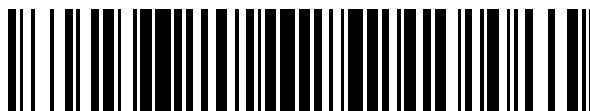


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 699 273**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.11.2007** E 13164403 (1)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.08.2018** EP 2662091

54 Título: **Anticuerpos anti-P-selectina y métodos de uso de los mismos para tratar enfermedades inflamatorias**

30 Prioridad:

01.12.2006 US 872170 P

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

08.02.2019

73 Titular/es:

NOVARTIS AG (50.0%)

Lichtstrasse 35

4056 Basel, CH y

OKLAHOMA MEDICAL RESEARCH FOUNDATION

(50.0%)

72 Inventor/es:

MCEVER, RODGER P.;

ALVAREZ, RICHARD y

KAWAR, ZIAD

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 699 273 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-P-selectina y métodos de uso de los mismos para tratar enfermedades inflamatorias

Campo de la invención

5 La invención se refiere a anticuerpos humanizados, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que reconocen (es decir, se unen) a P-selectina.

Antecedentes de la invención

10 Las selectinas, particularmente P-selectina, contribuyen a muchas enfermedades inflamatorias y trombóticas, como la trombo-
sclerosis venosa profunda (TVP), artritis, asma, psoriasis y crisis vasooclusiva en la anemia de células falciformes.
Por ejemplo, los pacientes con anemia de células falciformes sufren complicaciones vasooclusivas en las que los
15 glóbulos rojos falciformes se acumulan en pequeños vasos que bloquean el flujo de sangre (isquemia) en los órganos
inferiores. Esto causa a los pacientes dolor intenso y hospitalizaciones repetidas. También puede conducir a una
disfunción multiorgánica progresiva y muerte prematura. Se han desarrollado modelos murinos de anemia de células
falciformes mediante la introducción de transgenes para las proteínas globinas humanas, una de las cuales tiene la
20 mutación encontrada en la anemia de células falciformes. Estos ratones tienen glóbulos rojos falciformes y desarrollan
complicaciones vasooclusivas. La adherencia de glóbulos rojos falciformes (RBC) al endotelio vascular parece
contribuir a la oclusión vascular observada en la enfermedad de células falciformes. Utilizando ratones genéticamente
modificados como modelo para la enfermedad de células falciformes humana, se demostró que existe un reclutamiento
de leucocitos dependientes de selectina a los microvasos inflamados, donde interactúan con los glóbulos rojos
25 falciformes. Los ratones con células falciformes expuestos a hipoxia seguida de reoxigenación tuvieron una mayor
rotación de leucocitos y menores velocidades de RBC en pequeños vasos en comparación con los controles. La
inyección de un anticuerpo monoclonal anti-P-selectina en el momento de la reoxigenación no solo evitó el aumento
de estos parámetros, sino que también redujo la rotación de leucocitos y aumentó las velocidades de los RBC a niveles
que se acercaron a los de los ratones control no probados. Esto indica que se puede lograr una reducción en la
adhesión de leucocitos mediante la prevención de la actividad de P-selectina, lo que da como resultado una mejora
del flujo sanguíneo microcirculatorio.

La P-selectina también se ha relacionado con otros procesos patológicos, como el daño tisular y orgánico asociado
con la inflamación, por ejemplo, lesión de isquemia por reperfusión. Por lo tanto, la P-selectina es una diana para la
intervención en enfermedades inflamatorias y trombóticas humanas. En consecuencia, existe la necesidad de
tratamientos dirigidos a P-selectina como un medio para tratar enfermedades inflamatorias y trombóticas.

30 La técnica anterior (documento WO 2005/100402) desvela otros anticuerpos anti-P-selectina, que incluyen anticuerpos
humanos o humanizados para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y trombóticas.

Sumario de la invención

35 La divulgación presenta un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo quimérico o humanizado) que tiene una región
variable de cadena ligera de inmunoglobulina que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en
KASQSVDYDGHSYMN (SEQ ID NO: 1), AASNLES (SEQ ID NO: 2), o QQSDENPLT (SEQ ID NO: 3). La región
constante o la región marco (es decir, la(s) región(es) no variable(s) del anticuerpo puede ser de un anticuerpo
humano.

40 En el presente documento también se divulga un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo quimérico o humanizado) que
tiene una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina que comprende una secuencia seleccionada del grupo
que consiste en SYDIN (SEQ ID NO: 4), WIYPGDGSIKYNEKFKG (SEQ ID NO: 5), o RGEYGNIEGAMDY (SEQ ID
NO: 6). El anticuerpo puede incluir además una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia seleccionada
del grupo que consiste en KASQSVDYDGHSYMN (SEQ ID NO: 1), AASNLES (SEQ ID NO: 2), o QQSDENPLT (SEQ
ID NO: 3). El anticuerpo puede tener:

45 a. una región variable de cadena ligera que tiene, en orden secuencial, una primera región determinante de
complementariedad (CDR) que tiene la secuencia KASQSVDYDGHSYMN (SEQ ID NO: 1), una segunda CDR que
tiene la secuencia AASNLES (SEQ ID NO: 2) y una tercera CDR que tiene la secuencia QQSDENPLT (SEQ ID
NO: 3); y

50 b. una región variable de cadena pesada que tiene, en orden secuencial, una primera CDR que tiene la secuencia
SYDIN (SEQ ID NO: 4), una segunda CDR que tiene la secuencia WIYPGDGSIKYNEKFKG (SEQ ID NO: 5) y una
tercera CDR que tiene la secuencia RGEYGNIEGAMDY (SEQ ID NO: 6). La región constante o la región marco
(es decir, la(s) región(es) no variable(s) del anticuerpo puede ser de un anticuerpo humano.

En el presente documento también se divulga un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo quimérico o humanizado) que

tiene una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina que tiene una secuencia que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con una secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 o SEQ ID NO: 39.

5 Un primer aspecto de la invención presenta un anticuerpo humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que reconoce P-selectina que comprende: una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina que comprende la SEQ ID NO: 40, y una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina que comprende la SEQ ID NO: 36. En el presente documento también se divulga un método para tratar o prevenir una afección inflamatoria o trombótica (por ejemplo, enfermedad de células falciformes o crisis de dolor asociada con la enfermedad de células falciformes); trombo-
10 sis venosa profunda; asma; artritis reumatoide; psoriasis; lesión de isquemia por reperfusión; lesión de isquemia por reperfusión causada por un accidente cerebrovascular; lesión de isquemia por reperfusión por infarto de miocardio; o lesión de isquemia por reperfusión causada por trasplante de órganos) que comprende administrar el anticuerpo de cualquiera de aquellos desvelados en el presente documento a un sujeto que necesite tratamiento en una cantidad suficiente para tratar o prevenir dicha afección inflamatoria o trombótica. Se divulga también en el presente documento, que el anticuerpo puede administrarse al sujeto por vía intravenosa; subcutánea; tópica; intradérmica; intramuscular;
15 intraperitoneal; intranasal; epidural; u oral. Se divulga también en el presente documento, que el anticuerpo se puede mezclar con un excipiente farmacéuticamente aceptable. También se divulga en el presente documento que la composición farmacéutica puede administrarse al sujeto en una cantidad suficiente para tratar o prevenir la afección inflamatoria o trombótica.

20 La divulgación también presenta un kit que incluye la composición farmacéutica descrita en el presente documento (por ejemplo, en un frasco u otro recipiente) e instrucciones para tratar una afección inflamatoria o trombótica mediante la administración de la composición farmacéutica.

La divulgación también presenta un ácido nucleico que codifica una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina que tiene una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con una secuencia expuesta en cualquiera de las SEQ ID NO: 7, 9, 11, 13, 15, o 27.

25 En el presente documento también se divulga un ácido nucleico que codifica una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina que tiene una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con una secuencia expuesta en cualquiera de las SEQ ID NO: 17, 19, 21, 23, 25, 29, o 31. El ácido nucleico puede codificar además una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con una secuencia expuesta en cualquiera de las SEQ ID NO: 7, 9, 11, 13, 15 o 27 que codifica una región variable de cadena
30 ligera.

En una realización de la invención, el anticuerpo se une a P-selectina con una constante de disociación menor que 10^{-7} M. Además, se describe en el presente documento, la constante de disociación puede ser preferentemente menor que 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M, y 10^{-12} M y más preferiblemente menor que 10^{-13} M. En una realización de la invención, el anticuerpo tiene una constante de disociación entre 10^{-7} M y 10^{-13} M. En el primer aspecto de la invención,
35 el anticuerpo está humanizado. En una realización de la invención, el anticuerpo es una inmunoglobulina seleccionada del grupo que consiste en inmunoglobulina G.

Por "anticuerpo quimérico" se entiende un anticuerpo que tiene genes de cadena ligera y pesada que se han construido, típicamente por ingeniería genética, a partir de genes de región variable y/o constante de inmunoglobulinas que pertenecen a una o más especies diferentes. Por ejemplo, se pueden usar los segmentos variables de los genes (o, por ejemplo, una o más de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) dentro de las regiones variables) de, por ejemplo, un anticuerpo de ratón (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal o policlonal), junto con segmentos constantes humanos para producir el anticuerpo quimérico. Un anticuerpo quimérico terapéutico típico es, por lo tanto, una proteína híbrida compuesta por el dominio variable o de unión a antígeno de un anticuerpo de ratón (por ejemplo, una o más de las CDR de un anticuerpo de ratón) y el dominio constante o efector de un anticuerpo humano, aunque se pueden usar otras especies de mamíferos. El anticuerpo quimérico también puede incluir una secuencia de aminoácidos obtenida de una fuente de proteína distinta de un anticuerpo.
40

Por "región determinante de la complementariedad" o "CDR" se entiende una secuencia de aminoácidos, o una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos, de un anticuerpo que es la región hipervariable de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina. Véase, por ejemplo, Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4^a edición, U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987). Hay tres CDR (o regiones CDR) de cadena pesada y tres CDR (o regiones CDR) de cadena ligera en la parte variable de una inmunoglobulina. Por lo tanto, "CDR", como se usa en el presente documento, se refiere a las tres CDR de cadena pesada, o a las tres CDR de cadena ligera (o todas las CDR tanto de cadena pesada como ligera).
45

Las regiones variables de cada par de cadenas ligera/pesada forman el sitio de unión del anticuerpo. Todas las cadenas presentan la misma estructura general de regiones marco relativamente conservadas (FR) unidas por tres regiones hipervariables, también llamadas regiones determinantes de complementariedad o CDR. Las CDR de las dos cadenas de cada par están alineadas por las regiones marco, permitiendo la unión a un epítopo específico. Los restos de las CDR y las FR se delinean de acuerdo con la definición de secuencia patrón de Kabat et al. (Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) y (1991). Una
50
55

definición estructural alternativa ha sido propuesta por Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); Nature 342:878-883 (1989); y J. Mol. Biol. 186:651-663 (1989).

Por "anticuerpo humanizado" se entiende un tipo de anticuerpo quimérico que comprende una región marco humana y una o más CDR de una inmunoglobulina no humana (generalmente un ratón o rata). La inmunoglobulina no humana que proporciona las CDR se denomina "donante" y la inmunoglobulina humana que proporciona el marco se denomina "aceptor". Las regiones constantes no necesitan estar presentes, pero si están, deberían ser sustancialmente idénticas a las regiones constantes de inmunoglobulina humana, es decir, al menos aproximadamente un 85-90%, preferentemente aproximadamente un 95% o más idénticas. Por lo tanto, todas las partes de una inmunoglobulina humanizada, excepto posiblemente las CDR, son sustancialmente idénticas a las partes correspondientes de las secuencias de inmunoglobulina humana natural. Se entiende que los anticuerpos de la presente divulgación pueden tener sustituciones de aminoácidos conservativas adicionales que no tienen sustancialmente ningún efecto sobre la unión al antígeno u otras funciones de la inmunoglobulina. Por sustituciones conservativas se pretenden combinaciones tales como gly, ala; val, ile, leu; asp, glu; asn, gln; ser, thr; lys, arg; y phe, tyr. Los anticuerpos de la presente divulgación también pueden incluir un marco que es idéntico al marco de una cadena de inmunoglobulina humana particular, el aceptor, y tres CDR de una cadena de inmunoglobulina de un donante no humano. Como alternativa, pueden cambiarse uno o más aminoácidos adicionales en el marco para que sean los mismos que los aminoácidos en otras regiones marco humanas. La presente divulgación incluye anticuerpos en los que se realizan cambios de un número limitado de aminoácidos en el marco de una cadena de inmunoglobulina humanizada, de modo que se usan los aminoácidos del donante en lugar del aceptor en esas posiciones, para aumentar la afinidad del anticuerpo (véase, por ejemplo, Queen et al., Proc. Natl Acad Sci USA, 86:10029-10032, 1989; y Hodgson et al., Bio/Technology, 9:421, 1991).

Por "donante" se entiende una secuencia de ácido nucleico que codifica, o una secuencia de aminoácidos de, una proteína, por ejemplo, un anticuerpo (policlonal, monoclonal o recombinante), cuya secuencia de aminoácidos contribuye a las secuencias de las regiones variables, por ejemplo, las CDR, de un anticuerpo de la divulgación.

Por "aceptor" se entiende una secuencia de ácido nucleico que codifica, o una secuencia de aminoácidos de, una proteína, por ejemplo, un anticuerpo (policlonal, monoclonal o recombinante), cuya secuencia de aminoácidos contribuye a las secuencias de las regiones constantes de un anticuerpo de la divulgación y/o las regiones marco que soportan las CDR. Preferentemente, un anticuerpo humano proporciona las secuencias aceptoras para un anticuerpo de la divulgación.

Aplicada a polipéptidos, la expresión "identidad de secuencia" significa péptidos que comparten aminoácidos idénticos en las posiciones correspondientes. La expresión "similitud de secuencia" significa péptidos que tienen aminoácidos idénticos o similares (es decir, sustituciones conservativas) en las posiciones correspondientes. La expresión "identidad sustancial" significa que dos secuencias peptídicas, cuando se alinean de forma óptima, tal como mediante los programas GAP o BESTFIT usando ponderaciones de hueco por defecto, comparten al menos un 80% de identidad de secuencia, preferentemente al menos un 90% de identidad de secuencia, más preferentemente al menos un 95 por ciento de identidad de secuencia o más (por ejemplo, una 99% de identidad de secuencia). Preferentemente, las posiciones de los restos que no son idénticas difieren por sustituciones de aminoácidos conservativas. La expresión "similitud sustancial" significa que dos secuencias peptídicas comparten porcentajes correspondientes de similitud de secuencia.

La expresión "sustancialmente puro", con respecto a un anticuerpo de la divulgación, significa que es la especie predominante presente (es decir, en una base molar es más abundante que cualquier otra especie individual en la composición), y preferentemente una fracción sustancialmente purificada es una composición en la que la especie objeto, es decir, un anticuerpo de la divulgación, comprende al menos aproximadamente el 50% (en una base molar), preferentemente el 60%, el 70%, el 80%, 90%, o 95% o más de todas las especies macromoleculares presentes. En general, una composición sustancialmente pura comprenderá más de aproximadamente el 80 al 90% de todas las especies macromoleculares presentes en la composición. Más preferentemente, la especie objeto se purifica hasta homogeneidad esencial (las especies contaminantes no pueden detectarse en la composición mediante métodos de detección convencionales), en donde la composición consiste esencialmente en una sola especie macromolecular.

Con el fin de clasificar las sustituciones de aminoácidos como conservativas o no conservativas, los aminoácidos se agrupan de la siguiente manera: Grupo I (cadenas laterales hidrófobas): norleucina, met, ala, val, leu, ile; Grupo II (cadenas laterales hidrófilas neutras): cys, ser, thr; Grupo III (cadenas laterales ácidas): asp, glu; Grupo IV (cadenas laterales básicas): asn, gln, his, lys, arg; Grupo V (residuos que influyen en la orientación de la cadena): gly, pro; y Grupo VI (cadenas laterales aromáticas): trp, tyr, phe. Las sustituciones conservativas implican sustituciones entre aminoácidos en la misma clase. Las sustituciones no conservativas constituyen el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra.

Los aminoácidos de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera maduras de las inmunoglobulinas se designan Hx y Lxx respectivamente, donde x es un número que designa la posición de un aminoácido de acuerdo con el esquema de Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) y (1991)) (en lo sucesivo denominados colectivamente como "Kabat et al.,"). Kabat et al. enumeran muchas secuencias de aminoácidos para anticuerpos para cada subclase, y enumeran el aminoácido más frecuente para cada posición de resto en esa subclase. Kabat et al. usan un método para asignar un número de residuo a cada aminoácido en una secuencia enumerada, y este método para asignar números de resto se ha convertido en convencional en el

campo. El esquema de Kabat et al. es extensible a otros anticuerpos no incluidos en el compendio alineando el anticuerpo en cuestión con una de las secuencias de consenso en Kabat et al. El uso del sistema de numeración de Kabat et al. identifica fácilmente los aminoácidos en posiciones equivalentes en diferentes anticuerpos. Por ejemplo, un aminoácido en la posición L50 de un anticuerpo humano ocupa la posición de equivalencia a una posición L50 de aminoácido de un anticuerpo de ratón.

"Inmunoglobulina", "anticuerpo" o "péptido(s) de anticuerpo" se refiere a un anticuerpo intacto o un fragmento de unión del mismo que compite con el anticuerpo intacto para la unión específica a P-selectina.

"Inhibición sustancial" significa al menos aproximadamente el 50% de inhibición, preferentemente de aproximadamente el 60% a aproximadamente el 80%, y más generalmente alrededor de más del 85% o más (según se mide en un ensayo de unión competitiva *in vitro*).

La divulgación proporciona composiciones y métodos para el tratamiento de una serie de afecciones inflamatorias y trombóticas que incluyen, por ejemplo, enfermedad de células falciformes o crisis de dolor asociada con la enfermedad de células falciformes, trombosis venosa profunda, asma, artritis reumatoide, psoriasis y lesión de isquemia por reperfusión. Las características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, los dibujos y las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un esquema que muestra las secuencias de la cadena ligera variable humanizada propuesta preparadas usando secuencias del mAb G1 murino. G1-VK muestra la secuencia de cadena ligera variable murina original. AAZ0906 muestra la secuencia de cadena ligera variable humana aceptora. Hu-G1_VK_v1 y Hu-G1_VK_v2 muestran dos versiones alternativas de la secuencia de cadena ligera variable del anticuerpo humanizado, en la que las regiones CDR 1-3 de la cadena ligera de la secuencia humana se reemplazan por las de las regiones CDR 1-3 de la cadena ligera murina.

La Figura 2 es un esquema que muestra las secuencias de la cadena pesada variable humanizada propuesta preparadas usando secuencias del mAb G1 murino. G1-VH muestra la secuencia de cadena pesada variable murina original. AAC18323 muestra la secuencia de cadena pesada variable humana aceptora. Hu-G1_VH_v1 y Hu-G1_VH_v2 muestran dos versiones alternativas de la secuencia de cadena pesada variable del anticuerpo humanizado, en la que las regiones CDR 1-3 de la cadena pesada de la secuencia humana se reemplazan por las de las regiones CDR 1-3 de la cadena pesada murina.

La Figura 3 es una fotografía que muestra los productos ligeros (VL) y pesados variables (VH) purificados que resultaron después de la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) del ARN aislado de las células de hibridoma que expresan el mAb G1 murino.

La Figura 4 es una fotografía que muestra los resultados después de la expresión de un anticuerpo G1 humanizado (G1_{aggr}) en células CHO dhfr estables y la purificación del anticuerpo G1_{aggr} usando una purificación de una etapa en una columna de proteína A. La fotografía muestra el anticuerpo G1_{aggr} purificado (carril 3) en comparación con el anticuerpo monoclonal parental de ratón G1 del cual derivó (carril 4). El carril 1 muestra 1,0 µg de IgG humana. El carril 2 muestra 0,5 µg de IgG humana. La Figura 5 es un gráfico que muestra la afinidad de equilibrio de las concentraciones indicadas de anticuerpo humanizado G1_{aggr} para p-selectina soluble.

Descripción detallada

En el presente documento se divulgan composiciones y métodos para inhibir enfermedades inflamatorias y trombóticas y afecciones mediadas por P-selectina. Específicamente, la invención proporciona inmunoglobulinas humanizadas que tienen la capacidad de inhibir la adhesión de células mediada por P-selectina *in vivo*.

Las inmunoglobulinas (o anticuerpos) de la invención se unen selectivamente a un epítipo funcional en P-selectina y se pueden usar para prevenir o reducir un estado de enfermedad asociado con la actividad de P-selectina, como la lesión tisular y la inflamación. Habitualmente, la unión de los anticuerpos a un epítipo funcional en P-selectina inhibe eficazmente la adhesión de los leucocitos a las plaquetas activadas y/o al endotelio vascular activado *in vivo*. Los anticuerpos que demuestran esta propiedad se denominan anticuerpos "bloqueadores". Los anticuerpos bloqueadores preferidos impiden la adhesión de los leucocitos al endotelio vascular activado para prevenir o inhibir una afección inflamatoria y/o trombótica.

Los anticuerpos pueden mostrar una afinidad de unión específica por P-selectina de al menos 10⁷, 10⁸, 10⁹, o 10¹⁰ M₋₁ o mayor (p.ej., hasta, por ejemplo, 10¹³ M₋₁).

La producción de anticuerpos monoclonales no humanos, por ejemplo, murinos, lagomorfos y equinos, es bien conocida y se puede lograr, por ejemplo, inmunizando a un animal con una preparación que contiene células que llevan P-selectina (por ejemplo, plaquetas activadas por trombina) o moléculas de P-selectina aisladas o fragmentos

de las mismas, tales como dominios extracelulares. Las células productoras de anticuerpos obtenidas de los animales inmunizados se immortalizan y analizan, o se analizan primero para la producción de anticuerpos que se unen a P-selectina, y luego se immortalizan. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Pubs., N. Y. (1988). Como alternativa, pueden producirse poblaciones de anticuerpos sustancialmente monoespecíficas mediante purificación cromatográfica de sueros policlonales.

Se proporcionan anticuerpos humanizados de la invención que reconocen P-selectina. En el presente documento se divulgan inmunoglobulinas humanizadas que tienen regiones marco constantes sustancialmente de una inmunoglobulina humana (denominada inmunoglobulina aceptora), así como, en algunos casos, la mayoría de la región variable derivada de una inmunoglobulina humana. Las CDR (todas o una parte de las mismas, así como los aminoácidos discretos que rodean las CDR) se proporcionan a partir de un anticuerpo no humano, tal como una inmunoglobulina de ratón (por ejemplo, las CDR de la región variable de la cadena ligera establecidas en las SEQ ID NO: 1 -3 o las CDR de la región variable de la cadena pesada expuestas en las SEQ ID NO: 4-6; que derivan de mAb G1 murino y se denomina inmunoglobulina donante). La región(es) constante(s) de la inmunoglobulina, puede(n) estar o no presente(s). Los anticuerpos humanizados de la presente invención ofrecen varias ventajas sobre el anticuerpo donante de ratón, que ya ha demostrado ser eficaz en modelos animales:

- 1) El sistema inmunitario humano no debe reconocer el marco o la región constante del anticuerpo humanizado como extraño, y por lo tanto la respuesta del anticuerpo contra dicho anticuerpo inyectado debe ser menor que contra un anticuerpo de ratón totalmente extraño o un anticuerpo quimérico parcialmente extraño;
- 2) Debido a que la porción efectora del anticuerpo humanizado es humana, puede interactuar mejor con otras partes del sistema inmunitario humano; y
- 3) Se ha indicado que los anticuerpos de ratón inyectados tienen una semivida en la circulación humana mucho más corta que la semivida de los anticuerpos humanos normales (véase, por ejemplo, Shaw et al., *J. Immunol.* 138:4534-4538 (1987)). Los anticuerpos humanizados inyectados tienen una semivida esencialmente equivalente a los anticuerpos humanos de origen natural, lo que permite dosis más pequeñas y menos frecuentes.

Clonación y Secuenciación de Dominios Variables de mAb G1 murino

La clonación y secuenciación del ADNc que codifica las regiones variables de la cadena pesada y ligera del anticuerpo mAb G1 murino se describe en el Ejemplo 2, y las secuencias de nucleótidos y aminoácidos predichos se muestran en la Tabla 2 a continuación (es decir, las SEQ ID NO.: 7-26).

Selección de anticuerpos humanos para suministrar restos de marco

La sustitución de las CDR de ratón en un marco de dominio variable humano es más probable que dé como resultado la retención de su orientación espacial correcta si el marco de dominio variable humano adopta la misma o similar conformación que el marco de variable de ratón a partir del cual se originaron las CDR. Esto se logra obteniendo los dominios variables humanos de los anticuerpos humanos cuyas secuencias marco muestran un alto grado de identidad de secuencia respecto de los dominios marco variables murinos de los que proceden las CDR. Las regiones marco variables de la cadena pesada y ligera pueden derivar de las mismas o de diferentes secuencias de anticuerpos humanos. Las secuencias de anticuerpos humanos pueden ser secuencias de anticuerpos humanos de origen natural o pueden ser secuencias consenso de varios anticuerpos humanos. Véase, por ejemplo, Kettleborough et al., *Protein Engineering* 4:773 (1991); Kolbinger et al., *Protein Engineering* 6:971 (1993).

Las secuencias de anticuerpos humanos adecuadas se identifican mediante comparaciones por ordenador de las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de ratón con las secuencias de anticuerpos humanos conocidos. La comparación se realiza por separado para cadenas pesadas y ligeras, pero los principios son similares para cada una.

Se han identificado dos anticuerpos humanos como anticuerpos marco adecuados para producir los anticuerpos quiméricos o humanizados de la presente divulgación. Estos incluyen la secuencia de anticuerpos humanos expuesta en el número de acceso de Genbank AAZ09096 y la secuencia de anticuerpos humanos expuesta en el número de acceso de Genbank AAC18323. El número de acceso de Genbank AAZ09096 se identificó utilizando un enfoque homólogo de emparejamiento de marco para corresponder estrechamente a la región VL del mAb G1 murino, mientras que se encontró que el número de acceso de Genbank AAC18323 correspondía estrechamente a la región VH del mAb G1 murino. Los anticuerpos quiméricos o humanizados se preparan sustituyendo todas o una parte de las regiones VL y VH de las secuencias de anticuerpos humanos con las secuencias correspondientes del mAb G1 murino, o sustituyendo solo la primera, segunda o tercera CDR de los dominios VL o VH. Los métodos de preparación de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos quiméricos y humanizados se describen en las patentes de Estados Unidos números 4.816.567, 5.530.101, 5.622.701, 5.800.815, 5.874.540, 5.914.110, 5.928.904, 6.210.670, 6.677.436 y 7.067.313 y en las solicitudes de patente de Estados Unidos 2002/0031508, 2004/0265311 y 2005/0226876. La preparación de anticuerpo o fragmentos del mismo se describe adicionalmente en las patentes de EE.UU. N.º 6.331.415, 6.818.216 y 7.067.313.

Modelado computarizado

La yuxtaposición no natural de las regiones CDR murinas con la región marco variable humana puede dar lugar a restricciones conformacionales no naturales, que, a menos que se corrijan sustituyendo determinados restos de aminoácido, dan lugar a una pérdida de afinidad de unión. Se determina la selección de restos de aminoácidos para su sustitución, en parte, mediante modelado computarizado. El hardware y software de ordenador para producir imágenes tridimensionales de moléculas de inmunoglobulina están ampliamente disponibles. En general, se producen modelos moleculares partiendo de estructuras resueltas para cadenas de inmunoglobulina o dominios de las mismas. Las cadenas que se vayan a modelar se comparan respecto de su similitud de secuencias de aminoácidos con cadenas o dominios de estructuras tridimensionales resueltas y se seleccionan como puntos de partida del modelo molecular las cadenas o dominios que muestran una mayor similitud de secuencia. Las estructuras de partida resueltas se modifican para permitir diferencias entre los aminoácidos reales en las cadenas o dominios de inmunoglobulina que se estén modelando y aquellos en la estructura de partida. Después, se ensamblan las estructuras modificadas en una inmunoglobulina compuesta. Por último, se refina el modelo mediante minimización de energía y verificando que todos los átomos se encuentran a distancias adecuadas entre sí y que las distancias y los ángulos de enlace se encuentran dentro de límites químicamente aceptables. Dicho modelo puede a su vez servir como punto de partida para predecir la estructura tridimensional de un anticuerpo que contiene las regiones determinantes de complementariedad de mAb G1 murino sustituidas en estructuras marco humanas. Se pueden construir modelos adicionales que representan la estructura cuando se introducen otras sustituciones de aminoácidos que se discutirán más adelante.

20 Sustitución de Restos de Amino Ácidos

Como se ha señalado anteriormente, los anticuerpos humanizados comprenden regiones marco variables sustancialmente de una inmunoglobulina humana y regiones determinantes de complementariedad sustancialmente de una inmunoglobulina de ratón denominada mAb G1 murina. Habiendo identificado las regiones determinantes de la complementariedad del mAb G1 murino (véase, por ejemplo, las SEQ ID NO: 1-3, que representan las CDR 1-3 de la región VL y las SEQ ID NO: 4-6, que representan las CDR 1-3 de la región VH) e inmunoglobulinasceptoras humanas apropiadas (como se discutió anteriormente), el siguiente paso es determinar qué restos, si hay alguno, de estos componentes deben sustituirse para optimizar las propiedades del anticuerpo humanizado resultante. En general, debería minimizarse la sustitución de restos de aminoácidos humanos por murinos, ya que la introducción de restos murinos aumenta el riesgo de que el anticuerpo provoque una respuesta de anticuerpo anti-murino humano (HAMA) en seres humanos. Los aminoácidos se seleccionan para la sustitución en función de su posible influencia en la conformación de CDR y/o en la unión al antígeno. La investigación de tales posibles influencias se realiza mediante el modelado, el examen de las características de los aminoácidos en ubicaciones concretas o la observación empírica de los efectos de la sustitución o la mutagénesis de aminoácidos particulares.

Cuando un aminoácido difiere entre una región marco variable de mAb G1 murino y una región marco variable humana equivalente, el aminoácido marco humano generalmente debe ser sustituido por el aminoácido de ratón equivalente si se espera razonablemente que el aminoácido:

- (1) se una de manera no covalente al antígeno de manera directa;
- (2) sea adyacente a una región CDR, sea parte de una región CDR en la definición alternativa propuesta por Kabat, Chothia y otros, o interactúe de otra manera con una región CDR (por ejemplo, esté dentro de aproximadamente 3 Å de una región CDR); o
- (3) participe en el interfaz VL-VH.

Otros candidatos para su sustitución son aminoácidos de marco aceptor humano que son infrecuentes para una inmunoglobulina humana en esa posición. Estos aminoácidos pueden sustituirse por aminoácidos en la posición equivalente de inmunoglobulinas humanas más típicas. Como alternativa, los aminoácidos de posiciones equivalentes en mAb G1 murino pueden introducirse en las regiones marco humanas cuando tales aminoácidos son típicos de la inmunoglobulina humana de las posiciones equivalentes.

Normalmente, las regiones CDR en los anticuerpos humanizados son sustancialmente idénticas y más normalmente, idénticas a las regiones CDR correspondientes en el anticuerpo mAb G1 murino. Aunque normalmente no es deseable, a veces es posible efectuar una o más sustituciones de aminoácidos conservativas de restos de CDR sin afectar de manera apreciable a la afinidad de unión de la inmunoglobulina humanizada resultante. Ocasionalmente, la sustitución de las regiones CDR puede dar como resultado una afinidad de unión mejorada.

Aparte de las sustituciones de aminoácidos específicas descritas anteriormente, las regiones marco de las inmunoglobulinas humanizadas son normalmente sustancialmente idénticas y más normalmente, idénticas a las regiones marco de los anticuerpos humanos de los que derivaron. Por supuesto, muchos de los aminoácidos en la región marco tienen una contribución escasa o no directa a la especificidad o afinidad de un anticuerpo. Por lo tanto, pueden tolerarse muchas sustituciones conservativas individuales de restos del marco sin un cambio apreciable en la

especificidad o afinidad de la inmunoglobulina humanizada resultante. Sin embargo, en general, no son deseables dichas sustituciones.

Producción de Regiones Variables

5 Al haber seleccionado conceptualmente los componentes de la CDR y del marco de las inmunoglobulinas humanizadas, hay una variedad de métodos disponibles para producir tales inmunoglobulinas. Debido a la degeneración del código, una variedad de secuencias de ácido nucleico codificará cada secuencia de aminoácido de la inmunoglobulina. Las secuencias de ácido nucleico deseadas pueden producirse mediante síntesis de ADN en fase sólida *de novo* o mediante mutagénesis por PCR de una variante previamente preparada del polinucleótido deseado. La mutagénesis mediada por oligonucleótidos es un método preferido para preparar variantes de sustitución, 10 eliminación e inserción del ADN del polipéptido diana. Véase, por ejemplo, Adelman et al., DNA 2:183 (1983). En resumen, el ADN del polipéptido diana se altera hibridando un oligonucleótido que codifica la mutación deseada para un molde de ADN monocatenario. Tras la hibridación, se usa una ADN polimerasa para sintetizar una segunda hebra complementaria completa del molde que incorpora el cebador oligonucleotídico y que codifica la alteración seleccionada en el ADN del polipéptido diana.

15 Selección de la Región Constante

Los segmentos variables de los anticuerpos humanizados producidos como se describe anteriormente están vinculados típicamente a, al menos, una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Pueden aislarse secuencias de ADN de región constante humana de acuerdo con procedimientos bien conocidos a partir de una variedad de células humanas, pero preferentemente linfocitos B 20 inmortalizados (véase, por ejemplo, Kabat et al., descrito anteriormente y el documento WO87/02671). Generalmente, el anticuerpo contendrá regiones constantes tanto de cadena ligera como de cadena pesada. La región constante de cadena pesada normalmente incluye regiones CH1, bisagra, CH2, CH3 y CH4.

Los anticuerpos humanizados incluyen anticuerpos que tienen todos los tipos de regiones constantes, incluyendo IgM, IgG, IgD, IgA e IgE y cualquier isotipo, incluyendo IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Cuando se desea que el anticuerpo humanizado muestre actividad citotóxica, el dominio constante es normalmente un dominio constante de fijación a 25 complemento y la clase es normalmente IgG1. Cuando no es deseable dicha actividad citotóxica, el dominio constante puede ser de la clase IgG4. El anticuerpo humanizado puede comprender secuencias de más de una clase o isotipo.

Sistemas de expresión

Los ácidos nucleicos que codifican las regiones variables humanizadas de la cadena ligera y pesada, opcionalmente 30 unidas a regiones constantes, se insertan en vectores de expresión. Las cadenas ligeras y pesadas pueden clonarse en los mismos o en diferentes vectores de expresión. Los segmentos de ADN que codifican las cadenas de inmunoglobulina están unidos operativamente a secuencias control en el(los) vector(es) de expresión que aseguran la expresión de polipéptidos de inmunoglobulina. Tales secuencias control incluyen una secuencia de señal, un promotor, un potenciador y una secuencia de terminación de la transcripción. Los vectores de expresión generalmente 35 son replicables en los organismos hospedadores, ya sea como episomas o como parte integral del ADN cromosómico del hospedador. Habitualmente, los vectores de expresión contendrán marcadores de selección, por ejemplo, tetraciclina o neomicina, para permitir la detección de aquellas células transformadas con las secuencias de ADN deseadas (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos n.º 4.704.362).

E. coli es un hospedador procarionta particularmente útil para clonar los polinucleótidos de la presente invención. Otros 40 hospedadores microbianos adecuados para su uso incluyen bacilos, tales como Bacillus subtilis, y otras enterobacterias, como Salmonella, Serratia y varias especies de Pseudomonas. En estos hospedadores procariontas, también pueden producirse vectores de expresión, que típicamente contendrán secuencias de control de la expresión compatibles con la célula hospedadora (por ejemplo, un origen de replicación). Además, estará presente cualquier número de una serie de promotores bien conocidos, tales como el sistema de promotor de lactosa, un sistema de 45 promotor de triptófano (trp), un sistema promotor de beta-lactamasa o un sistema promotor de fago lambda. Los promotores normalmente controlarán la expresión, opcionalmente con una secuencia operadora y tienen secuencias de sitio de unión a ribosomas y similares, para iniciar y completar la transcripción y la traducción.

Otros microbios, tales como levaduras, también pueden usarse para la expresión. Un hospedador preferido es Saccharomyces, con vectores adecuados que contienen secuencias de control de la expresión, tal como promotores, 50 que incluyen 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glucolíticas, y un origen de replicación, secuencias de terminación y similares, según se desee.

Además de microorganismos, también pueden usarse cultivos de células de tejidos de mamíferos para expresar y producir los anticuerpos de la presente divulgación (véase, por ejemplo, Winnacker, From Genes to Clones (VCH Publishers, N.Y., N.Y., 1987). De hecho, se prefieren células eucariotas, porque se han desarrollado varias líneas de

células hospedadoras adecuadas capaces de secretar inmunoglobulinas intactas. Las células hospedadoras adecuadas preferidas para expresar ácidos nucleicos que codifican las inmunoglobulinas de la divulgación incluyen: línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (CoS -7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (293) (Graham et al., J. Gen. Virol. 36:59 (1977)); células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino-DHFR (CHO), Urlaub y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 77:4216 (1980); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1, ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL 1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC, CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor de mama de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); y, células TRI (Mather, et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-46 (1982)); y células de baculovirus.

Los vectores que contienen las secuencias del polinucleótido de interés (por ejemplo, las secuencias que codifican la cadena pesada y ligera y las secuencias de control de la expresión) pueden transferirse a la célula hospedadora mediante métodos bien conocidos, que varían dependiendo del tipo de hospedador celular. Por ejemplo, normalmente se usa transfección con cloruro de calcio para células procariontas, mientras que el tratamiento con fosfato de calcio o electroporación se pueden usar para otros hospedadores celulares. (Véase, a título general, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, 2ª ed., 1989). Cuando se clonan las cadenas pesadas y ligeras en vectores de expresión separados, se cotransfectan los vectores para obtener la expresión y el ensamblaje de inmunoglobulinas intactas. Después de la introducción de ADN recombinante, las líneas celulares que expresan productos de inmunoglobulina son células seleccionadas. Se prefieren líneas celulares capaces de expresión estable (es decir, niveles de expresión no disminuidos después de cincuenta pases de la línea celular).

Una vez expresados, los anticuerpos completos, sus dímeros, las cadenas ligeras y pesadas individuales u otras formas de inmunoglobulina de la presente divulgación pueden purificarse de acuerdo con procedimientos convencionales de la técnica, incluyendo precipitación con sulfato de amonio, columnas de afinidad, cromatografía en columna, electroforesis en gel y similares (véase, a título general, Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, N.Y., 1982). Se prefieren inmunoglobulinas sustancialmente puras con una homogeneidad de al menos aproximadamente el 90 al 95%, prefiriéndose aún más una homogeneidad del 98 al 99%, para usos farmacéuticos.

Las técnicas recombinantes descritas anteriormente también se pueden usar para la expresión de secuencias naturales que codifican anticuerpos humanos o murinos. Este enfoque es particularmente ventajoso para la expresión de anticuerpos humanos que se aíslan como líneas celulares inestables.

Los anticuerpos intactos y los fragmentos de anticuerpos descritos en el presente documento a menudo se producen mediante la expresión de ácidos nucleicos. Todos los ácidos nucleicos que codifican cualquier anticuerpo o anticuerpo descrito en esta solicitud se incluyen expresamente en la divulgación. Las modificaciones de los ácidos nucleicos se logran fácilmente mediante una variedad de técnicas bien conocidas, como la mutagénesis dirigida al sitio (véase Gillman y Smith, Gene, 8:81-97 (1979) y Roberts, et al., Nature, 328:731-734 (1987)). Muchos de los ácidos nucleicos de la divulgación muestran una identidad de secuencia sustancial con los ácidos nucleicos que codifican las cadenas pesada y ligera del mAb G1 murino o los derivados humanizados ejemplificados del mismo.

Fragmentos de anticuerpo

En la invención, se proporcionan fragmentos de unión a antígeno de los anticuerpos intactos descritos en el presente documento. Normalmente, estos fragmentos compiten con el anticuerpo intacto del que derivaron para la unión específica a P-selectina y se unen con una afinidad de al menos 10^7 , 10^8 , 10^9 M⁻¹, or 10^{10} M⁻¹. Los fragmentos de anticuerpos incluyen cadenas pesadas variables separadas, cadenas ligeras variables, Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc y Fv. Los fragmentos pueden producirse por separación enzimática o química de inmunoglobulinas intactas. Por ejemplo, se puede obtener un fragmento F(ab')₂ a partir de una molécula de IgG mediante digestión proteolítica con pepsina a pH 3,0-3,5 usando métodos convencionales como los descritos en Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Pubs., N. Y. (1988). Los fragmentos Fab pueden obtenerse a partir de fragmentos F(ab')₂ por reducción limitada, o a partir de anticuerpos completos por digestión con papaína en presencia de agentes reductores. (Véase id.) Los fragmentos también pueden producirse mediante técnicas de ADN recombinante. Los segmentos de ácidos nucleicos que codifican fragmentos seleccionados se producen por digestión de secuencias codificantes de longitud completa con enzimas de restricción, o por síntesis de novo. A menudo, los fragmentos se expresan en forma de proteínas de fusión de la cubierta del fago. Esta forma de expresión es ventajosa para el perfeccionamiento de la afinidad de los anticuerpos como se discute en la Sección IV.

Muchas de las inmunoglobulinas descritas en el presente documento pueden sufrir sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos no críticos tanto en las regiones variables como constantes sin pérdida de la especificidad de unión o de las funciones efectoras, o de la reducción intolerable de la afinidad de unión (es decir, por debajo de aproximadamente 10^7 M⁻¹). Habitualmente, las inmunoglobulinas que incorporan tales alteraciones muestran una identidad de secuencia sustancial con una inmunoglobulina de referencia de la que derivaron. Ocasionalmente, se puede seleccionar una inmunoglobulina mutada que tenga la misma especificidad y afinidad aumentada en comparación con una inmunoglobulina de referencia de la que derivó. La tecnología de presentación

en fagos ofrece poderosas técnicas para seleccionar tales inmunoglobulinas. Véase, por ejemplo, Dower et al., documento WO 91/17271 McCafferty et al., documento WO 92/01047; y Huse, documento WO 92/06204.

Métodos terapéuticos y Diagnósticos

5 Los métodos terapéuticos emplean los anticuerpos (fragmentos completos y de unión) comentados en el presente documento como agentes terapéuticos para el tratamiento de diversas enfermedades inflamatorias y trombóticas, tales como, por ejemplo, enfermedad de células falciformes (o crisis de dolor asociada con la enfermedad de células falciformes), trombosis venosa profunda, asma, artritis reumatoide, psoriasis y lesión de isquemia por reperfusión. Los anticuerpos pueden administrarse para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos de, por ejemplo, rechazo de trasplante, enfermedad de injerto frente a huésped, enfermedades autoinmunitarias como la diabetes mellitus dependiente de insulina, esclerosis múltiple, Síndrome de Stiff Man, artritis reumatoide, miastenia gravis y lupus eritematoso, y trastornos inflamatorios.

15 Los agentes terapéuticos son particularmente adecuados para el tratamiento de afecciones inflamatorias y trombóticas que incluyen daño tisular mediado por leucocitos post-isquémico (lesión por reperfusión) que surge del shock traumático, ictus, infarto de miocardio, rechazo de trasplante agudo, enfermedad de células falciformes (o crisis de dolor asociada con la enfermedad de células falciformes), lesión por congelación, síndrome compartimental y afecciones fisiopatológicas asociadas con derivación cardiopulmonar, lesión pulmonar aguda mediada por leucocitos (por ejemplo, síndrome de dificultad respiratoria en adultos), septicemia, sepsis asociada a la herida secundaria a una infección viral, por ejemplo, virus del herpes simple, reacciones alérgicas mediadas por IgE, tal como enfermedad asmática de fase aguda y afecciones inflamatorias crónicas, incluyendo artritis reumatoide, dermatitis atópica y psoriasis.

20 La lesión por isquemia/reperfusión es una afección inflamatoria que ocurre al restaurar el flujo sanguíneo a los órganos que sufren un suministro obstruido que causa isquemia (falta de oxígeno). A menos que se alivie rápidamente con la reperfusión, la isquemia causa la muerte de las células circundantes y, eventualmente, la muerte de un órgano completo o del paciente. Sin embargo, la evidencia acumulada sugiere que la reperfusión en sí misma puede ejercer efectos nocivos sobre el tejido circundante. Se cree que los efectos nocivos de la reperfusión resultan, al menos en parte, de una respuesta inflamatoria mediada por neutrófilos activados en el flujo sanguíneo restaurado. Algunos pacientes tienen isquemia de cuerpo entero, mientras que en otros pacientes la isquemia se limita a partes u órganos particulares del cuerpo. Por ejemplo, un paciente puede sufrir de isquemia epidérmica, miocárdica, renal, cerebral, esplénica, hepática, espinal, esplácnica, pulmonar, parcial del cuerpo o de todo el cuerpo. Los agentes terapéuticos de la divulgación funcionan antagonizando la interacción de tales leucocitos con la P-selectina.

25 Los anticuerpos de P-selectina y las composiciones farmacéuticas de los mismos son particularmente útiles para la administración parenteral, es decir, subcutánea, intramuscular o intravenosa. Se pueden utilizar varios métodos de administración de fármacos.

35 Por ejemplo, los anticuerpos de P-selectina pueden administrarse en liposomas, tales como moléculas anfipáticas o de doble carácter (polar: no polar), que existen como agregados en solución acuosa. Las anfipáticas incluyen lípidos no polares, lípidos polares, mono y diglicéridos, sulfamidas, lisolecitina, fosfolípidos, saponina, ácidos biliares y sales. Estas moléculas pueden existir como emulsiones y espumas, micelas, monocapas insolubles, cristales líquidos, dispersiones de fosfolípidos y capas lamelares. Estos se denominan genéricamente en el presente documento liposomas. En estas preparaciones, el fármaco a administrar se incorpora como parte de un liposoma en el que está incrustada una inmunoglobulina anti-P-selectina. En la presente divulgación, la inmunoglobulina no necesita unirse a un epítipo funcional en la molécula de P-selectina, siempre que la inmunoglobulina dirija de manera eficaz el liposoma a las moléculas de P-selectina. Cuando los liposomas se acercan a las células afectadas, suministran las composiciones terapéuticas seleccionadas.

45 Hay una variedad de métodos disponibles para preparar liposomas, tal como se describe en, por ejemplo, Szoka *et al.*, Ann. Rev. Biophys. *Bioeng.* 9:467 (1980), las patentes de Estados Unidos con números 4.235.871 4.501.728 y 4.837.028. El direccionamiento de los liposomas usando una variedad de agentes de direccionamiento (por ejemplo, ligandos, receptores y anticuerpos monoclonales) es bien conocido en la técnica. (véase, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N.º 4.957.773 y 4.603.044). Se pueden usar métodos convencionales para acoplar agentes de direccionamiento a liposomas. Los liposomas dirigidos contra anticuerpos pueden construirse utilizando, por ejemplo, liposomas que incorporan proteína A (véase Renneisen, et al., J. Biol. Chem., 265:16337-16342 (1990) y Leonetti et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 87:2448-2451 (1990)).

50 Las composiciones farmacéuticas para administración parenteral generalmente comprenden una solución de un agente terapéutico (por ejemplo, un anticuerpo contra P-selectina) o un cóctel de varios de tales agentes disueltos en un vehículo aceptable, preferentemente un vehículo acuoso. Se puede usar una variedad de vehículos acuosos, por ejemplo, agua, agua tamponada, solución salina al 0,4%, glicina al 0,3% y similares. Estas soluciones son estériles y están generalmente libres de materia particular. Estas composiciones pueden esterilizarse por técnicas

convencionales de esterilización bien conocidas. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables tal como se requiere para aproximar las condiciones fisiológicas tal como el ajuste del pH y los agentes tamponantes, agentes de ajuste de la toxicidad, y similares, por ejemplo, acetato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, lactato sódico, etc. La concentración de anticuerpo en estas formulaciones puede variar ampliamente, es decir, desde menos de aproximadamente el 0,5%, generalmente en o al menos aproximadamente el 0,1% hasta tanto como el 1,5% o el 2,0% en peso y se seleccionará principalmente en función de los volúmenes de fluidos, de las viscosidades, etc., de acuerdo con el modo particular de administración seleccionado. Los métodos reales para preparar composiciones administrables por vía parenteral serán conocidas o evidentes para los expertos en la materia y se describen en más detalle en, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 17ª edición, Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1985).

Los anticuerpos de esta divulgación pueden liofilizarse para su almacenamiento y reconstituirse en un vehículo adecuado antes de su uso. Esta técnica ha demostrado ser eficaz con inmunoglobulinas convencionales y se pueden emplear técnicas de liofilización y reconstitución conocidas en la técnica. La liofilización y la reconstitución pueden llevar a diversos grados de pérdida de actividad de anticuerpos (por ejemplo, con inmunoglobulinas convencionales, los anticuerpos IgM tienden a tener una mayor pérdida de actividad que los anticuerpos IgG) y es posible que deban ajustarse los niveles de uso para compensar.

Las composiciones que contienen los presentes anticuerpos o un cóctel de los mismos pueden administrarse para los tratamientos profilácticos y/o terapéuticos. En la aplicación terapéutica, las composiciones se administran a un paciente en una cantidad suficiente para curar o al menos detener parcialmente el estado de la enfermedad (es decir, el estado inflamatorio o trombótico) y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como una "dosis terapéuticamente eficaz". Las cantidades eficaces para este uso dependerán de la gravedad de la enfermedad y del estado general del propio sistema inmunitario del paciente, pero generalmente varían de aproximadamente 0,05 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal, preferentemente entre aproximadamente 0,2 mg/kg de peso corporal hasta aproximadamente 1,5 mg/kg de peso corporal.

Las administraciones únicas o múltiples de las composiciones pueden llevarse a cabo con niveles de dosis y patrón a seleccionar por médico que trata. En cualquier caso, las formulaciones farmacéuticas deben proporcionar una cantidad de inmunoglobulinas de esta descripción suficiente para tratar al paciente de manera eficaz.

Los anticuerpos desvelados en el presente documento (fragmentos completos y de unión) también pueden usarse para fines de diagnóstico. Una cantidad suficiente para estos fines se define como una "dosis diagnósticamente eficaz". En los usos de diagnóstico, las cantidades precisas dependerán del estado de salud del paciente, del modo de administración y similares. Los anticuerpos pueden estar marcados o sin marcar. Los anticuerpos no marcados se pueden usar en combinación con otros anticuerpos marcados (segundos anticuerpos) que son reactivos con el anticuerpo, tales como los anticuerpos específicos para la región constante de la inmunoglobulina particular. Como alternativa, los anticuerpos se pueden marcar directamente. Puede emplearse una amplia variedad de etiquetas, tales como radionúclidos, agentes fluorescentes, enzimas, sustratos enzimáticos, cofactores enzimáticos, inhibidores enzimáticos, ligandos (haptenos concretos).

Los anticuerpos (fragmentos completos y de unión) son útiles para detectar la presencia de células que llevan P-selectina. La presencia de tales células es diagnóstica de una afección o enfermedad inflamatoria y puede indicar la necesidad de comenzar un método terapéutico discutido anteriormente. El diagnóstico se puede realizar mediante la extracción de una muestra celular de un paciente. La cantidad de receptor de P-selectina expresado en células individuales de la muestra se determina a continuación, por ejemplo, mediante tinción inmunohistoquímica de células fijas o mediante transferencia Western de un extracto celular con un anticuerpo de la divulgación. El uso de anticuerpos anti-P-selectina para tratar enfermedades inflamatorias y trombóticas se describe en las patentes de EE. UU. Números 5.622.701, 5.800.815 y 6.210.670 y en las solicitudes de patente de EE. UU. Números. 2002/0031508, 2004/0265311 y 2005/0226876.

El diagnóstico también se puede lograr mediante la administración in vivo de un anticuerpo marcado (preferiblemente un anticuerpo humanizado o humano) y la detección por imágenes in vivo. La concentración de anticuerpo administrado debe ser suficiente para que la unión a las células que tienen el antígeno diana sea detectable en comparación con la señal de fondo. El reactivo de diagnóstico se puede etiquetar con un radioisótopo para imágenes de cámara o un isótopo paramagnético para imagen de resonancia magnética o de resonancia de espín de electrones.

Un cambio (típicamente un aumento) en el nivel de proteína P-selectina en una muestra celular o imagen de un individuo, que está fuera del rango de los niveles normales clínicamente establecidos, puede indicar la presencia de un estado de enfermedad indeseable en el individuo de quien se obtuvo la muestra y/o indica una predisposición del individuo para desarrollar (o progresar a través de) tal estado de enfermedad.

Los kits también pueden suministrarse para su uso con los anticuerpos sujetos. Por lo tanto, la composición del anticuerpo sujeto de la presente divulgación se puede proporcionar, generalmente en forma liofilizada en un recipiente, ya sea solo o junto con otros componentes necesarios para tratar o prevenir un estado de enfermedad (por ejemplo, instrucciones de uso u otros agentes para uso en el tratamiento del estado de la enfermedad). Los anticuerpos, que pueden estar conjugados a una etiqueta o toxina, o no conjugados, se incluyen en los kits con tampones, tales como

Tris, fosfato, carbonato, etc., estabilizadores, biocidas, proteínas inertes, por ejemplo, albúmina de suero o similares y un conjunto de instrucciones de uso. En general, estos materiales estarán presentes en menos del 5% en peso basado en la cantidad de anticuerpo activo, y generalmente presentes en una cantidad total de al menos aproximadamente 0,001% en peso basado nuevamente en la concentración de anticuerpos. Frecuentemente, será deseable incluir un extensor o excipiente inerte para diluir los ingredientes activos, donde el excipiente puede estar presente en aproximadamente del 1 al 99% en peso de la composición total. Cuando se emplea un segundo anticuerpo capaz de unirse a un anticuerpo anti-P-selectina en un ensayo, el segundo anticuerpo generalmente se presentará en un vial separado. El segundo anticuerpo se conjuga típicamente con una etiqueta y se formula como se describe anteriormente.

10 Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración:

Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de Anticuerpos Quiméricos o Humanizados

15 Los anticuerpos anti-P-selectina pueden prepararse reemplazando una o más de las CDR de una secuencia de anticuerpo humano con las CDR del mAb G1 murino. Como alternativa, todas o una parte de las regiones variables de la cadena pesada y ligera del mAb G1 murino pueden usarse para reemplazar la secuencia correspondiente en una inmunoglobulina de FR humana. Las secuencias CDR de la cadena ligera del mAb G1 murino se exponen en las SEQ ID NO: 1-3, mientras que las secuencias CDR de la cadena pesada del mAb G1 murino se exponen en las SEQ ID NO: 4-6.

20 Para diseñar la región Fv del anticuerpo humanizado que incluye una región variable VL de cadena ligera y una región variable VH de cadena pesada, se identifican primero las secuencias VL y VH humanas que se expresan con frecuencia en el cuerpo humano y que tienen una identidad de secuencia significativa con las secuencias VL y VH de ratón respectivamente. Sobre la base de estos dos factores, se seleccionaron la secuencia VL humana indicada con el número de acceso de Genbank AAZ09096 y la secuencia VH humana indicada con el número de acceso de Genbank AAC18323. A continuación, tal y como se muestra en las figuras 1 y 2, las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de las secuencias VL y VH humanas se reemplazaron por las CDR correspondientes del anticuerpo de ratón anti-P-selectina: los aminoácidos 24-34, 50-56 y 89-97 de la SEQ ID NO: 45 de la VL humana ("AAZ09096") se sustituyeron con los aminoácidos 24-38, 54-60 y 93-101 de la SEQ ID NO: 44 de la VL de ratón ("G1-VK") que produce respectivamente un anticuerpo VL humanizado "agresivamente" ("Hu-G1-VK_v1") que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 46; y los aminoácidos 31-35, 50-66 y 99-111 de la SEQ ID NO: 49 de la VH humana (la forma escindida de "AAC18323") se sustituyeron con los aminoácidos 31-35, 50-66 y 99-111 de la SEQ ID NO: 48 de la VH de ratón ("G1-VH") respectivamente. Los aminoácidos adicionales de las regiones VL y VH humanas cerca de las CDR se sustituyeron con los aminoácidos correspondientes presentes en el anticuerpo de ratón anti-P-selectina para preservar mejor la afinidad de unión a P-selectina de los anticuerpos humanizados. Para identificar los restos proximales a las CDR, las secuencias humanas de la cadena ligera ("AAZ09096") y la cadena pesada ("AAC18323") se alinearon con secuencias murinas similares 1IQW (una VL murina) y 1NMC (una VH murina) con estructuras tridimensionales conocidas en el Protein Data Bank (PDB). Al superponer las secuencias VL y VH humanas sobre las secuencias VL y VH murinas y a continuación minimizar la energía de la estructura resultante utilizando el software SPDBV, se identificaron los aminoácidos en las VL y VH humanas proximales a las CDR: dichos aminoácidos proximales pueden estar adyacentes a las CDR o posicionarse cerca de las CDR, por ejemplo, dentro de 4-6 Å de aminoácidos en una CDR, en virtud de la estructura tridimensional del anticuerpo. Se identificaron cuatro aminoácidos de la VL humana como proximales a las CDR, incluidos los aminoácidos 3, 4, 58 y 60 de la SEQ ID NO: 45 y se identificaron diez aminoácidos de la VH humana como proximales a las CDR, incluidos los aminoácidos 29, 38, 43, 48, 67, 68, 70, 72, 74 y 98 de la SEQ ID NO: 49, todos ellos diferían entre las secuencias de anticuerpos de ratón y humano respectivas: se realizó la sustitución de los aminoácidos correspondientes en las VL y VH murinas en muchas de estas regiones, dependiendo de cómo de "conservativo" (con menos aminoácidos humanos) o "agresivo" (con más aminoácidos humanos) se deseara que fuera el anticuerpo humanizado resultante. En una versión más "conservativa" del anticuerpo VL humanizado (que tiene menos restos humanos), los aminoácidos 4 (metionina) y 58 (valina) de la SEQ ID NO: 45 de la VL humana ("AAZ09096") se sustituyeron con los aminoácidos 4 (leucina) y 62 (isoleucina) de la SEQ ID NO: 44 de la VL de ratón ("G1-VK") produciendo respectivamente el anticuerpo VL humanizado "conservativamente" ("Hu-G1-VK_v2") que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 47. En una versión "agresiva" del anticuerpo VH humanizado (que tiene más aminoácidos humanos), solo los aminoácidos 29 (leucina), 72 (glutamato), 74 (treonina) y 98 (treonina) de la SEQ ID NO: 49 del VH humano (la forma escindida de "AAC18323") se sustituyeron por los aminoácidos 29 (fenilalanina), 72 (valina), 74 (lisina) y 98 (arginina) de la SEQ ID NO: 48 de VH de ratón ("G1-VH") respectivamente, produciendo el anticuerpo VH humanizado "agresivamente" ("Hu-G1-VH_v1") que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 50. De manera similar, en una versión "conservativa" del anticuerpo VH humanizado, los aminoácidos 29 (leucina), 48 (metionina), 67 (arginina), 68 (valina), 70 (metionina), 72 (glutamato), 74 (treonina) y 98 (treonina) de la SEQ ID NO: 49 del VH humano (la forma escindida de "AAC18323") se sustituyeron por los aminoácidos 29 (fenilalanina), 48 (isoleucina), 67 (lisina), 68 (alanina), 70 (leucina), 72 (valina), 74 (lisina) y 98 (arginina) de la SEQ ID NO: 48 de VH de ratón ("G1-VH") respectivamente, produciendo el anticuerpo VH humanizado "conservativamente" ("Hu-G1-VH_v2") que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 51.

Usando este procedimiento, cualquier anticuerpo anti-P-selectina humanizado o quimérico, fragmentos de anticuerpo, anticuerpo bifuncional o derivado de anticuerpo que tenga una región Fv variable con CDR que tengan, por ejemplo, el 90%, el 95%, el 99% o más de identidad de secuencia con los aminoácidos 24-38, 54-60, o 93-101 de la SEQ ID NO: 44 de la VL de ratón ("G1-VK") o los aminoácidos 31-35, 50-66, o 99-111 de la SEQ ID NO: 48 de la VH de ratón ("G1-VH"), que se une a P-selectina, pueden diseñarse y sintetizarse usando técnicas conocidas en la técnica. Preferentemente, cualquier anticuerpo anti-P-selectina humanizado o quimérico, fragmentos de anticuerpo, anticuerpo bifuncional o derivado de anticuerpo tendrá valina en la 3ª posición, leucina en la 4ª posición, isoleucina en la 58ª posición o alanina en la 60ª posición de una o más de sus regiones VL o una fenilalanina en la 29ª posición, lisina en la 38ª posición, glutamina en la 43ª posición, isoleucina en la 48ª posición, lisina en la 67ª posición, alanina en la 68ª posición, leucina en la 70ª posición, valina en la 72ª posición, lisina en la 74ª posición o arginina en la 98ª posición de una o más de sus regiones VL.

Ejemplo 2. Clonación De Anticuerpo Murino

El ARNm se extrajo de los sedimentos celulares de hibridoma y el análisis en gel de agarosa mostró un alto rendimiento del ARN extraído del sedimento. El ADNc se creó a partir del ARN mediante transcripción inversa con un cebador oligo(dT). Las reacciones de PCR que utilizan cebadores degenerados de dominio variable para amplificar las regiones VH y VL del ADN de anticuerpo monoclonal dieron las bandas que se muestran en la Figura 3. Los productos de PCR purificados VH y VL de RT-PCR se clonaron en un vector de secuenciación y se determinaron los transformantes positivos mediante PCR de colonias. A partir de la RT-PCR, se identificaron 6 clones VL y 6 clones VH y se secuenció el ADN. La secuencia de aminoácidos derivó de la secuencia del marco de lectura abierto del ADN. Hubo una única secuencia consenso tanto para la cadena ligera variable como para la cadena pesada variable (véanse las Tablas 1 y 2).

Tabla 1: Secuencias de CDR de mAb G1 murino

Secuencias de aminoácidos	
CDR1 de VL:	KASQSVDYDGHSYMN (SEQ ID NO: 1)
CDR2 de VL:	AASNLES (SEQ ID NO: 2)
CDR3 de VL:	QQSDENPLT (SEQ ID NO: 3).
CDR1 de VH:	SYDIN (SEQ ID NO: 4)
CDR2 de VH:	WIYPGDGSIKYNEKFKG (SEQ ID NO: 5)
CDR3 de VH:	RGEYGNIEGAMDY (SEQ ID NO: 6)

Tabla 2: Secuencias VL y VH de productos de RT-PCR clonados de células de hibridoma que expresan mAb G1 murino. Se identificaron y secuenciaron 6 clones de VL y se identificaron y secuenciaron 6 clones de VH.

Clon VL1

Secuencia de ADN (SEQ ID NO: 7):

GACATTGTGCTAACCCAATCTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAG
 AGGGCCACCATCTCCTGCAAGGCCAGCCAAAGTGTTGATTATGATGGTCA
 TAGTTATATGAACTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAACTCC
 TCATCTATGCTGCATCCAATCTAGAATCTGGGATCCAGCCAGGTTTAGTG
 GCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAG
 GAGGATGCTGCAACCTATTACTGTCAGCAAAGTGATGAAAATCCCCTCAC
 GTTCGGTACTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGG

Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:8):

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYDGHSYMNWYQQKPGQPPKLLI
 YAASNLESGIPARFSGSGSFTDFTLNHPVEEEDAATYYCQQSDENPLTFGTGT
 KLELKR

Clon VL2

ES 2 699 273 T3

Secuencia de ADN (SEQ ID NO: 9):

GACATTGTGCTGACCCAATCTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAG
AGGGCCACCATCTCCTGCAAGGCCAGCCAAAGTGTTGATTATGATGGTCA
TAGTTATATGAACTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAACTCC
TCATCTATGCTGCATCCAATCTAGAATCTGGGATCCCAGCCAGGTTTAGTG
GCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAG
GAGGATGCTGCAACCTATTACTGTCAGCAAAGTGATGAAAATCCCCTCAC
GTTTCGGTACTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGG

Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:10):

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYDGHSYMNWYQQKPGQPPKLLI
YAASNLESGIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYQCQSDENPLTFGTGT
KLELKR

Clon VL3

Secuencia de ADN (SEQ ID NO: 11):

GACATCCAGATGACACAGTCTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAG
AGGGCCACCATCTCCTGCAAGGCCAGCCAAAGTGTTGATTATGATGGTCA
TAGTTATATGAACTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAACTCC
TCATCTATGCTGCATCCAATCTAGAATCTGGGATCCCAGCCAGGTTTAGTG
GCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAG
GAGGATGCTGCAACCTATTACTGTCAGCAAAGTGATGAAAATCCCCTCAC
GTTTCGGTACTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGG

Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:12):

DIQMTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYDGHSYMNWYQQKPGQPPKLLI
YAASNLESGIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYQCQSDENPLTFGTGT
KLELKR

Clon VL4

Secuencia de ADN (SEQ ID NO: 13):

GACATTGTGCTGACCCAGTCTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAG
AGGGCCACCATCTCCTGCAAGGCCAGCCAAAGTGTTGATTATGATGGTCA
TAGTTATATGAACTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAACTCC
TCATCTATGCTGCATCCAATCTAGAATCTGGGATCCCAGCCAGGTTTAGTG
GCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAG
GAGGATGCTGCAACCTATTACTGTCAGCAAAGTGATGAAAATCCCCTCAC
GTTTCGGTACTGGGACCAAGCTGGAGCTGA

Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:14):

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYDGHSYMNWYQQKPGQPPKLLI
YAASNLESGIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQQSDENPLTFGTGT
KLEL

Clon VL6

Secuencia de ADN (SEQ ID NO: 15):

GACATTGTGCTAACCCAGTCTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAG
AGGGCCACCATCTCCTGCAAGGCCAGCCAAAGTGTTGATTATGATGGTCA
TAGTTATATGAACTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAAACTCC
TCATCTATGCTGCATCCAATCTAGAATCTGGGATCCCAGCCAGGTTTAGTG
GCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAG
GAGGATGCTGCAACCTATTACTGTCAGCAAAGTGATGAAAATCCCCTCAC
GTTCCGGTACTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGG

Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:16):

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYDGHSYMNWYQQKPGQPPKLLI
YAASNLESGIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQQSDENPLTFGTGT
KLELKR

Clon VH2

Secuencia de ADN (SEQ ID NO: 17):

AGGTGAAGCTGCAGCAGTCAGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTTA
GTGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTACAAGCTACGATATA
AATTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGACTTGAGTGGATTGGATGGAT
TTATCCTGGAGATGGTAGTATTAAGTACAATGAGAAATTCAAGGGCAAGG
CCCACTGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGGTCAGC
AGCCTGACTTCTGAGAATTCTGCAGTCTATTTCTGTGCAAGACGGGGGGA
GTATGGTAACTACGAGGGGGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACCACG
GTCACCGTCTCCTCA

Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:18):

VKLQSQGPELVKPGALVKISCKASGYTFTSYDINWVKQRPGQGLEWIGWIYP
GDGSIKYNEKFKGKATLTVDKSSSTAYMQVSSLTSENSAVYFCARRGEYGN
Y
EGAMDYWGQGTTVTVSS

Clon VH3

Secuencia de ADN (SEQ ID NO: 19):

AGGTCAAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTTA
GTGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTCACAAGCTACGATATA
AATTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGACTTGAGTGGATTGGATGGAT
TTATCCTGGAGATGGTAGTATTAAGTACAATGAGAAATTCAAGGGCAAGG
CCACACTGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGGTCAGC
AGCCTGACTTCTGAGAATTCTGCAGTCTATTTCTGTGCAAGACGGGGGGA
GTATGGTAACTACGAGGGGGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACCACG
GTCACCGTCTCCTCA

Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:20):

VKLQSGPELVKPGALVKISCKASGYTFTSYDINWVKQRPGQGLEWIGWIYP
GDGSIKYNEKFKGKATLTVDKSSSTAYMQVSSLTSENSAVYFCARRGEYGN
YEGAMDYWGQGTTVTVSS

Clon VH4

Secuencia de ADN (SEQ ID NO: 21):

AGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTTA
GTGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTCACAAGCTACGATATA
AATTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGACTTGAGTGGATTGGATGGAT
TTATCCTGGAGATGGTAGTATTAAGTACAATGAGAAATTCAAGGGCAAGG
CCACACTGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGGTCAGC
AGCCTGACTTCTGAGAATTCTGCAGTCTATTTCTGTGCAAGACGGGGGGA
GTATGGTAACTACGAGGGGGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACCACG
GTCACCGTCTCCTCA

Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:22):

VQLQESGPELVKPGALVKISCKASGYTFTSYDINWVKQRPGQGLEWIGWIYP
GDGSIKYNEKFKGKATLTVDKSSSTAYMQVSSLTSENSAVYFCARRGEYGN
YEGAMDYWGQGTTVTVSS

Clon VH5

Secuencia de ADN (SEQ ID NO: 23):

AGGTGAAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTTA
GTGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTCACAAGCTACGATATA
AATTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGACTTGAGTGGATTGGATGGAT
TTATCCTGGAGATGGTAGTATTAAGTACAATGAGAAATTCAAGGGCAAGG
CCACACTGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGGTCAGC
AGCCTGACTTCTGAGAATTCTGCAGTCTATTTCTGTGCAAGACGGGGGGA
GTATGGTAACTACGAGGGGGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACCACG
GTCACCGTCTCCTCA

Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:24):

VKLQQSGPELVKPGALVKISCKASGYTFTSYDINWVKQRPGQGLEWIGWIYP
GDGSIKYNEKFKGKATLTVDKSSSTAYMQVSSLTSENSAVYFCARRGEYGN
EGAMDYWGQGTTVTVSS

Clon VH6

Secuencia de ADN (SEQ ID NO: 25):

AGGTGCAGCTGCAGCAGTCAGGACCTGAACTGGTGAAGCCTGGGGCTTTA
GTGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTCACAAGCTACGATATA
AATTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGACTTGAGTGGATTGGATGGAT
TTATCCTGGAGATGGTAGTATTAAGTACAATGAGAAATTCAAGGGCAAGG
CCACACTGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGGTCAGC
AGCCTGACTTCTGAGAATTCTGCAGTCTATTTCTGTGCAAGACGGGGGGA
GTATGGTAACTACGAGGGGGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACCACG
GTCACCGTCTCCTCA

Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:26):

VQLQQSGPELVKPGALVKISCKASGYTFTSYDINWVKQRPGQGLEWIGWIYP
GDGSIKYNEKFKGKATLTVDKSSSTAYMQVSSLTSENSAVYFCARRGEYGN
EGAMDYWGQGTTVTVSS

Secuencias consenso de los clones VL y VH de mAb murino secuenciados:

Dominio variable de la cadena ligera:

Secuencia de ADN (SEQ ID NO: 27):

GACATTGTGCTGACCCAGTCTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAG
AGGGCCACCATCTCCTGCAAGGCCAGCCAAAGTGTTGATTATGATGGTCA
TAGTTATATGAACTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAACTCC
TCATCTATGCTGCATCCAATCTAGAATCTGGGATCCCAGCCAGGTTTAGTG
GCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAG
GAGGATGCTGCAACCTATTACTGTCAGCAAAGTGATGAAAATCCCCTCAC
GTTCCGGTACTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGG

5 Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:28):

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYDGHSYMNWYQQKPGQPPKLLI
YAASNLESGIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQQSDENPLTFGTGT
KLELKR

Dominio variable de la cadena pesada:

Secuencia de ADN (SEQ ID NO: 29): *

AGGTGAAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTTA
GTGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTCACAAGCTACGATATA
AATTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGACTTGAGTGGATTGGATGGAT
TTATCCTGGAGATGGTAGTATTAAGTACAATGAGAAATTCAAGGGCAAGG
CCACACTGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGGTCAGC
AGCCTGACTTCTGAGAATTCTGCAGTCTATTTCTGTGCAAGACGGGGGGA
GTATGGTAACTACGAGGGGGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACCACG
GTCACCGTCTCCTCA

Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:30):*

VKLQQSGPELVKPGALVKISCKASGYTFTSYDINWVKQRPQGLEWIGWIYP
GDGSIKYNEKFKGKATLTVDKSSSTAYMQVSSLTSENSAVYFCARRGEYGN
EGAMDYWGQGTTVTVSS

- 5 * La K en la posición 2 de esta secuencia no coincide con la información de la secuenciación de la proteína N-terminal directa del anticuerpo. Esa secuenciación determinó que un residuo Q está presente en esa posición; también está presente un residuo Q en la traducción de los clones de ADNc VH4 y VH6 de este informe. Por lo tanto, las secuencias de ADN/proteína traducidas de los clones VH4 y VH6 deben considerarse como la secuencia correcta de la cadena pesada:

Secuencia de ADN (SEQ ID NO: 31):

AGGTGCAGCTGCAGCAGTCAGGACCTGAACTGGTGAAGCCTGGGGCTTTA
GTGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTCACAAGCTACGATATA
AATTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGACTTGAGTGGATTGGATGGAT
TTATCCTGGAGATGGTAGTATTAAGTACAATGAGAAATTCAAGGGCAAGG
CCACACTGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGGTCAGC
AGCCTGACTTCTGAGAATTCTGCAGTCTATTTCTGTGCAAGACGGGGGGA
GTATGGTAACTACGAGGGGGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACCACG
10 GTCACCGTCTCCTCA

Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:32):

VQLQQSGPELVKPGALVKISCKASGYTFTSYDINWVKQRPQGLEWIGWIYP
GDGSIKYNEKFKGKATLTVDKSSSTAYMQVSSLTSENSAVYFCARRGEYGN
EGAMDYWGQGTTVTVSS

- 15 Además, de acuerdo con la comparación con otras secuencias de anticuerpos, es probable que haya un resto de aminoácido N-terminal más para el resto V en la cadena pesada. Esto se apoya en el hecho de que el extremo N de la cadena pesada tuvo que ser "desbloqueado" antes de la secuenciación directa del extremo N de la proteína. Las comparaciones de secuencias con otros anticuerpos sugieren que el resto ausente es una Q. Por lo tanto, la secuencia de la VH sería:

QVQLQQSGPELVKPGALVKISCKASGYTFTSYDINWVKQRPGQGLEWIGWIY

PGDGSIKYNEKFKGKATLTVDKSSSTAYMQVSSLTSENSAVYFCARRGEYGN
 YEGAMDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 33)

la secuencia de aminoácidos N-terminal de G1

Ligera: La secuenciación se lleva a cabo en un nivel de diferencia inicial de aproximadamente 750 pmol. La secuencia es: D I V L T Q S P A S L A V S L G Q R A T I S S (?) K A (SEQ ID NO: 34)

5 Pesada: La secuenciación se lleva a cabo en un nivel de diferencia inicial de aproximadamente 165 pmol. La secuencia es. V Q L Q Q S G P E L V K P G A L V K I S O K A S G (SEQ ID NO: 35)

Ejemplo 3: Secuencias para la Inmunoglobulina P-selectina Humanizada basada en G1

Secuencias de nucleótidos para Hu-G1

10 V1 y V2 (que se muestran a continuación) se refieren a las versiones "agresiva" (es decir, más humana) y "conservativa" (es decir, más murina) de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo humanizado, respectivamente. Para cada una de ellas, los codones "A" se generaron comenzando con los de las secuencias marco humanas y los codones de las secuencias de CDR de ratón, cambiando, a continuación, los codones según sea necesario para que coincidan con la secuencia de aminoácidos humanizada real. Los codones "B" comenzaron con los codones de ratón y a continuación cambiaron donde fue necesario para coincidir con las secuencias de aminoácidos humanizadas.

Cadena	V1-agresiva (No. de frm de ratón.)	V2-conservativa(No. de frm de ratón.)
VK	0	2
VH	4	8

15 **Cadena Ligera:**

Hu-G1-VK_v1_nuc-A

1 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T
 1 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
 21 I T C **K A S Q S V D Y D G H S Y M N W Y**
 61 ATCACTTGCAAGGCCAGCC**AGAGC**GTTGATTATGATGGTCATAGTTATATGAACTGGTAT
 41 Q Q K P G K A P K L L I Y **A A S N L E S**
 121 CAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAAT**TTGGAATCT**
 61 G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S
 181 GGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGC
 81 S L Q P E D F A T Y Y C **Q Q S D E N P L**
 241 AGTCTGCAACCTGAAGATTTTTGCAACTTACTACTGTCAGCAAAGTGATGAAAAATCCCCTC

101 **T F G G G T K V E I K** (SEQ ID NO: 36)

301 ACTTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA (SEQ ID NO: 52)

Hu-G1-VK_v1_nuc-B

ES 2 699 273 T3

1 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T
1 GACATTCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCTTTGTCTGCATCTGTAGGGGACAGGGTCACC
21 I T C **K A S Q S V D Y D G H S Y M N W Y**
61 ATCACTTGCAAGGCCAGCC**AGAGC**GTTGATTATGATGGTCATAGTTATATGAACTGGTAC
41 Q Q K P G K A P K L L I Y **A A S N L E S**
121 CAACAGAAACCAGGAAAAGCCCCAAACTCCTCATCTATGCTGCATCCAATTTGGAATCT
61 G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S
181 GGGTCCCATCAAGGTTTAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCACCATCAGC
81 S L Q P E D F A T Y Y C **Q Q S D E N P L**
241 AGTCTGCAACCTGAGGATTTTGCAACCTATTACTGTCAGCAAAGTGATGAAAATCCCCTC
101 **T F G G G T K V E I K** (SEQ ID NO: 37)

301 ACTTTCGGTGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA (SEQ ID NO: 53)
Hu-G1-VK_v2_nuc-A

1 D I Q L T Q S P S S L S A S V G D R V T
1 GACATCCAGCTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
21 I T C **K A S Q S V D Y D G H S Y M N W Y**
61 ATCACTTGCAAGGCCAGCC**CAGAGC**GTTGATTATGATGGTCATAGTTATATGAACTGGTAT
41 Q Q K P G K A P K L L I Y **A A S N L E S**
121 CAGCAGAAACCAGGGAAAAGCCCCAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAATTTGGAATCT
61 G I P S R F S G S G S G T D F T L T I S
181 GGGATCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGC
81 S L Q P E D F A T Y Y C **Q Q S D E N P L**
241 AGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAGCAAAGTGATGAAAATCCCCTC
101 **T F G G G T K V E I K** (SEQ ID NO: 38)

5 301 ACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA (SEQ ID NO: 54)
Hu-G1-VK_v2_nuc-B

1 D I Q L T Q S P S S L S A S V G D R V T
1 GACATTCAGCTGACCCAGTCTCCATCCTCTTTGTCTGCATCTGTAGGGGACAGGGTCACC
21 I T C **K A S Q S V D Y D G H S Y M N W Y**
61 ATCACTTGCAAGGCCAGCCAGAGCGTTGATTATGATGGTCATAGTTATATGAACTGGTAC
41 Q Q K P G K A P K L L I Y **A A S N L E S**
121 CAACAGAAACCAGGAAAAGCCCCAAACTCCTCATCTATGCTGCATCCAATTTGGAATCT
61 G I P S R F S G S G S G T D F T L T I S
181 GGGATCCCATCAAGGTTTAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCACCATCAGC
81 S L Q P E D F A T Y Y C **Q Q S D E N P L**
241 AGTCTGCAACCTGAGGATTTTGCAACCTATTACTGTCAGCAAAGTGATGAAAATCCCCTC
101 **T F G G G T K V E I K** (SEQ ID NO: 39)

301 ACTTTCGGTGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA (SEQ ID NO: 55)

Cadena pesada:

10 Hu-G1-VH_v1_nuc-A

ES 2 699 273 T3

1 Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V
1 CAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTC
21 S C K V S G Y T F T S Y D I N W V R Q A

61 TCCTGCAAGGTTTTCCGGATACACCTTCACTAGCTACGATATAAAATTGGGTGCGACAGGCT
41 P G K G L E W M G W I Y P G D G S I K Y
121 CCTGGAAAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATTTATCCTGGAGATGGTAGCATTAAAGTAC
61 N E K F K G R V T M T V D K S T D T A Y
181 AATGAGAAATTCAAGGGCAGAGTCACCATGACCGTAGACAAATCTACAGACACAGCCTAC
81 M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R R G
241 ATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTGCAAGACGGGGG
101 E Y G N Y E G A M D Y W G Q G T L V T V
301 GAGTATGGTAACTACGAGGGGGCTATGGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTC
121 S S (SEQ ID NO: 40)

361 TCCTCA (SEQ ID NO: 56)
Hu-G1-VH_v1_nuc-B

1 Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V
1 CAGGTGCAGCTGGTACAGTCTGAGGAGCTGAAGTGAAGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGGTC
21 S C K V S G Y T F T S Y D I N W V R Q A
61 TCCTGCAAGGTTTTCTGGTTACACCTTCAACAAGCTACGATATAAAATTGGGTGCGACAGGCT
41 P G K G L E W M G W I Y P G D G S I K Y
121 CCTGGAAAAGGACTTGAGTGGATGGGATGGATTTATCCTGGAGATGGTAGCATTAAAGTAC
61 N E K F K G R V T M T V D K S T D T A Y
181 AATGAGAAATTCAAGGGCAGAGTCACAATGACTGTAGACAAATCCACAGACACAGCCTAC
81 M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R R G
241 ATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACAGCAGTCTATTACTGTGCAAGACGGGGG
101 E Y G N Y E G A M D Y W G Q G T L V T V
301 GAGTATGGTAACTACGAGGGGGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACCTGGTCACCGTC
121 S S (SEQ ID NO: 41)

5 361 TCCTCA (SEQ ID NO: 57)
Hu-G1-VH_v2_nuc-A

1 Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V
1 CAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTC
21 S C K V S G Y T F T S Y D I N W V R Q A
61 TCCTGCAAGGTTTTCCGGATACACCTTCACTAGCTACGATATAAAATTGGGTGCGACAGGCT
41 P G K G L E W I G W I Y P G D G S I K Y
121 CCTGGAAAAGGGCTTGAGTGGATTGGATGGATTTATCCTGGAGATGGTAGCATTAAAGTAC
61 N E K F K G K A T L T V D K S T D T A Y
181 AATGAGAAATTCAAGGGCAAGGCCACCTGACCGTAGACAAATCTACAGACACAGCCTAC
81 M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R R G
241 ATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTGCAAGACGGGGG
101 E Y G N Y E G A M D Y W G Q G T L V T V
301 GAGTATGGTAACTACGAGGGGGCTATGGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTC
121 S S (SEQ ID NO: 42)

361 TCCTCA (SEQ ID NO: 58)
Hu-G1-VH_v2_nuc-B

ES 2 699 273 T3

```
1 Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V
1 CAGGTGCAGCTGGTACAGTCAGGAGCTGAAGTGAAGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGGTC
21 S C K V S G Y T F T S Y D I N W V R Q A
61 TCCTGCAAGGTTTCTGGTTACACCTTCACAAGCTACGATATAAAATTGGGTGCGACAGGCT
41 P G K G L E W I G W I Y P G D G S I K Y
121 CCTGGAAAAGGACTTGAGTGGATTGGATGGATTTATCCTGGAGATGGTAGCATTAAAGTAC
61 N E K F K G K A T L T V D K S T D T A Y
181 AATGAGAAATTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTGTAGACAAAATCCACAGACACAGCCTAC
81 M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R R G
241 ATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACAGCAGTCTATTACTGTGCAAGACGGGGG

101 E Y G N Y E G A M D Y W G Q G T L V T V
301 GAGTATGGTAACTACGAGGGGGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACCCTGGTCCCGTC
121 S S (SEQ ID NO: 43)
```

361 TCCTCA (SEQ ID NO: 59)

Los aminoácidos de CDR se indican en cursiva y en negrita; las sustituciones de marco de ratón están marcadas en negrita y subrayadas. Los codones identificados en negrita solo indican codones que se cambiaron a los menos raros.

5 Ejemplo 4: Determinación de la afinidad y especificidad de unión de un anticuerpo anti-P-selectina G1 humanizado

Método

10 Todos los experimentos se realizaron en un Biacore 3000, a 25°C, utilizando MOPS 20 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, CaCl₂ 1,5 mM y Tween-20 al 0,005% como tampón de análisis. Las densidades bajas de P-selectina soluble o E-selectina soluble (proteína de control) se acoplaron covalentemente en dos superficies diferentes de un chip CM-5 de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La densidad de recubrimiento se seleccionó con el objetivo de lograr una respuesta de unión máxima de 100-200 UR.

15 Se expresó un diseño de anticuerpo G1 humanizado etiquetado como "agresivo" (G1_{aggr}) en células CHO dhfr estables cultivadas hasta el agotamiento y se recogieron los medios. Este diseño se refiere a la secuencia VL del anticuerpo humanizado "Hu-G1-VK_v1" (SEQ ID NO: 46) y la secuencia VH "Hu-G1-VH_v1" (SEQ ID NO: 50). El anticuerpo se sometió a una purificación de una etapa en una columna de proteína A, se eluyó con glicina 0,1 M, pH 2,8, se neutralizó inmediatamente mediante la adición de NaPO₄ 0,5 M y se determinaron el rendimiento y la concentración mediante determinación de la proteína A280. Se analizó una alícuota de cada anticuerpo (el anticuerpo humanizado G1_{aggr}, un anticuerpo monoclonal parental de ratón G1 y dos concentraciones (1,0 µg y 0,5 µg de IgG humana) en una SDS-PAGE no reductora de gradiente del 4-20% y se tiñeron con azul de coomassie. El anticuerpo G1_{aggr} humanizado se comparó con el anticuerpo monoclonal parental de ratón G1 del que derivó. El gel (Figura 4) muestra que no hubo productos de contaminación o de degradación para los anticuerpos y todos migraron como dímeros de aproximadamente el mismo peso molecular aparente.

25 Las soluciones que contenían G1_{aggr} y el anticuerpo monoclonal parental de ratón G1 se diluyeron y se inyectaron en el chip CM-5 a una velocidad de flujo de 30 µl/min durante 4 minutos, seguidos de 3 minutos para permitir la disociación, momento en el que se eluyó el anticuerpo unido con una inyección de 10 µl de Acetato 10 mM, pH 4,5, NaCl 100 mM a una velocidad de flujo de 10 µl/min. Se inyectaron una serie de concentraciones de ambos anticuerpos sobre las superficies de P-selectina soluble y de E-selectina soluble hasta que se observó una unión de saturación.

30 Los datos se analizaron utilizando el software Biaevaluation v 4.1. Se superpusieron sensogramas de los diferentes ciclos y se ajustaron los datos de todas las curvas de un anticuerpo simultáneamente a un modelo de analito bivalente (ver Fig. 5). La afinidad de equilibrio se calculó a partir de las tasas de asociación y de disociación obtenidas a partir de este análisis.

35 Basándose en estos análisis, la K_d aparente para el G1_{aggr} humanizado se calculó en 31,1 nM. Esto se comparó favorablemente con una K_d calculada para el anticuerpo murino G1 parental de 24,4 nM. No se observó unión para ninguno de los anticuerpos a E-selectina. Estos resultados indican que el anticuerpo G1_{aggr} humanizado muestra especificidad por P-selectina y se puede usar como un antagonista de P-selectina.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Selexys Pharmaceuticals

<120> Anticuerpos Anti-P-selectina y Métodos de Uso de los Mismos para Tratar Enfermedades Inflamatorias

<130> 50487/002WO2

5 <150> US 60/872.170
<151> 01/12/2006

<160> 59

<170> PatentIn versión 3.3

10 <210> 1
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

15 <400> 1

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly His Ser Tyr Met Asn
1 5 10 15

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

20 <220>
<223> Sintético

<400> 2

Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

25 <210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Sintético

<400> 3

Gln Gln Ser Asp Glu Asn Pro Leu Thr
1 5

35 <210> 4
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

ES 2 699 273 T3

<400> 4

Ser Tyr Asp Ile Asn
1 5

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

<220>
<223> Sintético

<400> 5

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

10 Gly

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

15 <220>
<223> Sintético

<400> 6

Arg Gly Glu Tyr Gly Asn Tyr Glu Gly Ala Met Asp Tyr
1 5 10

20 <210> 7
<211> 336
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

25 <400> 7

gacattgtgc taacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60
atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tatgatggtc atagttatat gaactggtac 120
caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatg ctgcatccaa tctagaatct 180
gggatcccag ccaggttttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat 240
cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc aaagtgatga aaatcccctc 300
acgttcggta ctgggaccaa gctggagctg aaacgg 336

30 <210> 8
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 699 273 T3

<223> Sintético

<400> 8

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

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

Gly His Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
50 55 60

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

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

Glu Asn Pro Leu Thr Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
100 105 110

5 <210> 9
<211> 336
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

10 <400> 9

gacattgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60
atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tatgatggtc atagttatat gaactggtac 120
caacagaaac caggacagcc acccaaaactc ctcatctatg ctgcatccaa tctagaatct 180
gggatcccag ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat 240
cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc aaagtgatga aaatcccctc 300
acgttcggta ctgggaccaa gctggagctg aaacgg 336

15 <210> 10
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 10

ES 2 699 273 T3

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

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

Gly His Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
 50 55 60

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

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

Glu Asn Pro Leu Thr Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
 100 105 110

<210> 11
 <211> 336
 <212>ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 11

gacatccaga tgacacagtc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60
 atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tatgatggtc atagttatat gaactggtac 120
 caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatg ctgcatccaa tctagaatct 180
 gggatcccag ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat 240
 cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc aaagtgatga aaatcccctc 300
 acgttcggta ctgggaccaa gctggagctg aaacgg 336

10 <210> 12
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Sintético

<400> 12

ES 2 699 273 T3

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

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

Gly His Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
 50 55 60

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

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

Glu Asn Pro Leu Thr Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
 100 105 110

<210> 13

<211> 331

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 13

gacattgtgc tgaccagtc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60
 atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tatgatggtc atagttatat gaactgttac 120
 caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatg ctgcatccaa tctagaatct 180
 gggatcccag ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat 240
 cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc aaagtgatga aaatcccctc 300
 acgttcggta ctgggaccaa gctggagctg a 331

10 <210> 14

<211> 110

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Sintético

<400> 14

ES 2 699 273 T3

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

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

Gly His Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
 50 55 60

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

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

Glu Asn Pro Leu Thr Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Glu Leu
 100 105 110

<210> 15
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Sintético

<400> 15

gacattgtgc taaccagtc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60
 atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tatgatggtc atagttatat gaactggtac 120
 caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatg ctgcatccaa tctagaatct 180
 gggatcccag ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat 240
 cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc aaagtgatga aaatcccctc 300
 acgttcggta ctgggaccaa gctggagctg aaacgg 336

<210> 16
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> Sintético

15

<400> 16

ES 2 699 273 T3

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

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

Gly His Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
 50 55 60

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

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

Glu Asn Pro Leu Thr Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
 100 105 110

<210> 17

<211> 365

<212>ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 17

aggatgaagct gcagcagtcaggacctgagctggatgaagcc tggggcttta gtgaagatat 60
 cctgcaaggc ttctggttac accttcacaa gctacgatat aaattgggtg aagcagaggc 120
 ctggacaggg acttgagtgg attggatgga tttatcctgg agatggtagt attaagtaca 180
 atgagaaatt caagggcaag gccacactga ctgtagacaa atcctccagc acagcctaca 240
 tgcaggtcag cagcctgact tctgagaatt ctgcagtcta tttctgtgca agacgggggg 300
 agtatggtaa ctacgagggg gctatggact actggggcca agggaccacg gtcaccgtct 360
 cctca 365

10 <210> 18

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Sintético

<400> 18

ES 2 699 273 T3

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

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

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

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

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

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

Arg Arg Gly Glu Tyr Gly Asn Tyr Glu Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5 <210> 19
 <211> 365
 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 19

agggtcaagct gcagcagtct ggacctgagc tgggtgaagcc tggggcttta gtgaagatat 60
 cctgcaagggc ttctggttac accttcacaa gctacgatat aaattgggtg aagcagagggc 120
 ctggacaggg acttgagtgg attggatgga tttatcctgg agatggtagt attaagtaca 180
 atgagaaatt caagggcaag gccacactga ctgtagacaa atcctccagc acagcctaca 240
 tgcaggtcag cagcctgact tctgagaatt ctgcagtcta tttctgtgca agacgggggg 300
 agtatggtaa ctacgagggg gctatggact actggggcca agggaccacg gtcaccgtct 360
 cctca 365

10 <210> 20
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 699 273 T3

<220>
<223> Sintético

<400> 20

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

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

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

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

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

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

Arg Arg Gly Glu Tyr Gly Asn Tyr Glu Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

5 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 21
<211> 365
<212>ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintético

<400> 21

aggtgcagct gcaggagtct ggacctgagc tggatgaagcc tggggcttta gtgaagatat 60
cctgcaaggc ttctggttac accttcacaa gctacgatat aaattgggtg aagcagaggc 120
ctggacaggg acttgagtgg attggatgga tttatcctgg agatggtagt attaagtaca 180
atgagaaatt caagggcaag gccacactga ctgtagacaa atcctccagc acagcctaca 240
tgcaggtcag cagcctgact tctgagaatt ctgcagtcta tttctgtgca agacgggggg 300
agtatggtaa ctacgagggg gctatggact actggggcca agggaccacg gtcaccgtct 360
cctca 365

15 <210> 22
<211> 121
<212> PRT

ES 2 699 273 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 22

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

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

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

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

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

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

Arg Arg Gly Glu Tyr Gly Asn Tyr Glu Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

5

<210> 23

<211> 365

<212>ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Sintético

<400> 23

aggtgaagct gcagcagtct ggacctgagc tggatgaagcc tggggcttta gtgaagatat 60
cctgcaaggc ttctggttac accttcacaa gctacgatataa aattgggtg aagcagaggc 120
ctggacaggg acttgagtgg attggatgga tttatcctgg agatggtagt attaagtaca 180
atgagaaatt caagggcaag gccacactga ctgtagacaa atcctccagc acagcctaca 240
tgcaggtcag cagcctgact tctgagaatt ctgcagtcta tttctgtgca agacgggggg 300
agtatggtaa ctacgagggg gctatggact actggggcca agggaccacg gtcaccgtct 360
cctca 365

ES 2 699 273 T3

<210> 24
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Sintético

<400> 24

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

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

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

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

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

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

Arg Arg Gly Glu Tyr Gly Asn Tyr Glu Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

10 <210> 25
 <211> 365
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

15 <400> 25

ES 2 699 273 T3

aggtgcagct gcagcagtca ggacctgaac tggatgaagcc tggggcttta gtgaagatat 60
 cctgcaagggc ttctgggttac accttcacaa gctacgatat aaattgggtg aagcagagggc 120
 ctggacagggg acttgagtgg attggatgga tttatcctgg agatggtagt attaagtaca 180
 atgagaaatt caagggcaag gccacactga ctgtagacaa atcctccagc acagcctaca 240
 tgcaggtcag cagcctgact tctgagaatt ctgcagtcta tttctgtgca agacggggggg 300
 agtatggtaa ctacgagggg gctatggact actggggcca agggaccacg gtcaccgtct 360
 cctca 365

<210> 26
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Sintético

<400> 26

Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala	Leu
1				5					10					15	
Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr	Asp
			20					25					30		
Ile	Asn	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly
		35					40					45			
Trp	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asp	Gly	Ser	Ile	Lys	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe	Lys
50							55							60	
Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met
65					70						75				80
Gln	Val	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asn	Ser	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Ala
				85					90					95	
Arg	Arg	Gly	Glu	Tyr	Gly	Asn	Tyr	Glu	Gly	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly
			100					105					110		
Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser							
		115					120								

<210> 27
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10

ES 2 699 273 T3

<220>
<223> Sintético

<400> 27

```

gacattgtgc tgaccagtc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc      60
atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tatgatggtc atagttatat gaactggtac      120
caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatg ctgcatccaa tctagaatct      180
gggatcccag ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat      240
cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc aaagtgatga aaatcccctc      300
acgttcggta ctgggaccaa gctggagctg aaacgg                                  336
    
```

5 <210> 28
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintético

<400> 28

```

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

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

Gly His Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
          35           40           45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
50           55           60

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

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

Glu Asn Pro Leu Thr Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
          100          105          110
    
```

15 <210> 29
<211> 365
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

ES 2 699 273 T3

<400> 29

```

aggtgaagct gcagcagtct ggacctgagc tggatgaagcc tggggcttta gtgaagatat      60
cctgcaaggc ttctggttac accttcacaa gctacgatata aaattgggtg aagcagaggc      120
ctggacaggg acttgagtgg attggatgga tttatcctgg agatggtagt attaagtaca      180
atgagaaatt caagggcaag gccacactga ctgtagacaa atcctccagc acagcctaca      240
tgcaggtcag cagcctgact tctgagaatt ctgcagtcta tttctgtgca agacgggggg      300
agtatggtaa ctacgagggg gctatggact actggggcca agggaccacg gtcaccgtct      360
cctca                                                                                   365
    
```

<210> 30

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 30

```

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

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

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

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

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

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

Arg Arg Gly Glu Tyr Gly Asn Tyr Glu Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100                               105                               110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115                               120
    
```

<210> 31

<211> 365

<212>ADN

ES 2 699 273 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 31

```

agggtgcagct gcagcagtcgacctgaac tgggtgaagcc tggggcttta gtgaagatat      60
cctgcaagggc ttctggttac accttcacaa gctacgatataaattgggtg aagcagaggc      120
ctggacagggg acttgagtgg attggatgga tttatcctgg agatggtagt attaagtaca      180
atgagaaatt caagggcaag gccacactga ctgtagacaa atcctccagc acagcctaca      240
tgcaggtcag cagcctgact tctgagaatt ctgcagtcta tttctgtgca agacgggggg      300
agtatggtaa ctacgagggg gctatggact actggggcca agggaccacg gtcaccgtct      360
5  cctca                                                                    365

```

<210> 32

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Sintético

<400> 32

```

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

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

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

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

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

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

Arg Arg Gly Glu Tyr Gly Asn Tyr Glu Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly
          100          105          110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
          115          120

```

15

<210> 33

ES 2 699 273 T3

<211> 122
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Sintético

<400> 33

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Arg Gly Glu Tyr Gly Asn Tyr Glu Gly Ala Met Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

10 <210> 34
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 34

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

15 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Ser Lys Ala
 20 25

<210> 35
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 699 273 T3

<220>
<223> Sintético

5 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (21)..(21)
<223> Xaa = Cys o cualquier aminoácido de origen natural

<400> 35

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

Val Lys Ile Ser Xaa Lys Ala Ser Gly
20 25

10 <210> 36
<211> 111
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

15 <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 Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp
20 25 30

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

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

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

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

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

20 <210> 37
<211> 111
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 37

ES 2 699 273 T3

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

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

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

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

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

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

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

<210> 38

<211> 111

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 38

Asp Ile Gln Leu 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 Ser Val Asp Tyr Asp
 20 25 30

Gly His Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro

ES 2 699 273 T3

35

40

45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ser
50 55 60

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

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

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

<210> 39

<211> 111

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 39

Asp Ile Gln Leu 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 Ser Val Asp Tyr Asp
20 25 30

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

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ser
50 55 60

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

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

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

10 <210> 40

<211> 122

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Sintético

ES 2 699 273 T3

<400> 40

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

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

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

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

Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Thr Asp 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 Gly Glu Tyr Gly Asn Tyr Glu Gly Ala Met Asp Tyr Trp
100 105 110

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

<210> 41

<211> 122

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 41

ES 2 699 273 T3

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

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

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

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

Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Thr Asp 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 Gly Glu Tyr Gly Asn Tyr Glu Gly Ala Met Asp Tyr Trp
 100 105 110

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

<210> 42

<211> 122

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 42

ES 2 699 273 T3

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

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

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

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

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Asp 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 Gly Glu Tyr Gly Asn Tyr Glu Gly Ala Met Asp Tyr Trp
 100 105 110

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

<210> 43

<211> 122

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 43

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

ES 2 699 273 T3

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

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

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

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Asp 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 Gly Glu Tyr Gly Asn Tyr Glu Gly Ala Met Asp Tyr Trp
 100 105 110

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

<210> 44
 <211> 111
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 44

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

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

Gly His Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
 50 55 60

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

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

Glu Asn Pro Leu Thr Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

100 105 110

10 <210> 45

ES 2 699 273 T3

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

5 <220>
 <223> Sintético

<400> 45

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 Leu
 85 90 95

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

<210> 46
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintético

<400> 46

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 Ser Val Asp Tyr Asp
 20 25 30

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

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

15

ES 2 699 273 T3

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

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

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

<210> 47
<211> 111
<212> PRT
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 47

Asp Ile Gln Leu 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 Ser Val Asp Tyr Asp
20 25 30

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

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ser
50 55 60

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

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

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

10 <210> 48
<211> 122
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Sintético

<400> 48

ES 2 699 273 T3

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Arg Gly Glu Tyr Gly Asn Tyr Glu Gly Ala Met Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 49

<211> 121

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 49

ES 2 699 273 T3

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Glu Leu
 20 25 30

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

Gly Gly Phe Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp 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 Thr Pro Val Gly Arg Cys Ser Ser Thr Ser Cys Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 50

<211> 122

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 50

ES 2 699 273 T3

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

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

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

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

Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Thr Asp 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 Gly Glu Tyr Gly Asn Tyr Glu Gly Ala Met Asp Tyr Trp
 100 105 110

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

- <210> 51
- <211> 122
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

5

- <220>
- <223> Sintético

<400> 51

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

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

ES 2 699 273 T3

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

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

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Asp 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 Gly Glu Tyr Gly Asn Tyr Glu Gly Ala Met Asp Tyr Trp
 100 105 110

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

5 <210> 52
 <211> 333
 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 52

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgca aggccagcca gagcgttgat tatgatggtc atagttatat gaactggtat 120
 cagcagaaac cagggaaagc ccctaagctc ctgatctatg ctgcatccaa tttggaatct 180
 ggggtcccat caaggttcag tggcagtgga tctgggacag atttcactct caccatcagc 240
 agtctgcaac ctgaagattt tgcaacttac tactgtcagc aaagtgatga aaatcccctc 300
 actttcggcg gagggaccaa ggtggagatc aaa 333

10 <210> 53
 <211> 333
 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Sintético

<400> 53

ES 2 699 273 T3

gacattcaga tgaccagtc tccatcctct ttgtctgcat ctgtagggga cagggtcacc 60
 atcacttgca aggccagcca gagcgttgat tatgatggtc atagttatat gaactggtac 120
 caacagaaac caggaaaagc ccccaaactc ctcatctatg ctgcatccaa tttggaatct 180
 ggggtcccat caaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caccatcagc 240
 agtctgcaac ctgaggattt tgcaacctat tactgtcagc aaagtgatga aaatcccctc 300

 actttcgggtg gagggaccaa ggtggagatc aaa 333

<210> 54
 <211> 333
 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Sintético

<400> 54

gacatccagc tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgca aggccagcca gagcgttgat tatgatggtc atagttatat gaactggtat 120
 cagcagaaac cagggaagc ccctaagctc ctgatctatg ctgcatccaa tttggaatct 180
 gggatcccat caaggttcag tggcagtgga tctgggacag atttcactct caccatcagc 240
 agtctgcaac ctgaagattt tgcaacttac tactgtcagc aaagtgatga aaatcccctc 300

 actttcggcg gagggaccaa ggtggagatc aaa 333

<210> 55
 <211> 333
 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> Sintético

15

<400> 55

gacattcagc tgaccagtc tccatcctct ttgtctgcat ctgtagggga cagggtcacc 60
 atcacttgca aggccagcca gagcgttgat tatgatggtc atagttatat gaactggtac 120
 caacagaaac caggaaaagc ccccaaactc ctcatctatg ctgcatccaa tttggaatct 180
 gggatcccat caaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caccatcagc 240
 agtctgcaac ctgaggattt tgcaacctat tactgtcagc aaagtgatga aaatcccctc 300

 actttcgggtg gagggaccaa ggtggagatc aaa 333

<210> 56
 <211> 366
 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial

20

ES 2 699 273 T3

<220>
<223> Sintético

<400> 56

caggtccagc	tggtacagtc	tggggctgag	gtgaagaagc	ctggggcctc	agtgaaggtc	60
tcctgcaagg	tttccggata	caccttcact	agctacgata	taaattgggt	gcgacaggct	120
cctggaaaag	ggcttgagtg	gatgggatgg	atttatcctg	gagatggtag	cattaagtac	180
aatgagaaat	tcaagggcag	agtcaccatg	accgtagaca	aatctacaga	cacagcctac	240
atggagctga	gcagcctgag	atctgaggac	acagccgtgt	attactgtgc	aagacggggg	300
gagtatggta	actacgaggg	ggctatggac	tactggggcc	agggaacctt	ggtcaccgtc	360
tcctca						366

5 <210> 57
<211> 366
<212>ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintético

<400> 57

caggtgcagc	tggtacagtc	aggagctgaa	gtgaagaagc	ctggggcctc	agtgaaggtc	60
tcctgcaagg	tttctgggta	caccttcaca	agctacgata	taaattgggt	gcgacaggct	120
cctggaaaag	gacttgagtg	gatgggatgg	atttatcctg	gagatggtag	cattaagtac	180
aatgagaaat	tcaagggcag	agtcacaatg	actgtagaca	aatccacaga	cacagcctac	240
atggagctga	gcagcctgag	atctgaggac	acagcagtct	attactgtgc	aagacggggg	300
gagtatggta	actacgaggg	ggctatggac	tactggggcc	aagggaccct	ggtcaccgtc	360
tcctca						366

15 <210> 58
<211> 366
<212>ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 58

ES 2 699 273 T3

caggtccagc tggtagagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg tttccggata caccttcaact agctacgata taaattgggt gcgacaggct 120
 cctggaaaag ggcttgagtg gattggatgg atttatcctg gagatggtag cattaagtac 180
 aatgagaaat tcaagggcaa ggccaccctg accgtagaca aatctacaga cacagcctac 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acagccgtgt attactgtgc aagacggggg 300
 gagtatggta actacgaggg ggctatggac tactggggcc agggaaccct ggtcaccgtc 360
 tcctca 366

<210> 59

<211> 366

<212>ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 59

caggtgcagc tggtagagtc aggagctgaa gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg tttctgggta caccttcaca agctacgata taaattgggt gcgacaggct 120
 cctggaaaag gacttgagtg gattggatgg atttatcctg gagatggtag cattaagtac 180
 aatgagaaat tcaagggcaa ggccacactg actgtagaca aatccacaga cacagcctac 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acagcagtct attactgtgc aagacggggg 300
 gagtatggta actacgaggg ggctatggac tactggggcc aagggaccct ggtcaccgtc 360
 tcctca 366

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo humanizado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que reconoce P-selectina que comprende:
una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina que comprende la SEQ ID NO: 36 y
una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina que comprende la SEQ ID NO: 40.
- 5 2. El anticuerpo humanizado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha inmunoglobulina es inmunoglobulina G.
3. El anticuerpo humanizado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicha inmunoglobulina es inmunoglobulina G2.
- 10 4. El anticuerpo humanizado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho anticuerpo o fragmento de unión del mismo se une a P-selectina con una constante de disociación de menos de $10^{-7}M$.
5. El anticuerpo humanizado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la reivindicación 4, en donde dicho anticuerpo o fragmento de unión del mismo se une a P-selectina con una constante de disociación de entre $10^{-7}M$ y $10^{-13}M$.
- 15 6. El anticuerpo humanizado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo o fragmento de unión del mismo es específico para P-selectina.
7. El anticuerpo humanizado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo o fragmento de unión del mismo no reconoce E-selectina.

Figura 1

VL

G1-VK DI VLTQSPASLAVSLGQRATI SCKASQSVVDYDGHSMWYQQKPGQPKLLI YAAASNLESGI PARFSGSGGTDFTLNI HPVEEEDAATYYCQSDENPLTFGGTKLELK SEQ.ID NO: 44
AAZ0906 DI QMTQSPSSLASVGGDRVTITCRASQSISS...YLHWYQQKPKGKAPKLLI YAASSLQSGVPSRFSGSGGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQSDYSTPLTFGGGTKVEIK SEQ.ID NO: 45
Hu-G1-VK_v1 DI QMTQSPSSLASVGGDRVTITCKASQSVVDYDGHSMWYQQKPKGKAPKLLI YAAASNLESGVPSRFSGSGGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQSDENPLTFGGGTKVEIK SEQ.ID NO: 46
Hu-G1-VK_v2 DI QLTQSPSSLASVGGDRVTITCKASQSVVDYDGHSMWYQQKPKGKAPKLLI YAAASNLESGI PSRFSGSGGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQSDENPLTFGGGTKVEIK SEQ.ID NO: 47

VL: Secuencia quimérica frente a humana: 66,7 %
 Secuencia humanizada frente a humana: 87,4 % (v1) y 85,6 % (v2)

Figura 2

VH

GI-VH	QVQLQDSGPELVKPGALVKISCKASGYTFTSYDI NNVKORP60GLEWIGMI YP6DGSIKYNEKFKGKATLVYDKSSSTAYMQVSSLTSENSAVYFCARRGEYGNIEGAMDYWGOGTTLTVSS	SEQ ID NO: 48
AAC18323	QVQLVOSGAEVKKPKGASVKVSKVSGYTLTELS#H:WVROAPGKGLEWVGSDPEDEGETIYACKFQGRVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSEDTAVVYCATPVGRCSSTSCADYWGOGTTLTVSS	SEQ ID NO: 49
Hu-GI-VH ₁	QVQLVOSGAEVKKPKGASVKVSKVSGYTFTSYDI NNVROAPGKGLEWVGMI YP6DGSIKYNEKFKGRVTMTYDKSTDTAYMELSSLRSEDTAVVYFCARRGEYGNIEGAMDYWGOGTTLTVSS	SEQ ID NO: 50
Hu-GI-VH ₂	QVQLVOSGAEVKKPKGASVKVSKVSGYTFTSYDI NNVROAPGKGLEWIGMI YP6DGSIKYNEKFKGKATLVYDKSTDTAYMELSSLRSEDTAVVYFCARRGEYGNIEGAMDYWGOGTTLTVSS	SEQ ID NO: 51

VH: Secuencia quimérica frente a humana: 62,2 %
 Secuencia humanizada frente a humana: 82,9 % (v1) y 79,3 % (v2)

Figura 3

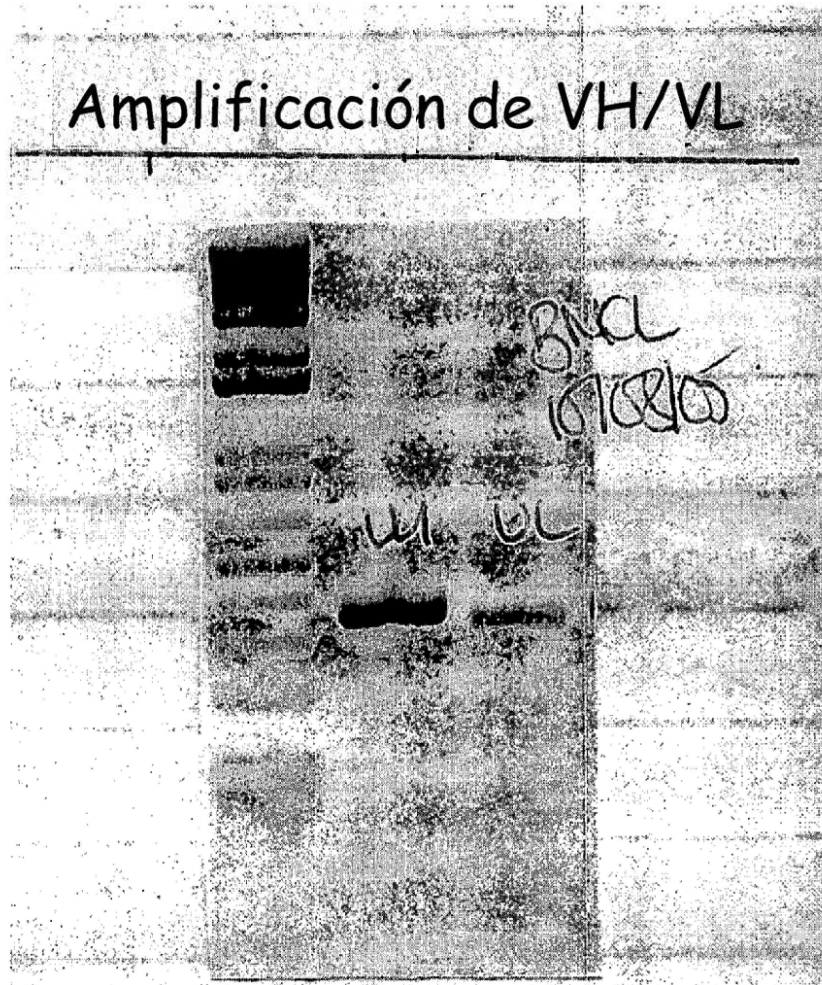


Figura 4

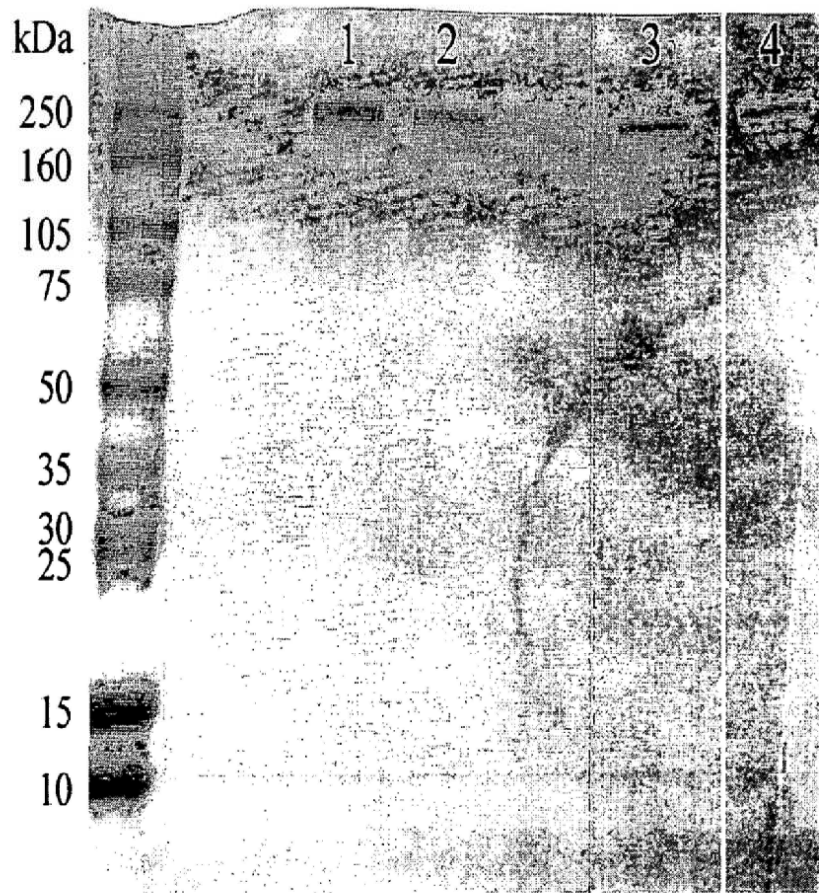


Figura 5

