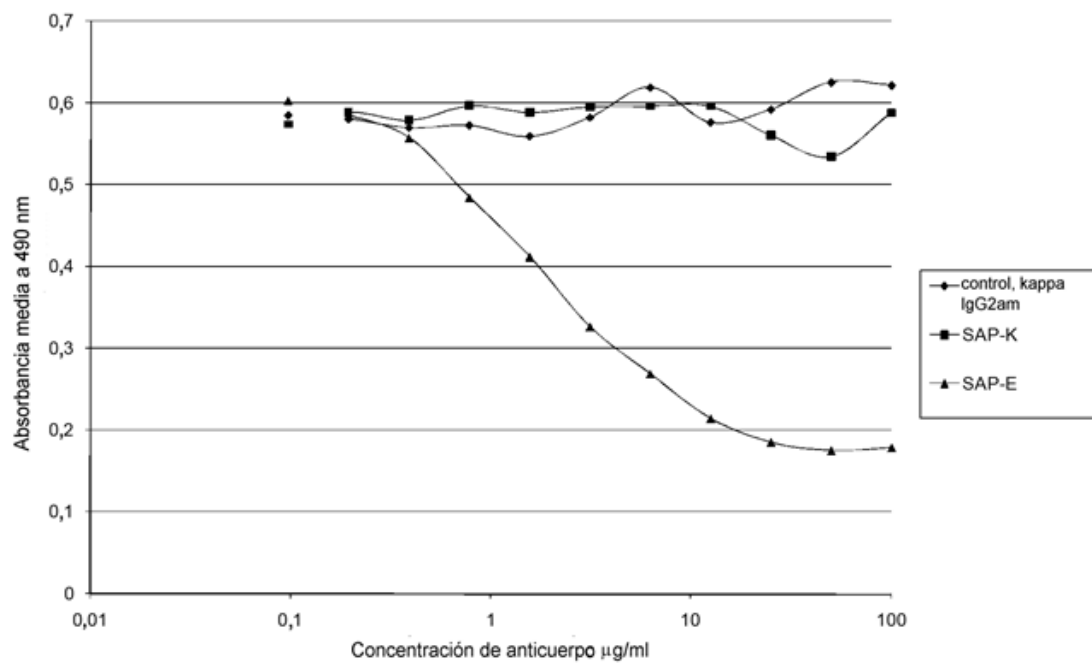


Figura 6

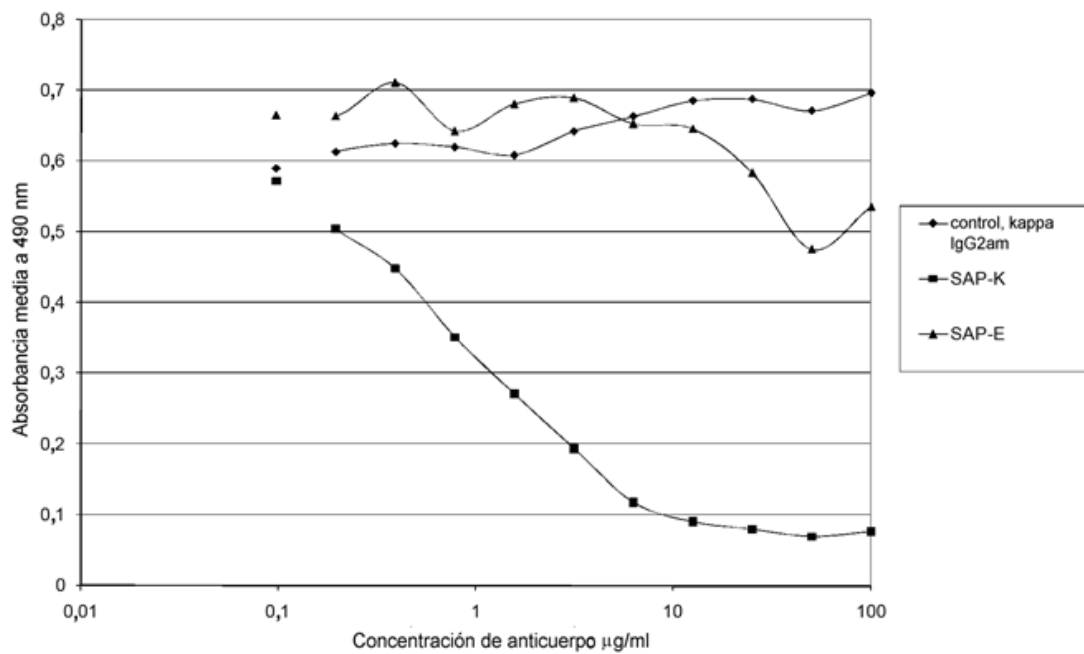


Figura 7

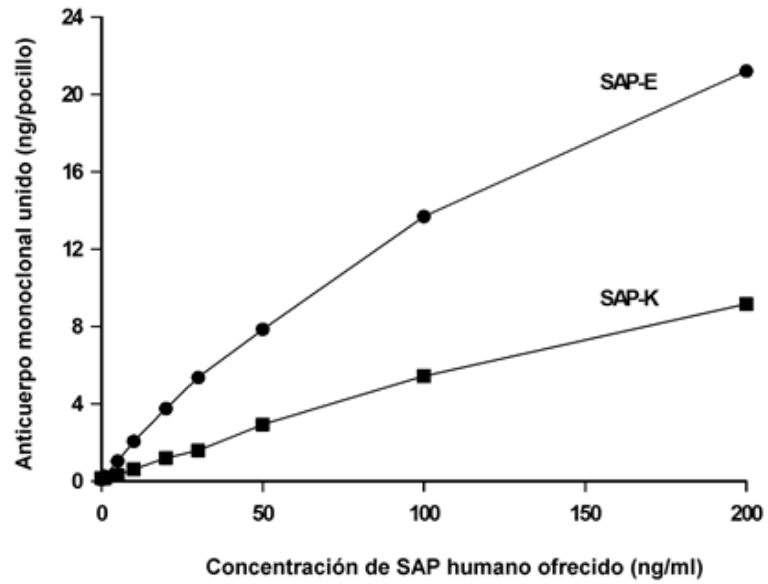
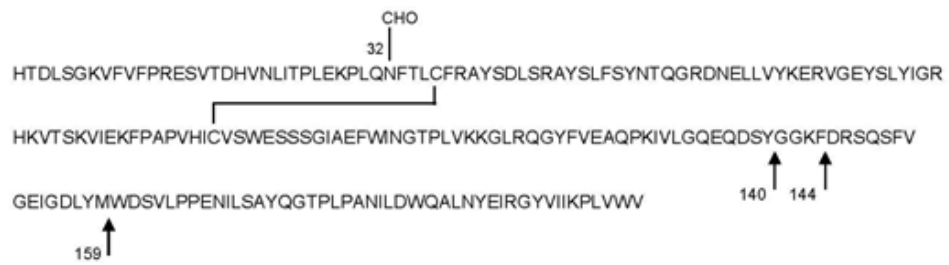


Figura 8

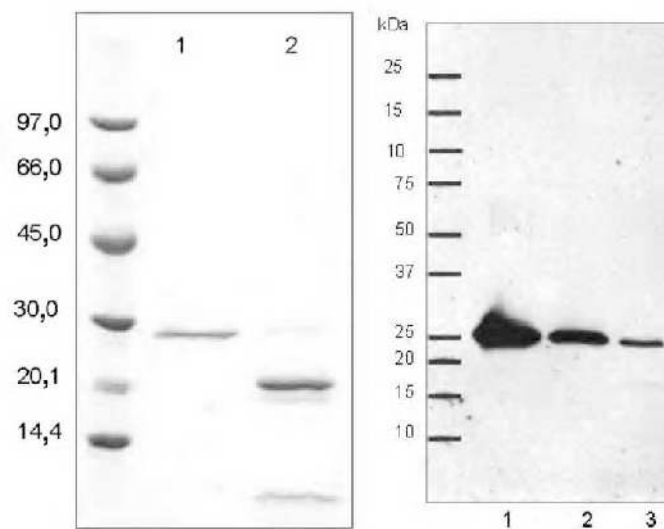
(A)



(B)



(C)



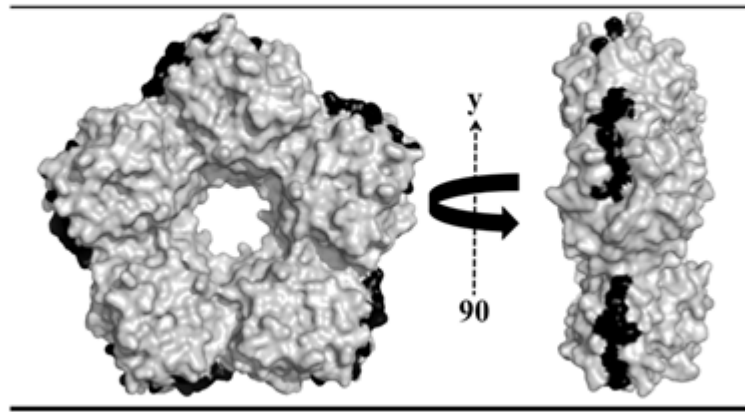
(D)

136 140 147
h EQDSYGGKFDRS
m EQDNYGG**G**F**Q**RS



Figura 9

(A)



(B)

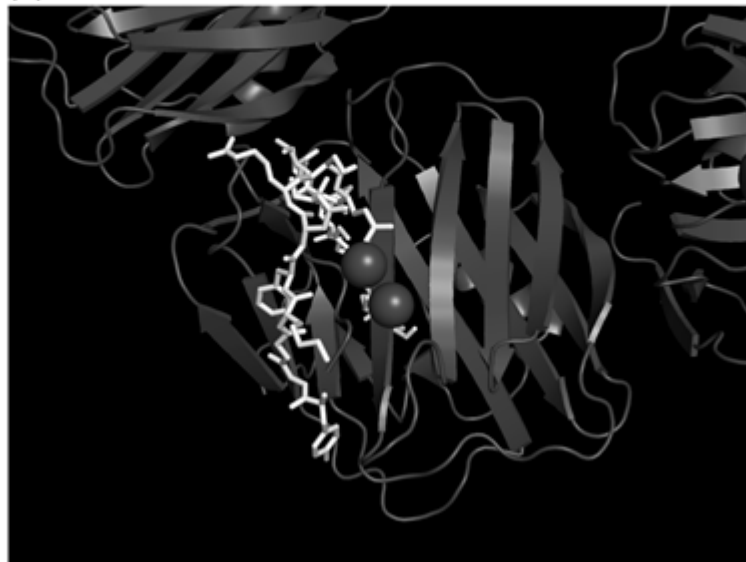


Figura 10

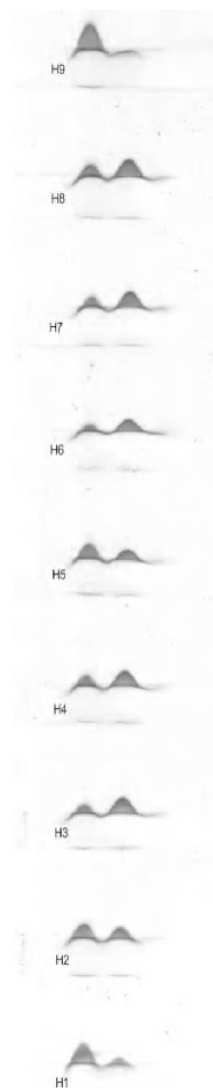


Figura 11

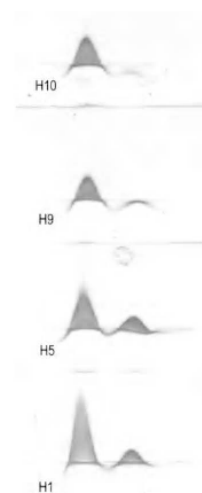


Figura 12

(A)

-ve



+ve

(B) Inmunotransferencia sondeada con anti-C3 de ratón a 1:5000

(A)

-ve



+ve

(C) Inmunotransferencia sondeada con anti C3 de ratón a 1:10.000



+ve