

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 732 838**

51 Int. Cl.:

C07K 16/44 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.08.2012 PCT/EP2012/065505**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.02.2013 WO13020995**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.08.2012 E 12747915 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2019 EP 2742068**

54 Título: **Nuevos anticuerpos frente a fosforilcolina**

30 Prioridad:

09.08.2011 US 201161521593 P

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

26.11.2019

73 Titular/es:

ATHERA BIOTECHNOLOGIES AB (50.0%)

Business Center, S:t Eriksgatan 117

113 43 Stockholm, SE y

DYAX CORP. (50.0%)

72 Inventor/es:

PETTERSSON, KNUT;

CAMBER, OLA;

SEXTON, DAN y

NIXON, ANDREW E

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 732 838 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

Nuevos anticuerpos frente a fosforilcolina

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a nuevos anticuerpos con unión a fosforilcolina (PC) y/o conjugados de PC y que tienen propiedades *in vivo* sorprendentemente eficaces.

Antecedentes de la invención

La enumeración o explicación de un documento de publicación evidentemente anterior en la presente memoria descriptiva no debe ser interpretado necesariamente como reconocimiento de que el documento es parte del estado de la técnica o de conocimiento público general.

10 A pesar de las opciones de tratamiento existentes para la enfermedad cardiovascular, el síndrome coronario agudo (ACS) es la principal causa de muerte en el mundo industrializado. El ACS tiene lugar como resultado de la formación de trombos dentro del lumen de la arteria coronaria, que se asocia con la inflamación crónica dentro de la pared de la arteria. La inflamación arterial se inicia mediante la formación de un núcleo lipídico y la infiltración de células inflamatorias que provoca la formación de placa. Las placas inestables contienen un núcleo necrótico
15 sustancial y células apoptóticas que alteran el endotelio y pueden provocar la ruptura de la placa exponiendo el colágeno subyacente, el factor de von Willebrand (vWF), el factor tisular, los lípidos y el músculo liso, lo que permite la adhesión, activación y agregación plaquetaria (Libby y col. 1996. *Macrophages and atherosclerotic plaque stability*. Curr Opin Lipidol 7, 330-335). El ACS se trata con una combinación de terapias antiplaquetarias, medicamentos reductores del colesterol (por ejemplo, estatinas), anticoagulantes, así como también la
20 recanalización quirúrgica por medio de la intervención coronaria percutánea (PCI) y la implantación de endoprótesis vasculares.

Se ha demostrado que las terapias antiplaquetarias tales como los inhibidores de la COX-1 (por ejemplo aspirina), los antagonistas del receptor de ADP (por ejemplo Ticlopidina y clopidogrel) y los antagonistas del receptor de glucoproteína IIb/IIIa reducen la incidencia de eventos coronarios adversos de consideración (MACE) en una serie
25 de ensayos clínicos diferentes (Dupont y col.- 2009- *Antiplatelet therapies and the role of antiplatelet resistance in acute coronary syndrome*. Thromb Res 124, 6-13). Sin embargo, una proporción de pacientes con terapia antiplaquetaria a largo plazo continúa teniendo eventos cardiovasculares. Más aun, pueden transcurrir hasta dos años hasta que la terapia preventiva crónica exhiba sus máximos efectos beneficiosos y entonces muchos pacientes tienen un alto riesgo de recurrencia de la enfermedad. Existe un período de hasta 6-12 meses posteriores al infarto
30 de miocardio en el que el paciente es susceptible a más MACE, con frecuencia debido a la reoclusión debida a la restenosis (Tabas. 2010. *Macrophage death and detective inflammation resolution in atherosclerosis*. Nat Rev Immunol 10, 36-46).

En consecuencia, existe una necesidad significativa de tratamientos destinados específicamente a prevenir el
35 progreso posterior de la placa y promover la regresión de la placa podría reducir sustancialmente los eventos durante este período.

La fosforilcolina, un grupo de cabeza polar presente en ciertos fosfolípidos, ha estado generalmente implicada en la enfermedad cardiovascular. Las especies de oxígeno reactivas generadas durante la inflamación coronaria causan la oxidación de la lipoproteína de baja densidad (LDL) para generar LDL oxidada (oxLDL). De hecho, se ha
40 demostrado que las enfermedades cardiovasculares (CVD) tales como aterosclerosis, angina inestable o síndrome coronario agudo están asociadas a niveles plasmáticos elevados de oxLDL (Itabe y Ueda. 2007. *Measurement of plasma oxidized low-density lipoprotein and its clinical implications*. J Atheroscler Thromb 14. 1-11). La LDL es una micropartícula de lipoproteína en circulación que contiene lípidos con un grupo de cabeza polar PC y proteínas, tales como la proteína apoB100.

Durante la oxidación de LDL, se genera PC que contiene neo-epítomos que no están presentes en la LDL sin
45 modificar. La PC recién expuesta en oxLDL es reconocida por receptores secuestrantes de macrófagos, tales como CD36, y la oxLDL atrapada por los macrófagos procede a la formación de células de espuma proinflamatoria en la pared vascular. La LDL oxidada también es reconocida por los receptores de las superficies del endotelio y se ha documentado que estimula una gama de respuestas, incluyendo la disfunción endotelial, apoptosis y la respuesta a
50 proteínas no plegadas (Gora y col. 2010. *Fosfolipolyzed LDL induces an inflammatory response in endothelial cells through endoplasmic reticulum stress signaling*. FASEB J 24(9):3284-97). El neoepítomo de PC también queda expuesto a la LDL después de la modificación con fosfolipasa A2 o metabolitos patológicos que reaccionan con aminos tales como los aldehídos generados por la oxidación de proteínas glicadas. Estas partículas de LDL modificadas de modo alternativo también son factores inflamatorios en la CVD.

Se ha demostrado que los anticuerpos para fosforilcolina (PC) se unen a la LDL oxidada, o modificada de otro modo,
55 y bloquean la actividad proinflamatoria de la oxLDL usando modelos *in vivo* o estudios *in vitro* (Shaw y col. 2000. *Natural antibodies with the T15 idiotype may act in atherosclerosis, apoptotic clearance, and protective immunity*. J Clin Invest 105, 1731-1740; Shaw y col. 2001. *Human-derived anti-oxidized LDL autoantibody blocks uptake of*

oxidized LDL by macrophages and localizes to atherosclerotic lesions *in vivo*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*21, 1333-1339.

Además, un examen de los datos clínicos ha demostrado que los bajos niveles de anticuerpos IgM anti-PC naturales están asociados a un riesgo incrementado de MACE en pacientes con ACS (Frostegard, J. 2010. *Low level natural antibodies contra fosforilcholine: a novel risk marker and potential mechanism in atherosclerosis and cardiovascular disease*. *Clin Immunol* 134, 47-54).

Ewing y col. 2010. *Circulation* 122: A14320 desvela el tratamiento de un modelo de restenosis y aterosclerosis en un modelo de ratón usando anticuerpo T15/E06 de ratón específico de fosforilcolina/(PC).

Shaw y col. 2000 *J Clin Inv* 105: 1731-1740 desvela múltiples anticuerpos monoclonales anti-PC (por ejemplo, E06).

Chang y col. 199 *PNAS* 96: 6353-6358 desvela que los anticuerpos E06 y E03 anti-PC de ratón inhiben la fagocitosis por macrófagos de células apoptóticas que contienen oxLDL.

Horkko y col. 1999 *Journal of Clinical Investigation* 103: 117-128 desvela la inhibición de la unión a oxLDL y la degradación por mAb E06.

Palinski y col. 1996. *Journal of Clinical Investigation* 98: 800-814 desvela la fabricación de anticuerpos E06 d ratón a través del cribado del hibridoma.

En consecuencia, existe la necesidad de moléculas de anticuerpos anti-PC que puedan usarse eficazmente en terapia, en particular anticuerpos anti-PC completamente humanos adecuados para la terapia en seres humanos. Basándose en conocimiento del solicitante, a fecha de hoy la técnica no ha podido proporcionar anticuerpos anti-PC humanos terapéuticamente eficaces. La identificación de dichos anticuerpos se ha visto dificultada por el hecho de que los procedimientos de cribado *in vitro* de anticuerpos humanos con actividad de unión anti-PC no predicen bien la actividad terapéutica *in vivo*.

En vista de lo anterior, existe en la técnica la necesidad de moléculas de anticuerpos anti-PC humanos que proporcionen propiedades eficaces y ventajosas cuando se usen en sistemas *in vivo*, en particular cuando se administren para terapia en seres humanos.

25 Descripción de la invención

La invención es tal como se establece en las reivindicaciones, y en un primer aspecto proporciona:

Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo humano con capacidad para unirse a la fosforilcolina, en el que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende un dominio de cadena pesada variable (VH) y/o un dominio de cadena ligera variable (VL) y en el que:

(a) el dominio VH comprende una secuencia de aminoácidos que incluye una, dos o preferentemente tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) seleccionadas del grupo que consiste en:

una secuencia de CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 75 % o el 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 17;

una secuencia de CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 94 % o el 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 18 y

una secuencia de CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 95 % o el 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 19, 20, 21 o 22; y

(b) el dominio VL comprende una secuencia de aminoácidos que incluye tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) seleccionadas del grupo que consiste en:

una secuencia de CDR4 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 94 % o el 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 23 o 24;

una secuencia de CDR5 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 85 % o el 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 25;

una secuencia de CDR6 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 88 % o el 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 26,

en el que el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo se une a aminofenil-fosforilcolina inmovilizada con una Kd de no más de 500 nM, cuando se prueba bajo las condiciones de resonancia de plasmón superficial usadas en los ejemplos.

La presente solicitud describe la producción y el ensayo de nuevos anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que comprenden las nuevas regiones de unión a antígeno capaces de unirse a la fosforilcolina y/o a conjugados de fosforilcolina.

Una divulgación propociona un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo capaz de unirse a la fosforilcolina y/o a un conjugado de fosforilcolina, en el que el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo comprende un dominio variable de

cadena pesada (VH) y/o, un dominio variable de cadena ligera (VL), y en el que-

(a) el dominio de VH comprende una secuencia de aminoácidos que incluye una, dos o preferentemente tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) seleccionadas del grupo que consiste en:

- 5 una secuencia de CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 25 %, 50 %, 75 % o 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 17;
- una secuencia de CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 5 %, 11 %, 17 %, 23 %, 29 %, 35 %, 47 %, 52 %, 58 %, 64 %, 70 %, 76 %, 82 %, 94 % o el 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 18; y
- 10 una secuencia de CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 4 %, 9 %, 13 %, 18 %, 22 %, 27 %, 31 %, 36 %, 40 %, 45 %, 50 %, 54 %, 59 %, 63 %, 68 %, 72 %, 77 %, 81 %, 86 %, 90 %, 95 % o el 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 19, 20, 21 o 22; y/o

(b) el dominio VL comprende una secuencia de aminoácidos que incluye una, dos o preferentemente tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) seleccionadas del grupo que consiste en:

- 15 una secuencia de CDR4 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 5 %, 11 %, 17 %, 23 %, 29 %, 35 %, 47 %, 52 %, 58 %, 64 %, 70 %, 76 %, 82 %, 94 % o el 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 23 o 24;
- una secuencia de CDR5 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 14 %, 28 %, 42 %, 57 %, 71 %, 85 % o el 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 25;
- 20 una secuencia de CDR6 ue comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 11 %, 22 %, 33 %, 44 %, 55 %, 66 %, 77 %, 88 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 26.

En una divulgación, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos que incluye una secuencia de CDR1, una CDR2 y una secuencia de CDR3 según lo definido anteriormente, y/o un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos que incluye una secuencia de CDR4, una CDR5 y una secuencia de CDR6 según lo definido anteriormente.

25 En otra realización del primer aspecto de la presente invención, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende

- 30 un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos que incluye las tres secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 presentes en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 o 15 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, 85 %, 90 %, o el 95 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 o 15; y/o
- 35 un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos que incluye las tres secuencias de CDR4, CDR5 y CDR6 presentes en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 o 16 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, 85 %, 90 % o el 95 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 o 16.

En una divulgación adicional, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) y/o un dominio variable de cadena ligera (VL), en la que-

40 el dominio VH comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 o 15 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 % o el 95 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 o 15; y

45 el dominio VL comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 o 16 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 % o el 95 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEC ID Nos: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 o 16.

La SEQ ID NO: 1 es el dominio variable pesado (VH) del anticuerpo X19-A05 que se describe en los siguientes ejemplos y tiene la secuencia:

EVQLLES G GGLVQP G GSLRLS CAASGFT FSGYWMHWVRQAPGKGLEWVSYI
 SPSGGGTHYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVRFRS
 VCSNAVCRPTAYDAFDI WGQGTMTVSS,

50 e incluye las regiones determinantes de la complementariedad (CDR):

VH CDR1: GYWM (SEQ ID NO: 17);
VH CDR2: YISPSGGGTHYADSVKG (SEQ ID NO: 18);
VH CDR3: VRFRSVCNAVCRPTAYDAFDI (SEQ ID NO: 19);

La SEQ ID NO: 2 es el dominio variable ligero (VL) del anticuerpo X19-A05 y tiene la secuencia:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVFYQSNKKNYLAWYQQKPGQPPKL
LIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYFNAPRTFG
QGTKVEIK,

5

e incluye las regiones determinantes de la complementariedad (CDR):

VL CDR4: KSSQSVFYQSNKKNYLA (SEQ ID NO: 23);
VL CDR5: WASTRES (SEQ ID NO: 25);
VL CDR6: QQYFNAPRT (SEQ ID NO: 26),

10 La SEQ ID NO: 3 es el dominio variable pesado (VH) del anticuerpo M99-B05 que se describe en los siguientes ejemplos, y tiene la secuencia:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSGYWMHWVRQAPGKGLEWVSYIS
PSGGGTHYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVRFRSV
CSNGVCRPTAYDAFDIWGQGTAVTVSS,

e incluye las regiones determinantes de la complementariedad (CDR):

15 VH CDR1: GYWM (SEQ ID NO: 17);
VH CDR2: YISPSGGGTHYADSVKG (SEQ ID NO: 18);
VH CDR3: VRFRSVCNGVCRPTAYDAFDI (SEQ ID NO: 20),

La SEQ ID NO: 4 es el dominio variable ligero (VL) del anticuerpo M99-B05 y tiene la secuencia:

QDIQMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVFYNSNKKNYLAWYQQKAGQPPK
LLIHWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISNLQAEDVALYYCQQYFNAPRTF
GQGTKVEIK,

e incluye las regiones determinantes de la complementariedad (CDR):

20 VL CDR4: KSSQSVFYNSNKKNYLA (SEQ ID NO: 24);
VL CDR5: WASTRES (SEQ ID NO: 25);
VL CDR6: QQYFNAPRT (SEQ ID NO: 26),

La SEQ ID NO: 5 es el dominio variable pesado (VH) del anticuerpo X19-A01 que se describe en los siguientes ejemplos, y tiene la secuencia:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSGYWMHWVRQAPGKGLEWVSYIS
PSGGGTHYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVRFRSV
CSNGVCRPTAYDAFDIWGQGTAVTVSS,

25

e incluye las regiones determinantes de la complementariedad (CDR):

VH CDR1: GYWM (SEQ ID NO: 17);
VH CDR2: YISPSGGGTHYADSVKG (SEQ ID NO: 18);
VH CDR3: VRFRSVCNGVCRPTAYDAFDI (SEQ ID NO: 20),

30 La SEQ ID NO: 6 es el dominio variable ligero (VL) del anticuerpo X19-A01 y tiene la secuencia:

DIQMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVFYNSNKKNYLAWYQQKAGQPPKL
LIHWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISNLQAEDVALYYCQQYFNAPRTFG
QGTKVEIK,

e incluye las regiones determinantes de la complementariedad (CDR):

- 5 VL CDR4: KSSQSVFYNSNKKNYLA (SEQ ID NO: 24);
VL CDR5: WASTRES (SEQ ID NO: 25);
VL CDR6: QQYFNAPRT (SEQ ID NO: 26),

La SEQ ID NO: 7 es el dominio variable pesado (VH) del anticuerpo X19-A03 que se describe en los siguientes ejemplos, y tiene la secuencia:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSGYWMHWVRQAPGKGLEWVSYIS
PSGGGTHYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVFRFSV
CSNAVCRPTAYDAFDIWGQGMVTVSS,

e incluye las regiones determinantes de la complementariedad (CDR):

- 10 VH CDR1: GYWM (SEQ ID NO: 17);
VH CDR2: YISPSGGGTHYADSVKG (SEQ ID NO: 18);
VH CDR3: VFRFSVCSNAVCRPTAYDAFDI (SEQ ID NO: 19),

La SEQ ID NO: 8 es el dominio variable ligero (VL) del anticuerpo X19-A03 y tiene la secuencia:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVFYQSNKKNYLAWYQQKPGQPPKL
LIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYFNAPRTFG
QGTKVEIK,

- 15 e incluye las regiones determinantes de la complementariedad (CDR):

VL CDR4: KSSQSVFYQSNKKNYLA (SEQ ID NO: 23);
VL CDR5: WASTRES (SEQ ID NO: 25);
VL CDR6: QQYFNAPRT (SEQ ID NO: 26),

- 20 La SEQ ID NO: 9 es el dominio variable pesado (VH) del anticuerpo X19-A07 que se describe en los siguientes ejemplos, y tiene la secuencia:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSGYWMHWVRQAPGKGLEWVSYIS
PSGGGTHYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVFRFSV
CSNGVCRPTAYDAFDIWGQGMVTVSS,

e incluye las regiones determinantes de la complementariedad (CDR):

- 25 VH CDR1: GYWM (SEQ ID NO: 17);
VH CDR2: YISPSGGGTHYADSVKG (SEQ ID NO: 18);
VH CDR3: VFRFSVCSNGVCRPTAYDAFDI (SEQ ID NO: 20),

La SEQ ID NO: 10 es el dominio variable ligero (VL) del anticuerpo X19-A07 y tiene la secuencia:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVFYNSNKKNYLAWYQQKPGQPPL
LIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYFNAPRTFG
QGTKVEIK,

e incluye las regiones determinantes de la complementariedad (CDR):

- 5 VL CDR4: KSSQSVFYNSNKKNYLA (SEQ ID NO: 24);
VL CDR5: WASTRES (SEQ ID NO: 25);
VL CDR6: QQYFNAPRT (SEQ ID NO: 26),

La SEQ ID NO: 11 es el dominio variable pesado (VH) del anticuerpo X19- A09 que se describe en los siguientes ejemplos, y tiene la secuencia:

EVQLLES GGGLVQP GGSLRLS CAASGFTFSGYWMHWVRQAPGKGLEWVSYI
SPSGGGTHYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVFRS
VCSNGVCRPTAYDAFDIWGQGTMTVSS,

e incluye las regiones determinantes de la complementariedad (CDR):

- 10 VH CDR1: GYWM (SEQ ID NO: 17);
VH CDR2: YISPSGGGTHYADSVKG (SEQ ID NO: 18);
VH CDR3: VFRSVCSNGVCRPTAYDAFDI (SEQ ID NO: 20),

La SEQ ID NO: 12 es el dominio variable ligero (VL) del anticuerpo X19-A09 y tiene la secuencia:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVFYNSNKKNYLAWYQQKPGQPPL
LIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYFNAPRTFG
QGTKVEIK,

15 e incluye las regiones determinantes de la complementariedad (CDR):

- VL CDR4: KSSQSVFYNSNKKNYLA (SEQ ID NO: 24);
VL CDR5: WASTRES (SEQ ID NO: 25);
VL CDR6: QQYFNAPRT (SEQ ID NO: 26),

20 La SEQ ID NO: 13 es el dominio variable pesado (VH) del anticuerpo X19- A11 que se describe en los siguientes ejemplos, y tiene la secuencia:

EVQLLES GGGLVQP GGSLRLS CAASGFTSGYWMHWVRQAPGKGLEWVSYI
PSGGGTHYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVFRSV
SSNGVSRPTAYDAFDIWGQGTAVTVSS,

e incluye las regiones determinantes de la complementariedad (CDR):

- 25 VH CDR1: GYWM (SEQ ID NO: 17);
VH CDR2: YISPSGGGTHYADSVKG (SEQ ID NO: 18);
VH CDR3: VFRSVSSNGVSRPTAYDAFDI (SEQ ID NO: 21),

La SEQ ID NO: 14 es el dominio variable ligero (VL) del anticuerpo X19-A11 y tiene la secuencia:

DIQMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVFYNSNKKNYLAWYQQKAGQPPKL
 LIHWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISNLQAEDVALYYCQQYFNAPRTFG
 QGTKVEIK,

e incluye las regiones determinantes de la complementariedad (CDR):

- 5 VL CDR4: KSSQSVFYNSNKKNYLA (SEQ ID NO: 24);
- VL CDR5: WASTRES (SEQ ID NO: 25);
- VL CDR6: QQYFNAPRT (SEQ ID NO: 26),

La SEQ ID NO: 15 es el dominio variable pesado (VH) del anticuerpo X19- C01 que se describe en los siguientes ejemplos, y tiene la secuencia:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSGYWMHWVRQAPGKGLEWVSYIS
 PSGGGTHYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVRFRSV
 SSNAVSRPTAYDAFDIWGQGTMTVSS,

e incluye las regiones determinantes de la complementariedad (CDR):

- 10 VH CDR1: GYWM (SEQ ID NO: 17);
- VH CDR2: YISPSGGGTHYADSVKG (SEQ ID NO: 18);
- VH CDR3: VRFRSVSSNAVSRPTAYDAFDI (SEQ ID NO: 22),

La SEQ ID NO: 16 es el dominio variable ligero (VL) del anticuerpo X19-C01 y tiene la secuencia:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVFYQSNKKNYLAWYQQKPGQPPKL
 LIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYFNAPRTFG
 QGTKVEIK,

15 e incluye las regiones determinantes de la complementariedad (CDR):

- VL CDR4: KSSQSVFYQSNKKNYLA (SEQ ID NO: 23);
- VL CDR5: WASTRESE (SEQ ID NO: 25);
- VL CDR6: QQYFNAPRT (SEQ ID NO: 26).

A continuación se expone un resumen de las SEQ ID NO, definidas anteriormente:

	VH	VL	CDR1	CDR2	CDR3	CDR4	CDR5	CDR6
X19- A05	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEC ID NO: 17	SEQ ID NO: 18	SEC ID NO: 19	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 26
M99- B05	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 26
X19- A01	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 26

20

(continuación)

	VH	VL	CDR1	CDR2	CDR3	CDR4	CDR5	CDR6
X19- A03	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 26
X19- A07	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 26
X19- A09	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 26
X19- A11	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 26
X19- C01	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 26

En una divulgación, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo está basado en los dominios VH y/o VL del anticuerpo X19- A05, y por lo tanto:

- 5 el dominio VH (i) comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o el 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 y/o (ii) comprende una secuencia de CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 25 %, 50 %, 75 % o el 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 17, una secuencia de CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 5 %, 11 %, 17 %, 23 %, 29 %, 35 %, 47 %, 52 %, 58 %, 64 %, 70 %, 76 %, 82 %
- 10 %, 94 % o el 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 18, y una secuencia de CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 4 %, 9 %, 13 %, 18 %, 22 %, 27 %, 31 %, 36 %, 40 %, 45 %, 50 %, 54 %, 59 %, 63 %, 68 %, 72 %, 77 %, 81 %, 86 %, 90 %, 95 % o el 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 19; y/o
- 15 el dominio VL (iii) comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o el 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2 y/o (iv) comprende una secuencia de CDR4 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 5 %, 11 %, 17 %, 23 %, 29 %, 35 %, 47 %, 52 %, 58 %, 64 %, 70 %, 76 %, 82 %, 94 % o el 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 23, una secuencia de CDR5 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 14 %, 28 %, 42 %, 57 %, 71 %, 85 % o el 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 25 y una
- 20 secuencia de CDR6 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 11 %, 22 %, 33 %, 44 %, 55 %, 66 %, 77 %, 88 % o el 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 26. Puede ser preferente que el dominio VH comprenda la secuencia de SEQ ID NO: 1 y el dominio VL comprenda la secuencia de SEQ ID NO: 2.

25 El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente divulgación puede comprender adicionalmente una región constante de cadena pesada (CH) o un fragmento de la misma, pudiendo comprender el fragmento, por ejemplo, al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 320 o más aminoácidos de una región CH. La región CH, o un fragmento de la misma, puede estar unida al dominio VH. No existe una limitación particular sobre la región CH, aunque en una realización es una región CH humana. La técnica contiene muchos ejemplos de regiones CH humanas. Las regiones CH humanas ejemplares para usar en este

30 contexto incluyen:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
 FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDK
 THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKF
 NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
 ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
 WESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEA
 LHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 27); y

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
 FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDK
 THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKF
 NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
 ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
 WESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEA
 LHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 28).

5 La SEQ ID N°:27 es la región CH de M99-B05 y tiene la secuencia de una región CH de IgG1 humana (UniProtKB/Swiss-Prot: P01857.1). La SEQ ID NO: 28 es la región CH de X19-A05. La SEQ ID NO: 28 difiere de la SEQ ID NO: 27 en la eliminación de la K (Lys) terminal en la región CH de la SEQ ID NO: 28, que reduce o suprime el potencial para la degradación de peptidasa.

10 El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de esta realización puede comprender además, adicionalmente o como alternativa, una región constante de cadena ligera (CL) o un fragmento de la misma, pudiendo comprender el fragmento, por ejemplo, al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más aminoácidos de una región CL. La región CL, o un fragmento de la misma, puede estar unida al dominio VL. No existe una limitación particular sobre la región CL, aunque en una realización es una región CL humana. La técnica contiene muchos ejemplos de regiones CL humanas. Una región CL humana ejemplar para usar en este contexto incluye:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
 QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR
 GEC (SEQ ID NO: 29).

15 La SEQ ID N°:29 es la región CL tanto de M99-B05 como de X19-A05 y posee la secuencia de la región CL de kappa humana (UniProtKB/Swiss-Prot: P01834.1).

Según la presente divulgación, puede ser preferente que el dominio VH comprenda la secuencia de la SEQ ID NO:1, unida a la región CH de la SEQ ID NO: 28 y el dominio VL comprenda la secuencia de la SEQ ID NO: 2 unida a la región CL de la SEQ ID NO: 29.

20 En otra divulgación, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo está basado en los dominios VH y/o VL del anticuerpo M99-B05 y, por lo tanto:

25 el dominio VH (i) comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o el 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3 y/o (ii) comprende una secuencia de CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 25 %, 50 %, 75 % o el 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 17, una secuencia de CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 5 %, 11 %, 17 %, 23 %, 29 %, 35 %, 47 %, 52 %, 58 %, 64 %, 70 %, 76 %, 82 %, 94 % o el 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 18, y una secuencia de CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 4 %, 9 %, 13 %, 18 %, 22 %, 27 %, 31 %, 36 %, 40 %, 45 %, 50 %, 54 %, 59 %, 63 %, 68 %, 72 %, 77 %, 81 %, 86 %, 90 %, 95 % o el 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 20; y/o

30 el dominio VL (iii) comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o el 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 4 y/o (iv) comprende una secuencia de CDR4 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 5 %, 11 %, 17 %, 23 %, 29 %, 35 %, 47 %, 52 %, 58 %, 64 %, 70 %, 76 %, 82 %, 94 % o el 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID

NO: 24, una secuencia de CDR5 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 14 %, 28 %, 42 %, 57 %, 71 %, 85 % o el 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 25 y una secuencia de CDR6 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 11 %, 22 %, 33 %, 44 %, 55 %, 66 %, 77 %, 88 % o el 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 26. Puede ser preferente que el dominio VH comprenda la secuencia de la SEQ ID NO: 3 y el dominio VL comprenda la secuencia de la SEQ ID NO: 4.

El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente divulgación puede comprender adicionalmente una región constante de cadena pesada (CH) o un fragmento de la misma, pudiendo comprender el fragmento, por ejemplo, al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 320 o más aminoácidos de una región CH. La región CH, o un fragmento de la misma, puede estar unida al dominio VH. No existe una limitación particular sobre la región CH, aunque en una realización es una región CH humana. La técnica contiene muchos ejemplos de regiones CH humanas. Las regiones CH humanas ejemplares para usar en este contexto incluyen la SEQ ID NO: 27 y la SEQ ID NO: 28.

El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente divulgación puede comprender además, adicionalmente o como alternativa, una región constante de cadena ligera (CL) o un fragmento de la misma, pudiendo comprender el fragmento, por ejemplo, al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más aminoácidos de una región CL. La región CL, o un fragmento de la misma, puede estar unida al dominio VL. No existe una limitación particular sobre la región CL, aunque en una realización es una región CL humana. La técnica contiene muchos ejemplos de regiones CL humanas. Una región CL humana ejemplar para usar en este contexto incluye la SEQ ID NO: 29.

Según la presente divulgación, puede ser preferente que el dominio VH comprenda la secuencia de la SEQ ID NO:3, unida a la región CH de la SEQ ID NO: 27 o 28 y el dominio VL comprenda la secuencia de la SEQ ID NO: 4 unida a la región CL de la SEQ ID NO: 29.

En otra realización del primer aspecto de la invención, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo está basado en los dominios VH y/o VL del anticuerpo X19-A01 y, por lo tanto:

el dominio VH (i) comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o el 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 5 y/o (ii) comprende una secuencia de CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 25 %, 50 %, 75 % o el 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 17, una secuencia de CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 5 %, 11 %, 17 %, 23 %, 29 %, 35 %, 47 %, 52 %, 58 %, 64 %, 70 %, 76 %, 82 %, 94 % o el 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 18, y una secuencia de CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 4 %, 9 %, 13 %, 18 %, 22 %, 27 %, 31 %, 36 %, 40 %, 45 %, 50 %, 54 %, 59 %, 63 %, 68 %, 72 %, 77 %, 81 %, 86 %, 90 %, 95 % o el 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 20; y/o

el dominio VL (i) comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o el 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 6 y/o (iv) comprende una secuencia de CDR4 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 5 %, 11 %, 17 %, 23 %, 29 %, 35 %, 47 %, 52 %, 58 %, 64 %, 70 %, 76 %, 82 %, 94 % o el 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 24, una secuencia de CDR5 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 14 %, 28 %, 42 %, 57 %, 71 %, 85 % o el 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 25 y una secuencia de CDR6 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 11 %, 22 %, 33 %, 44 %, 55 %, 66 %, 77 %, 88 % o el 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 26. Puede ser preferente que el dominio VH comprenda la secuencia de la SEQ ID NO: 5 y el dominio VL comprenda la secuencia de la SEQ ID NO: 6.

El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de la presente divulgación puede comprender adicionalmente una región constante de cadena pesada (CH) o un fragmento de la misma, pudiendo comprender el fragmento, por ejemplo, al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 320 o más aminoácidos de una región CH. La región CH, o un fragmento de la misma, puede estar unida al dominio VH. No existe una limitación particular sobre la región CH, aunque en una realización es una región CH humana. La técnica contiene muchos ejemplos de regiones CH humanas. Regiones CH humanas ejemplares para usar en este contexto incluyen la SEQ ID NO: 27 y la SEQ ID NO: 28.

El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente divulgación puede comprender además, adicionalmente o como alternativa, una región constante de cadena ligera (CL) o un fragmento de la misma, pudiendo comprender el fragmento, por ejemplo, al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más aminoácidos de una región CL. La región CL, o un fragmento de la misma, puede estar unida al dominio VL. No existe una limitación particular sobre la región CL, aunque en una realización es una región CL humana. La técnica contiene muchos ejemplos de regiones CL humanas. Una región CL humana ejemplar para usar en este contexto incluye la SEQ ID NO: 29.

Según la presente divulgación, puede ser preferente que el dominio VH comprenda la secuencia de la SEQ ID NO:5, unida a la región CH de la SEQ ID NO: 27 o 28 y el dominio VL comprenda la secuencia de la SEQ ID NO: 6 unida a la región CL de la SEQ ID NO: 29.

En otra divulgación, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo está basado en los dominios VH y/o VL del anticuerpo X19-A03, y por lo tanto:

5 el dominio VH (i) comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o el 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 7 y/o (ii) comprende una secuencia de CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 25 %, 50 %, 75 % o el 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 17, una secuencia de CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 5 %, 11 %, 17 %, 23 %, 29 %, 35 %, 47 %, 52 %, 58 %, 64 %, 70 %, 76 %, 82 %, 94 % o el 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 18, y una secuencia de CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 4 %, 9 %, 13 %, 18 %, 22 %, 27 %, 31 %, 36 %, 40 %, 45 %, 50 %, 54 %, 59 %, 63 %, 68 %, 72 %, 77 %, 81 %, 86 %, 90 %, 95 % o el 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 19; y/o

10 el dominio VL (iii) comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o el 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 8 y/o (iv) comprende una secuencia de CDR4 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 5 %, 11 %, 17 %, 23 %, 29 %, 35 %, 47 %, 52 %, 58 %, 64 %, 70 %, 76 %, 82 %, 94 % o el 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 23, una secuencia de CDR5 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 14 %, 28 %, 42 %, 57 %, 71 %, 85 % o el 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 25 y una secuencia de CDR6 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 11 %, 22 %, 33 %, 44 %, 55 %, 66 %, 77 %, 88 % o el 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 26. Puede ser preferente que el dominio VH comprenda la secuencia de la SEQ ID NO: 7 y el dominio VL comprenda la secuencia de la SEQ ID NO: 8.

El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente divulgación puede comprender adicionalmente una región constante de cadena pesada (CH) o un fragmento de la misma, pudiendo comprender el fragmento, por ejemplo, al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 320 o más aminoácidos de una región CH. La región CH, o un fragmento de la misma, puede estar unida al dominio VH. No existe una limitación particular sobre la región CH, aunque en una realización es una región CH humana. La técnica contiene muchos ejemplos de regiones CH humanas. Las regiones CH humanas ejemplares para usar en este contexto incluyen la SEQ ID NO: 27 y la SEQ ID NO: 28.

El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de esta realización puede comprender además, adicionalmente o como alternativa, una región constante de cadena ligera (CL) o un fragmento de la misma, pudiendo comprender el fragmento, por ejemplo, al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más aminoácidos de una región CL. La región CL, o un fragmento de la misma, puede estar unida al dominio VL. No existe una limitación particular sobre la región CL, aunque en una realización es una región CL humana. La técnica contiene muchos ejemplos de regiones CL humanas. Una región CL humana ejemplar para usar en este contexto incluye la SEQ ID NO: 29.

35 Según esta realización, puede ser preferente que el dominio VH comprenda la secuencia de la SEQ ID NO:7, unida a la región CH de la SEQ ID NO: 27 o 28 y el dominio VL comprenda la secuencia de la SEQ ID NO: 8 unida a la región CL de la SEQ ID NO: 29.

En otra divulgación, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo está basado en los dominios VH y/o VL del anticuerpo X19-A07, y por lo tanto:

40 el dominio VH (i) comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o el 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 9 y/o (ii) comprende una secuencia de CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 25 %, 50 %, 75 % o el 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 17, una secuencia de CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 5 %, 11 %, 17 %, 23 %, 29 %, 35 %, 47 %, 52 %, 58 %, 64 %, 70 %, 76 %, 82 %, 94 % o el 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 18, y una secuencia de CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 4 %, 9 %, 13 %, 18 %, 22 %, 27 %, 31 %, 36 %, 40 %, 45 %, 50 %, 54 %, 59 %, 63 %, 68 %, 72 %, 77 %, 81 %, 86 %, 90 %, 95 % o el 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 20; y/o

45 el dominio VL (iii) comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o el 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 10 y/o (iv) comprende una secuencia de CDR4 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 5 %, 11 %, 17 %, 23 %, 29 %, 35 %, 47 %, 52 %, 58 %, 64 %, 70 %, 76 %, 82 %, 94 % o el 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 24, una secuencia de CDR5 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 14 %, 28 %, 42 %, 57 %, 71 %, 85 % o el 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 25 y una secuencia de CDR6 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 11 %, 22 %, 33 %, 44 %, 55 %, 66 %, 77 %, 88 % o el 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 26. Puede ser preferente que el dominio VH comprenda la secuencia de la SEQ ID NO: 9 y el dominio VL comprenda la secuencia de la SEQ ID NO: 10.

El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de esta realización puede comprender adicionalmente una región constante de cadena pesada (CH) o un fragmento de la misma, pudiendo comprender el fragmento, por ejemplo, al menos 10,

20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 320 o más aminoácidos de una región CH. La región CH, o un fragmento de la misma, puede estar unida al dominio VH. No existe una limitación particular sobre la región CH, aunque en una realización es una región CH humana. La técnica contiene muchos ejemplos de regiones CH humanas. Las regiones CH humanas ejemplares para usar en este contexto incluyen la SEQ ID NO: 27 y la SEQ ID NO: 28.

El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de esta realización puede comprender además, adicionalmente o como alternativa, una región constante de cadena ligera (CL) o un fragmento de la misma, pudiendo comprender el fragmento, por ejemplo, al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más aminoácidos de una región CL. La región CL, o un fragmento de la misma, puede estar unida al dominio VL. No existe una limitación particular sobre la región CL, aunque en una realización es una región CL humana. La técnica contiene muchos ejemplos de regiones CL humanas. Una región CL humana ejemplar para usar en este contexto incluye la SEQ ID NO: 29.

Según esta realización, puede ser preferente que el dominio VH comprenda la secuencia de la SEQ ID NO:9, unida a la región CH de la SEQ ID NO: 27 o 28 y el dominio VL comprenda la secuencia de la SEQ ID NO: 10 unida a la región CL de la SEQ ID NO: 29.

En otra realización del primer aspecto de la invención, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo está basado en los dominios VH y/o VL del anticuerpo X19-A09, y por lo tanto:

el dominio VH (i) comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o el 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 11 y/o (ii) comprende una secuencia de CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 25 %, 50 %, 75 % o el 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 17, una secuencia de CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 5 %, 11 %, 17 %, 23 %, 29 %, 35 %, 47 %, 52 %, 58 %, 64 %, 70 %, 76 %, 82 %, 94 % o el 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 18, y una secuencia de CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 4 %, 9 %, 13 %, 18 %, 22 %, 27 %, 31 %, 36 %, 40 %, 45 %, 50 %, 54 %, 59 %, 63 %, 68 %, 72 %, 77 %, 81 %, 86 %, 90 %, 95 % o el 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 20; y/o

el dominio VL (iii) comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o el 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 12 y/o (iv) comprende una secuencia de CDR4 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 5 %, 11 %, 17 %, 23 %, 29 %, 35 %, 47 %, 52 %, 58 %, 64 %, 70 %, 76 %, 82 %, 94 % o el 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 24, una secuencia de CDR5 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 14 %, 28 %, 42 %, 57 %, 71 %, 85 % o el 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 25 y una secuencia de CDR6 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 11 %, 22 %, 33 %, 44 %, 55 %, 66 %, 77 %, 88 % o el 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 26. Puede ser preferente que el dominio VH comprenda la secuencia de la SEQ ID NO: 11 y el dominio VL comprenda la secuencia de la SEQ ID NO: 12.

El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente divulgación puede comprender adicionalmente una región constante de cadena pesada (CH) o un fragmento de la misma, pudiendo comprender el fragmento, por ejemplo, al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 320 o más aminoácidos de una región CH. La región CH, o un fragmento de la misma, puede estar unida al dominio VH. No existe una limitación particular sobre la región CH, aunque en una realización es una región CH humana. La técnica contiene muchos ejemplos de regiones CH humanas. Las regiones CH humanas ejemplares para usar en este contexto incluyen la SEQ ID NO: 27 y la SEQ ID NO: 28.

El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente divulgación puede comprender además, adicionalmente o como alternativa, una región constante de cadena ligera (CL) o un fragmento de la misma, pudiendo comprender el fragmento, por ejemplo, al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más aminoácidos de una región CL. La región CL, o un fragmento de la misma, puede estar unida al dominio VL. No existe una limitación particular sobre la región CL, aunque en una realización es una región CL humana. La técnica contiene muchos ejemplos de regiones CL humanas. Una región CL humana ejemplar para usar en este contexto incluye la SEQ ID NO: 29.

Según la presente divulgación, puede ser preferente que el dominio VH comprenda la secuencia de la SEQ ID NO:11, unida a la región CH de la SEQ ID NO: 27 o 28 y el dominio VL comprenda la secuencia de la SEQ ID NO: 12 unida a la región CL de la SEQ ID NO: 29.

En otra divulgación, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo está basado en los dominios VH y/o VL del anticuerpo X19-A11, y por lo tanto:

el dominio VH (i) comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o el 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 13 y/o (ii) comprende una secuencia de CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 25 %, 50 %, 75 % o el 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 17, una secuencia de CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 5 %, 11 %, 17 %, 23 %, 29 %, 35 %, 47 %, 52 %, 58 %, 64 %, 70 %, 76 %, 82 %, 94 % o el

100 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEQ ID NO: 18, y una secuencia de CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 4 %, 9 %, 13 %, 18 %, 22 %, 27 %, 31 %, 36 %, 40 %, 45 %, 50 %, 54 %, 59 %, 63 %, 68 %, 72 %, 77 %, 81 %, 86 %, 90 %, 95 % o el 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 21; y/o

5 el dominio VL (i) comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o el 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 14 y/o (iv) comprende una secuencia de CDR4 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 5 %, 11 %, 17 %, 23 %, 29 %, 35 %, 47 %, 52 %, 58 %, 64 %, 70 %, 76 %, 82 %, 94 % o el 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 24, una secuencia de CDR5 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 14 %, 28 %
10 %, 42 %, 57 %, 71 %, 85 % o el 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 25 y una secuencia de CDR6 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 11 %, 22 %, 33 %, 44 %, 55 %, 66 %, 77 %, 88 % o el 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 26. Puede ser preferente que el dominio VH comprenda la secuencia de la SEQ ID NO: 13 y el dominio VL comprenda la secuencia de la SEQ ID NO: 14.

15 El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de esta realización puede comprender adicionalmente una región constante de cadena pesada (CH) o un fragmento de la misma, pudiendo comprender el fragmento, por ejemplo, al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 320 o más aminoácidos de una región CH. La región CH, o un fragmento de la misma, puede estar unida al dominio VH. No existe una limitación particular sobre la región CH, aunque en una realización es una región CH humana. La técnica contiene muchos
20 ejemplos de regiones CH humanas. Las regiones CH humanas ejemplares para usar en este contexto incluyen la SEQ ID NO: 27 y la SEQ ID NO: 28.

El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente divulgación puede comprender además, adicionalmente o como alternativa, una región constante de cadena ligera (CL) o un fragmento de la misma, pudiendo comprender el fragmento, por ejemplo, al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más aminoácidos de una región CL. La
25 región CL, o un fragmento de la misma, puede estar unida al dominio VL. No existe una limitación particular sobre la región CL, aunque en una realización es una región CL humana. La técnica contiene muchos ejemplos de regiones CL humanas. Una región CL humana ejemplar para usar en este contexto incluye la SEQ ID NO: 29.

Según la presente realización de la divulgación, puede ser preferente que el dominio VH comprenda la secuencia de la SEQ ID NO:13, unida a la región CH de SEQ ID NO: 27 o 28 y el dominio VL comprenda la secuencia de la SEQ
30 ID NO: 14 unida a la región CL de la SEQ ID NO: 29.

En otra divulgación, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo está basado en los dominios VH y/o VL del anticuerpo X19-C01, y por lo tanto:

el dominio VH (i) comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o el 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 15 y/o (ii) comprende una secuencia de CDR1 que
35 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 25 %, 50 %, 75 % o el 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 17, una secuencia de CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 5 %, 11 %, 17 %, 23 %, 29 %, 35 %, 47 %, 52 %, 58 %, 64 %, 70 %, 76 %, 82 %, 94 % o el 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 18, y una secuencia de CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 4 %, 9 %, 13 %, 18 %, 22 %, 27 %, 31 %, 36 %, 40 %, 45 %, 50 %, 54 %, 59 %, 63 %, 68 %, 72 %, 77 %, 81 %, 86 %, 90 %, 95 % o el 100 % de identidad
40 de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 22; y/o

el dominio VL (iii) comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o el 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 16 y/o (iv) comprende una secuencia de CDR4 que
45 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 5 %, 11 %, 17 %, 23 %, 29 %, 35 %, 47 %, 52 %, 58 %, 64 %, 70 %, 76 %, 82 %, 94 % o el 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 23, una secuencia de CDR5 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 14 %, 28 %, 42 %, 57 %, 71 %, 85 % o el 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 25 y una secuencia de CDR6 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 11 %, 22 %, 33 %, 44 %, 55 %, 66 %, 77 %, 88 % o el 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 26. Puede ser preferible que el dominio VH comprenda la secuencia de la SEQ ID NO: 15 y el dominio VL comprenda la
50 secuencia de la SEQ ID NO: 16.

El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de esta realización puede comprender adicionalmente una región constante de cadena pesada (CH) o un fragmento de la misma, pudiendo comprender el fragmento, por ejemplo, al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 320 o más aminoácidos de una
55 región CH. La región CH, o un fragmento de la misma, puede estar unida al dominio VH. No existe una limitación particular sobre la región CH, aunque en una realización es una región CH humana. La técnica contiene muchos ejemplos de regiones CH humanas. Regiones CH humanas ejemplares para usar en este contexto incluyen la SEQ ID NO: 27 y la SEQ ID NO: 28.

El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente divulgación puede comprender además, adicionalmente o como alternativa, una región constante de cadena ligera (CL) o un fragmento de la misma, pudiendo comprender el
60

fragmento, por ejemplo, al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más aminoácidos de una región CL. La región CL, o un fragmento de la misma, puede estar unida al dominio VL. No existe una limitación particular sobre la región CL, aunque en una realización es una región CL humana. La técnica contiene muchos ejemplos de regiones CL humanas. Una región CL humana ejemplar para usar en este contexto incluye la SEQ ID NO: 29

- 5 Según la presente divulgación, puede ser preferente que el dominio VH comprenda la secuencia de la SEQ ID NO:15, unida a la región CH de la SEQ ID NO: 27 o 28 y el dominio VL comprenda la secuencia de la SEQ ID NO: 16 unida a la región CL de la SEQ ID NO: 29.

10 En las diversas realizaciones precedentes, la discusión sobre regiones CH y fragmentos de las mismas también se pretende que incluya la opción de usar una variante de las mismas. La variante comprende una secuencia que tiene menos del 100 % de identidad de secuencia con la región CH indicada o un fragmento de la misma, tal como más del 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia. En consecuencia, las variantes de una región CH o un fragmento de la misma pueden poseer una o más (tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160 o más) variaciones de secuencia en comparación con la región CH indicada o fragmento de la misma. Las variaciones en la secuencia
15 pueden deberse a una o más adiciones de aminoácidos, una o más deleciones de aminoácidos y/o una o más sustituciones de aminoácidos en comparación con la región CH indicada o un fragmento de la misma. Cuando hay más de una variación, las variaciones pueden estar en posiciones consecutivas o no consecutivas.

20 Asimismo, en las diversas realizaciones precedentes, la discusión sobre regiones CL y fragmentos de las mismas también se pretende que incluya la opción de usar una variante de las mismas. La variante comprende una secuencia que tiene menos del 100 % de identidad de secuencia con la región CL indicada o un fragmento de la misma, tal como más del 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia. En consecuencia, las variantes de una región CL o un fragmento de la misma pueden poseer una o más (tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60 o más) variaciones de secuencia en comparación con la región CL indicada o fragmento de la misma. Las variaciones en la secuencia pueden deberse a una o más
25 adiciones de aminoácidos, una o más deleciones de aminoácidos y/o una o más sustituciones de aminoácidos en comparación con la región CL indicada o un fragmento de la misma. Cuando hay más de una variación, las variaciones pueden estar en posiciones consecutivas o no consecutivas.

30 En el anticuerpo o fragmento de anticuerpo según las realizaciones anteriores, puede ser preferente que el dominio VH, el dominio VL o preferentemente tanto el dominio VH como el VL, comprendan una secuencia de aminoácidos con el 100 % de identidad de secuencia con la citada, o en el caso de las SEQ ID NO enumeradas que corresponden a las secuencias CDR individuales, una o más (tales como dos o tres) de cada una de las SEQ ID NO enumeradas.

35 Como alternativa, el dominio VH, el dominio VL o tanto el dominio VH como el VL, pueden comprender una secuencia de aminoácidos con menos del 100 % de identidad de secuencia con la citada, o en el caso de las SEQ ID NO enumeradas que corresponden a las secuencias CDR individuales, una o más (tales como dos o tres) de cada una de las SEQ ID NO enumeradas.

40 En una divulgación, una secuencia que comprende una secuencia de aminoácidos con menos del 100 % de identidad con la SEQ ID NO citada puede ser una secuencia que posee una o más (como por ejemplo 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más) variaciones de secuencia en comparación con la SEQ ID NO citada. Las variaciones de secuencia se pueden deber a una o más (tales como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más) adiciones de aminoácidos, una o más (tales como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más) deleciones de aminoácidos y/o una o más (tales como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más) sustituciones de aminoácidos en comparación con la SEQ ID NO citada. Cuando hay más de una variación, las variaciones se pueden presentar en posiciones consecutivas o no consecutivas.

45 Las una o más variaciones de secuencia en una región variante de unión al antígeno que tiene menos del 100 %, aunque al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, de identidad de secuencia con una SEQ ID NO citada seleccionada entre las SEQ ID NO: 1 a 16 pueden estar presentes en, o exclusivamente en la secuencia de aminoácidos que forman una o más de las regiones de marco. Las regiones de marco comprenden las regiones de aminoácidos que no forman las CDR definidas en el presente documento.

50 Además, o como alternativa, puede haber una o más variaciones de secuencia en una región de unión al antígeno que tiene menos del 100 %, aunque al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, de identidad de secuencia con una SEQ ID NO citada seleccionada entre las SEQ ID NO: 1 a 16 presente en, o exclusivamente en, la secuencia de aminoácidos que forma una o más de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Las CDR de SEQ ID NO: 1-16 son como se los definiera anteriormente y también están expuestas en las siguientes Tablas 2 y 3.

55 En todas las divulgaciones del primer aspecto de la invención, en general se pueden tolerar niveles más elevados de modificaciones de secuencia en las regiones marco que en las CDR sin alterar sustancialmente las características de unión y/o eficacia *in vivo* del anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

Así, por ejemplo, en una realización adicional, una, la o cada una de las CDR de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo según el primer aspecto de la presente invención puede comprender hasta 1 sustitución, inserción y/o

deleción de aminoácidos en comparación con la secuencia de CDR "parental" definida en una de las SEQ ID NO 17 a.

5 Además y/o como alternativa, una, la o cada una de las regiones de marco de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo según el primer aspecto de la presente invención puede comprender hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más sustituciones, inserciones y/o deleciones de aminoácidos en comparación con la correspondiente secuencia de marco presente en cualquiera de las secuencias VH o VL definidas en SEQ ID NO 1 a 16, y opcionalmente no más de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 sustituciones, inserciones y/o deleciones de aminoácidos; puede ser preferente que el número de sustituciones, inserciones y/o deleciones de aminoácidos implementadas en cualquier región marco no reduzca el nivel de identidad de secuencia a menos del 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % en comparación con la correspondiente SEQ ID NO definida. Las sustituciones, ya sea en una o más de las regiones de marco o determinantes de la complementariedad, pueden ser sustituciones conservativas o no conservativas. La expresión "sustituciones conservativas" se refiere a combinaciones tales como Gly, Ala; Val, He, Leu; Asp, Glu; Asn, Gln; Ser, Thr; Lys, Arg; y Phe, Tyr.

15 Se pueden introducir variaciones de secuencia, por ejemplo, a fin de que la región (o regiones) de unión al antígeno sean más aproximadas a las secuencias de la línea germinal a fin de mejorar la estabilidad del anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende la región (o regiones) variante de unión al antígeno, reducir la inmunogenicidad del anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende la región (o regiones) variante de unión al antígeno y/o para evitar o reducir propiedades que puedan ser desventajosas para el procedimiento de elaboración. Se presentan ejemplos no restrictivos de variaciones de secuencia adecuadas en los ejemplos, con referencia a las variaciones introducidas en las secuencias de cadena pesada y/o ligera de M99-B05 a fin de producir X19-A01, X19-A03, X19-A05, X19-A07, X19-A09, X19-A11 y/o X19-C01.

Dichas variantes pueden ser generadas usando los procedimientos de ingeniería de proteínas y mutagénesis de sitio dirigido descritos a continuación o procedimientos alternativos que son muy conocidos en la técnica.

25 Cuando el dominio VH, el dominio VL o ambos dominios VH y VL, del anticuerpo o fragmento de anticuerpo según el primer aspecto de la presente invención comprende (o comprenden) una o más secuencias de aminoácidos con menos del 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO citada o una o más de ellas, luego en una realización la capacidad del anticuerpo o fragmento de anticuerpo para unirse a la fosforilcolina y/o a un conjugado de fosforilcolina puede ser sustancialmente equivalente, por ejemplo (es decir, al menos el 80 %, 85 %, 90 % o el 95 %) o superior a la capacidad de unión de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo "parental" correspondiente, en el que cada uno del dominio VH y el dominio VL del correspondiente anticuerpo o fragmento de anticuerpo "parental" comprende una secuencia de aminoácidos que tiene el 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO citada o con cada una de las mismas.

35 Así, por ejemplo, cuando el anticuerpo o fragmento de anticuerpo está basado en el anticuerpo X19-A05, y el dominio VH comprende una secuencia de aminoácidos con menos del 100 %, aunque con al menos el 80 %, 85 %, 90 % o el 95 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1; y/o el dominio VL comprende una secuencia de aminoácidos con menos del 100 %, aunque con al menos el 80 %, 85 %, 90 % o el 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2, la capacidad del anticuerpo o fragmento de anticuerpo para unirse a la fosforilcolina y/o a un conjugado de fosforilcolina puede ser equivalente, por ejemplo, a la capacidad de unión de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo "parental" que tiene un dominio VH que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 1 y un dominio VL que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 2. En este contexto, por "anticuerpo o fragmento de anticuerpo "parental" correspondiente" se entiende que la única diferencia de secuencia entre el "anticuerpo o fragmento de anticuerpo" en cuestión y el "anticuerpo o fragmento de anticuerpo "parental" correspondiente" está en uno o ambos dominios VH y/o VL. En una realización, el anticuerpo parental correspondiente es un anticuerpo que tiene la secuencia de las regiones VH, VL, CH y CL de X19-A05, es decir, un dominio VH de la SEQ ID NO: 1 unido a la región CH de la SEQ ID NO: 28 y el dominio VL de la SEQ ID NO: 2 unido a la región CL de la SEQ ID NO: 29.

40 Lo mismo se aplica, con los cambios que correspondan, al otro anticuerpo o fragmento de anticuerpo antes enumerado, en el cual los dominios VH y/o VL comprende (o comprenden) una o más secuencias de aminoácidos con menos del 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO citada o una o más de ellas, y el correspondiente anticuerpo o fragmento de anticuerpo "parental" a fin de determinar la equivalencia de unión a la fosforilcolina y/o un conjugado de fosforilcolina difiere solo en una o ambas secuencias de los dominios VH y/o VL y posee (o poseen) la secuencia, o cada una de las secuencias, que comprende una secuencia de aminoácidos con el 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO, citada o una o más de ellas.

55 En consecuencia, cuando el anticuerpo o fragmento de anticuerpo está basado en el M99-B05 entonces, en una realización, el anticuerpo parental correspondiente es un anticuerpo que tiene la secuencia de las regiones VH, VL, CH y CL de M99-B05, es decir, un dominio VH de la SEQ ID NO:3 unido a la región CH de la SEQ ID NO: 27 y el dominio VL de la SEQ ID NO: 4 unido a la región CL de la SEQ ID NO: 29.

A este respecto, se puede determinar la capacidad de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo para unirse a fosforilcolina y/o un conjugado de fosforilcolina por cualquier procedimiento adecuado, como por ejemplo mediante

análisis por resonancia de plasmón superficial (SPR), para medir la unión del anticuerpo o fragmento de anticuerpo a la fosforilcolina inmovilizada (por ejemplo por medio de aminofenilo, a través del grupo amino libre) a una superficie sólida tal como el biosensor de SPR Biacore.

5 En una realización adicional, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo según el primer aspecto de la presente invención compete con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo "comparador" por la unión a PC o a un conjugado de PC según lo definido en el presente documento (por ejemplo, según determinación por un ensayo ELISA o SPR). En el presente contexto, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo comparador puede comprender los dominios VH y VL, y opcionalmente también los dominios CH y CL de X19-AQ5 (definido por las SEQ ID NO: 1, 2, 28 y 29, respectivamente), M99-B05 (definido SEQ ID NO: 3, 4, 27 y 29), X19-A01 (definido por SEQ ID NO: 5, 6, 27 y 29, respectivamente), X19-A03 (definido por SEQ ID NO: 7, 8, 27 y 29, respectivamente), X19-A07 (definido por SEQ ID NO: 9, 10, 27 y 29, respectivamente), X19-A09 (definido por SEQ ID NO: 11, 12, 27 y 29, respectivamente), X19-A11 (definido por SEQ ID NO: 13, 14, 27 y 29, respectivamente) o X19-C01 (definido por SEQ ID NO: 15, 16, 27 y 29, respectivamente) y preferentemente difiere del anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se está analizando solo en la variación de secuencia en las regiones VH y/o VL. Por "compite", los presentes autores quieren decir que la inclusión de cantidades equimolares del anticuerpo o fragmento de anticuerpo según el primer aspecto de la presente invención y el anticuerpo 'comparador' en un ensayo pueden reducir el nivel detectable de unión a PC o a un conjugado de PC del anticuerpo comparador en una proporción del 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o más, como por ejemplo sustancialmente el 100 %, en comparación con el nivel detectable de unión a PC o a un conjugado de PC del anticuerpo 'comparador' en el mismo ensayo en ausencia del anticuerpo o fragmento de anticuerpo según el primer aspecto de la presente invención.

Tal como se trata en los ejemplos expuestos más adelante, el M99-B05 se une a la aminofenil fosforilcolina con una Kd aparente de aproximadamente 150 nM. En una realización, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo según la presente invención se une a la aminofenil fosforilcolina inmovilizada con una Kd aparente de no más de aproximadamente 500 nM, aproximadamente 400 nM, aproximadamente 300 nM, aproximadamente 250 nM, aproximadamente 200 nM, aproximadamente 190 nM, aproximadamente 180 nM, aproximadamente 170 nM, aproximadamente 160 nM, aproximadamente 155 nM, aproximadamente 150 nM o menos si se los analiza en condiciones de SPR usadas en los ejemplos que dan lugar a la unión de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que tiene los dominios VH y VL de M99-B05 (definidos por SEQ ID NO 3 y 4, respectivamente) a la aminofenil fosforilcolina inmovilizada con una Kd aparente de aproximadamente 150 nM. En el presente contexto, se usa el término "aproximadamente" para referirse a un valor que está dentro de ± 20 %, 15 %, 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 % del valor indicado.

Como también se describe en los ejemplos más adelante, M99-B05 puede bloquear la liberación de MCP-1 de los monocitos en respuesta a la estimulación con oxLDL con una CI_{50} en el intervalo de nM. En otra realización, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo según la presente invención bloqueará la liberación de MCP-1 de los monocitos en respuesta a la estimulación con oxLDL con una CI_{50} de menos de aproximadamente 10 nM, aproximadamente 5 nM, aproximadamente 4 nM, aproximadamente 3 nM, aproximadamente 2,8 nM, aproximadamente 2,6 nM, aproximadamente 2,4 nM, aproximadamente 2 nM, aproximadamente 1,8 nM, aproximadamente 1,6 nM, aproximadamente 1,4 nM, aproximadamente 1,3 nM, aproximadamente 1,2 nM, aproximadamente 1,1 nM, aproximadamente 1,0 nM, aproximadamente 0,9 nM, aproximadamente 0,8 nM, aproximadamente 0,7 nM o menos si se los analiza en condiciones (como por ejemplo las condiciones de SPR usadas en los ejemplos) que dan lugar a una CI_{50} de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que tiene los dominios VH y VL de M99-B05 (definidos por SEQ ID NO 3 y 4, respectivamente) en el intervalo de 0,7-2,6 nM. En el presente contexto, se usa el término "aproximadamente" para referirse a un valor que está dentro de ± 20 %, 15 %, 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 % del valor indicado.

45 Se puede determinar la capacidad de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo según la presente invención para unirse a un conjugado de fosforilcolina mediante procedimientos equivalentes a los descritos anteriormente, reemplazando la fosforilcolina con el conjugado de fosforilcolina. Los conjugados adecuados de fosforilcolina incluyen los descritos anteriormente, que comprenden un resto de fosforilcolina ligado a un vehículo, opcionalmente a través de un espaciador, como por ejemplo los conjugados PC-BSA y PC-KLH. Preferentemente, cuando se determina la capacidad de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo para unirse al conjugado de fosforilcolina, se determina con respecto a la capacidad del anticuerpo o fragmento de anticuerpo para unirse específicamente al resto fosforilcolina presente en el conjugado de fosforilcolina. Esto se puede determinar por técnicas conocidas en la técnica, como por ejemplo comparando la capacidad del anticuerpo o fragmento de anticuerpo para unirse al conjugado de fosforilcolina y la correspondiente molécula que no contiene un resto de fosforilcolina.

55 En una realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente invención puede comprender el dominio VH y el dominio VL de una secuencia de polipéptido lineal.

En otra realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente invención pueden comprender el dominio VH y el dominio VL, en cada caso en una secuencia polipeptídica separada. En esta realización, puede ser preferente que la secuencia polipeptídica separada esté directa o indirectamente ensamblada (como por ejemplo por uno o más enlaces de disulfuro en la secuencia polipeptídica separada).

En otra realización, el dominio VH puede estar unido a la región CH, o un fragmento de la misma, pudiendo comprender el fragmento, por ejemplo, al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 320 o más aminoácidos de una región CH, o una variante de la región CH o un fragmento de la misma, tal como se ha descrito anteriormente. La unión puede ser una fusión directa mediante un enlace peptídico, de modo que el dominio VH y la región CH se presenten como un polipéptido único, o la unión puede ser a través de un enlazador, tal como un péptido u otro enlazador, o mediante un enlace químico directo diferente a un enlace peptídico. No existe una limitación particular sobre la región CH, aunque en una realización es una región CH humana. La técnica contiene muchos ejemplos de regiones CH humanas. Las regiones CH humanas ejemplares para usar en este contexto incluyen la SEQ ID NO: 27 y la SEQ ID NO: 28. Cuando se usa cualquiera de las regiones CH, pueden introducirse modificaciones de aminoácidos terminales (incluida la delección de, o el enmascaramiento por adición de, otro aminoácido u otro resto químico) para reducir o anular el potencial para la degradación de peptidasa.

En otra realización, el dominio VL puede estar unido a la región CL, o un fragmento puede comprender, por ejemplo, al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más aminoácidos de una región CL, o una variante de la región CL o un fragmento de la misma, tal como se ha descrito anteriormente. La unión puede ser una fusión directa mediante un enlace peptídico, de modo que el dominio VL y la región CL se presenten como un polipéptido único, o la unión puede ser a través de un enlazador, tal como un péptido u otro enlazador, o mediante un enlace químico directo diferente a un enlace peptídico. No existe una limitación particular sobre la región CL, aunque en una realización es una región CL humana. La técnica contiene muchos ejemplos de regiones CL humanas. Una región CL humana ejemplar para usar en este contexto incluye la SEQ ID NO: 29. Pueden introducirse modificaciones de aminoácidos terminales (incluida la delección de, o el enmascaramiento por adición de otro aminoácido u otro resto químico) para reducir o anular el potencial para la degradación de peptidasa de cualquier región que se use.

En otra realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente invención puede comprender un dominio VH unido a una región CH en una secuencia de polipéptido y un dominio VL unido a una región CL en otra secuencia de polipéptido separada. En la presente realización, puede ser preferente que la secuencia de polipéptido separada esté unida directa o indirectamente conjuntamente (tal como mediante uno o más enlaces disulfuros entre la secuencia de polipéptido separada).

En una realización adicional, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente invención puede comprender –

- una primera cadena pesada que comprende un primer dominio VH unido a una primera región CH,
- una primera cadena ligera que comprende un primer dominio VL unido a una primera región CL,
- una segunda cadena pesada que comprende un segundo dominio VH unido a una segunda región CH,
- una segunda cadena ligera que comprende un segundo dominio VL unido a una segunda región CL,

en la que opcionalmente, la primera cadena ligera y la primera cadena pesada están unidas directa o indirectamente entre sí (tal como mediante uno o más enlaces disulfuro entre la secuencia de polipéptidos separada) y la segunda cadena ligera y la segunda cadena pesada están unidas directa o indirectamente entre sí (tal como mediante uno o más enlaces disulfuro entre la secuencia de polipéptidos separada), y además opcionalmente, en la que la primera y la segunda cadenas pesadas están unidas directa o indirectamente entre sí (tal como mediante uno o más enlaces disulfuro entre la secuencia de polipéptido separada).

En otra realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente invención puede ser un anticuerpo monoclonal, más preferentemente un anticuerpo monoclonal humano.

El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente invención puede ser un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico.

En una realización preferida, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo aislado.

En otra realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente invención puede comprender una o más de las secuencias de aminoácidos que comprenden las secuencias de VH, VL, CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 y/o CDR6 antes descritas injertadas en un andamiaje de proteína de inmunoglobulinas usando técnicas convencionales de ingeniería de proteínas. El experto en la técnica apreciará que se dispone de diversos andamiajes proteicos para usar y que son de conocimiento generalizado en la técnica. El resultado final es la actividad de unión al antígeno conservada en un nuevo marco.

Por ejemplo, en una divulgación, los andamiajes de inmunoglobulinas pueden provenir de IgA, IgE, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM. Los andamiajes pueden provenir de una inmunoglobulina de cualquier mamífero, como por ejemplo ratones, ratas, conejos, cabras, camellos, llamas, primates. Puede ser preferente que el andamiaje de inmunoglobulina provenga de inmunoglobulinas humanas. Los fragmentos de anticuerpo según el primer aspecto de la presente invención se pueden generar por técnicas convencionales de biología molecular o por escisión de los anticuerpos purificados usando enzimas (por ejemplo pepsina o papaína) que generan estos fragmentos. Dichos fragmentos de anticuerpos según la invención están ejemplificados, aunque no a modo de limitación, por anticuerpos de cadena simple, fragmentos Fv, scFv, Fab, F(ab')₂, Fab', Fd, o scFv-Fc o diacuerpos o cualquier fragmento que pueda haber sido estabilizado, por ejemplo, por PEGilación.

- Un segundo aspecto de la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo según el primer aspecto de la invención y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Opcionalmente, los únicos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos presentes en la composición son los del primer aspecto de la presente invención. Más preferentemente, puede haber un solo tipo de anticuerpo o fragmento de anticuerpo presente en la composición, por ejemplo en el que el tipo se determina con respecto a la secuencia de aminoácidos, el peso molecular y/o la especificidad de unión a la fosforilcolina. En este aspecto, el experto apreciará que puede haber algunos niveles de variación bajos en las secuencias de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de cualquier población debido, por ejemplo, a la variación y/o degradación parcial N-terminal; en consecuencia, en el presente contexto, se puede decir que una composición contiene un único tipo de anticuerpo o fragmento de anticuerpo si, por ejemplo, al menos aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o sustancialmente el 100 % en peso del nivel detectable de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos en la composición son de un único tipo según se determina con respecto a la secuencia de aminoácidos, el peso molecular y/o la especificidad de unión a fosforilcolina.
- Un tercer aspecto de la presente invención proporciona un anticuerpo o fragmento de anticuerpo según el primer aspecto de la presente invención o una composición farmacéutica según el segundo aspecto de la presente invención para usar en medicina, como por ejemplo para usar en un procedimiento de tratamiento, cirugía o diagnóstico que se realiza en el cuerpo de un ser humano o un animal o en una muestra *ex vivo* del mismo.
- Por ejemplo, el tercer aspecto de la presente invención proporciona un anticuerpo o fragmento de anticuerpo según el primer aspecto de la presente invención o una composición farmacéutica según el segundo aspecto de la presente invención, para su uso en la prevención, profilaxis y/o tratamiento de mamíferos, incluyendo seres humanos, contra la aterosclerosis, una enfermedad relacionada con la aterosclerosis o una enfermedad cardiovascular.
- En otras palabras, el tercer aspecto de la presente invención proporciona el uso de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo según el primer aspecto de la presente invención o una composición farmacéutica según el segundo aspecto de la presente invención, en la elaboración de un medicamento para la prevención, profilaxis y/o tratamiento de mamíferos, incluyendo seres humanos, contra la aterosclerosis, una enfermedad relacionada con la aterosclerosis o una enfermedad cardiovascular.
- También se desvela un procedimiento para la prevención, profilaxis y/o tratamiento de un mamífero, incluyendo un ser humano, contra la aterosclerosis, una enfermedad relacionada con la aterosclerosis o una enfermedad cardiovascular, comprendiendo el procedimiento la etapa de administrar al mamífero un anticuerpo o fragmento de anticuerpo según el primer aspecto de la invención o una composición farmacéutica según el segundo aspecto de la invención.
- También se desvela en el presente documento un anticuerpo o fragmento de anticuerpo según el primer aspecto de la presente invención o una composición farmacéutica según el segundo aspecto de la presente invención, para su uso en la profilaxis, prevención y/o tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.
- En otras palabras, en el presente documento también se desvela el uso de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo según el primer aspecto de la presente invención o una composición farmacéutica según el segundo aspecto de la presente invención, en la elaboración de un medicamento para la profilaxis, prevención y/o tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. También se proporciona un procedimiento para la inmunización y profilaxis, prevención y/o tratamiento de un sujeto contra la enfermedad de Alzheimer, comprendiendo el procedimiento la etapa de administrar al sujeto un anticuerpo o fragmento de anticuerpo según el primer aspecto de la invención o una composición farmacéutica según el segundo aspecto de la invención.
- También se desvela en el presente documento un anticuerpo o fragmento de anticuerpo según el primer aspecto de la presente invención o una composición farmacéutica según el segundo aspecto de la presente invención, para su uso en la inmunización o profilaxis contra una enfermedad metabólica en mamífero, incluyendo seres humanos, o la prevención o tratamiento de la misma.
- En otras palabras, en el presente documento se desvela el uso de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo según el primer aspecto de la presente invención o una composición farmacéutica según el segundo aspecto de la presente invención, en la elaboración de un medicamento para la prevención o tratamiento de las enfermedades metabólicas en mamíferos, incluyendo seres humanos.
- También se desvela un procedimiento para la inmunización o profilaxis contra las enfermedades metabólicas o el tratamiento de las mismas en un mamífero tal como un ser humano, comprendiendo el procedimiento la etapa de administrar al mamífero un anticuerpo o fragmento de anticuerpo según el primer aspecto de la presente invención o una composición farmacéutica según el segundo aspecto de la presente invención.
- La enfermedad metabólica que se ha de abordar y/o tratar de acuerdo con la divulgación puede ser, por ejemplo, una afección seleccionada del grupo que consiste en el síndrome metabólico, resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa, hiperglucemia, diabetes tipo I, diabetes tipo II, hiperlipidemia, hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, dislipidemia y síndrome de ovario poliquístico (PCOS).
- Un cuarto aspecto de la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico que comprende una

secuencia que codifica un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo según el primer aspecto de la invención. La molécula de ácido nucleico puede ser, por ejemplo, de ADN o ARN. La molécula de ácido nucleico puede comprender una secuencia adicional 5' y/o 3' con respecto a la secuencia que codifica el anticuerpo o fragmento de anticuerpo o parte del mismo según el primer aspecto de la invención. Esas secuencias 5' y 3' pueden incluir secuencias reguladoras de la transcripción y/o de la traducción, tales como secuencias promotoras y/o terminadoras que son bien conocidas en la técnica y se pueden seleccionar, por ejemplo, de manera que sean funcionales en una célula hospedadora de elección. En consecuencia, la molécula de ácido nucleico puede comprender un casete de expresión que, después de la transformación en una célula hospedadora de elección, puede ser expresado por los sistemas de transcripción y/o traducción de la célula hospedadora para dar lugar a la producción del anticuerpo codificado o un fragmento de anticuerpo o cadena polipeptídica que forma parte del anticuerpo o un fragmento de anticuerpo según el primer aspecto de la invención.

Un quinto aspecto de la presente invención proporciona un vector o plásmido que comprende una o más secuencias de ácido nucleico según el cuarto aspecto de la invención. Cuando el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende más de una cadena polipeptídica, el vector o plásmido puede comprender, por ejemplo, una secuencia codificante de ácido nucleico que codifica cada cadena polipeptídica, de tal manera que una célula hospedadora transformada con el vector o plásmido pueda expresar todas las cadenas polipeptídicas presentes en el anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

En consecuencia, también se desvela el uso de un vector o plásmido en la transformación de una célula hospedadora. Los procedimientos para transformar células hospedadoras con vectores o plásmidos son muy conocidos en la técnica. El aporte a la selección de células huésped transformadas, el vector o plásmido puede comprender un marcador seleccionable.

Un sexto aspecto de la presente invención proporciona una célula hospedadora que comprende uno o más vectores o plásmidos según el quinto aspecto de la invención. El sexto aspecto también se refiere al cultivo de células que comprenden dichos uno o más vectores o plásmidos según el quinto aspecto de la invención, como por ejemplo el monocultivo en el cual la totalidad o sustancialmente la totalidad de las células comprenden el mismo uno o más vectores o plásmidos según el quinto aspecto de la invención. Esos monocultivos se pueden obtener, por ejemplo, seleccionando las células para detectar la presencia de uno o más marcadores seleccionables en dichos uno o más plásmidos o vectores y, opcionalmente, manteniendo la presión selectiva durante el desarrollo de la célula seleccionada en el cultivo.

Cuando el anticuerpo o fragmento de anticuerpo según el primer aspecto de la presente invención comprende más de una cadena polipeptídica, la célula hospedadora puede ser transformada con un único vector o plásmido que comprende una secuencia codificante de ácido nucleico que codifica cada cadena polipeptídica, de tal manera que una célula hospedadora transformada con el vector o plásmido pueda expresar todas las cadenas de polipéptidos presentes en el anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

Como alternativa adicional, cuando el anticuerpo o fragmento de anticuerpo según el primer aspecto de la presente invención comprende más de una cadena polipeptídica, se pueden transformar múltiples células hospedadoras con un vector o plásmido que comprende cada uno de los cuales una secuencia codificante de ácido nucleico diferente que codifica una o más miembros diferentes de las diferentes cadenas de polipéptidos que forman el anticuerpo o el fragmento del anticuerpo, y cada una de las diferentes células hospedadoras cultivadas por separado para expresar cada cadena de polipéptidos. Las diferentes cadenas polipeptídicas recuperadas se pueden combinar después para producir el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo.

Se puede usar cualquier célula hospedadora adecuada en el quinto y/o sexto aspecto de la invención. Por ejemplo, la célula hospedadora puede ser una célula procariota tal como una célula de *Escherichia coli*. La célula hospedadora puede ser una célula eucariota tal como una célula animal, una célula vegetal y una célula fúngica. Las células animales adecuadas pueden incluir células de mamíferos, células de aves y células de insectos. Las células de mamíferos adecuadas pueden incluir células CHO y células COS. Las células fúngicas adecuadas pueden incluir células de levadura tales como células de *Saccharomyces cerevisiae*. Las células de mamíferos pueden o no incluir células humanas, y pueden o no incluir células embrionarias.

Un séptimo aspecto de la presente invención proporciona un procedimiento para producir una secuencia de unión al antígeno de un anticuerpo o de un fragmento de anticuerpo según el primer aspecto de la presente invención, que comprende cultivar una o más células hospedadoras transformadas según lo descrito anteriormente y recuperar del cultivo un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo según el primer aspecto de la presente invención.

Un octavo aspecto de la presente invención proporciona un procedimiento para la preparación de una variante del anticuerpo o fragmento de anticuerpo del primer aspecto de la presente invención, variante que conserva la capacidad de unirse a fosforilcolina y/o a un conjugado de fosforilcolina, comprendiendo el procedimiento:

- (i) proporcionar un ácido nucleico según el cuarto aspecto de la presente invención que codifica un anticuerpo o fragmento de anticuerpo parental o una cadena polipeptídica que forma parte del mismo;
- (ii) introducir una o más mutaciones de nucleótidos (opcionalmente, hasta 50, 40, 30, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 mutaciones de nucleótidos), en las regiones codificantes de aminoácidos de la secuencia de ácido nucleico, opcionalmente dentro de las regiones que codifican los dominios VH y/o VL, de tal manera que el ácido nucleico mutado codifique un anticuerpo o fragmento de anticuerpo variante que tiene una secuencia de

aminoácidos diferente en comparación con el anticuerpo o fragmento de anticuerpo parental;

(iii) expresar el anticuerpo o fragmento de anticuerpo variante o una cadena polipeptídica que forma parte del mismo, que es codificada por la secuencia de ácido nucleico mutada y

(iv) comparar la capacidad del anticuerpo o fragmento de anticuerpo variante para unirse a fosforilcolina y/o un conjugado de fosforilcolina.

Según el octavo aspecto de la presente invención, se pueden introducir mutaciones de nucleótidos en las regiones codificantes de aminoácidos de la secuencia de ácido nucleico en forma aleatoria o de manera dirigida al sitio. Dichas mutaciones pueden dar lugar a que la región codificante codifique una secuencia de aminoácidos que contiene una o más adiciones de aminoácidos, una o más deleciones de aminoácidos y/o una o más sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos codificada por el ácido nucleico con anterioridad a la mutación.

Dichas mutaciones de nucleótidos pueden o no dar lugar a que la región codificante codifique una secuencia de aminoácidos que contiene una o más variaciones de secuencia en la región de unión al antígeno. Dichas mutaciones de nucleótidos pueden dar lugar, por ejemplo, a una variación de secuencia de aminoácidos (es decir, una o más adiciones de aminoácidos, una o más deleciones de aminoácidos y/o una o más sustituciones de aminoácidos) presente en, o exclusivamente en, la secuencia de aminoácidos que forma una o más de las regiones marco. Adicionalmente o como alternativa, dichas mutaciones de nucleótidos pueden dar lugar, por ejemplo, a una variación de secuencia de aminoácidos (es decir, una o más adiciones de aminoácidos, una o más deleciones de aminoácidos y/o una o más sustituciones de aminoácidos) presente en, o exclusivamente en, la secuencia de aminoácidos que forma una o más de las regiones determinantes de la complementariedad. Los niveles de variaciones/modificaciones de aminoácidos toleradas con respecto a las regiones de marco, CDR y/o dominios VH o dominio VL en su totalidad son los citados anteriormente con respecto al primer aspecto de la presente invención y se los puede aplicar, con los cambios que correspondan, al nivel de variación/modificación que se puede introducir según el procedimiento según el octavo aspecto de la presente invención.

Adicionalmente o como alternativa, dichas mutaciones de nucleótidos pueden o no dar lugar a que la región codificante codifique una secuencia de aminoácidos que contiene una o más variaciones de secuencia en una o más partes del anticuerpo o fragmento de anticuerpo que no sea la región de unión al antígeno, como en una o más de las regiones CH1, CH2, CH3, CL u otras regiones.

Cuando una o más mutaciones de nucleótidos dan lugar a una o más sustituciones de aminoácidos en el producto codificado, luego cada una de dichas una o más sustituciones puede ser, independientemente, una sustitución conservativa o no conservativa. La expresión "sustituciones conservativas" pretende indicar combinaciones tales como Gly, Ala; Val, Ile, Leu; Asp, Glu; Asn, Gln; Ser, Thr; Lys, Arg; y Phe, Tyr.

Las mutaciones de nucleótidos se pueden introducir, por ejemplo, para que la secuencia de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos codificados sean más aproximadas a las secuencias de la línea germinal, para mejorar la estabilidad del anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende la región (o regiones) variante de unión al antígeno, para reducir la inmunogenicidad del anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende la región (o regiones) variante de unión al antígeno, y/o para anular o reducir las propiedades que pudieran ser desventajosas en el procedimiento de elaboración.

Dichas mutaciones de nucleótidos se pueden realizar usando procedimientos bien conocidos en la técnica.

De acuerdo con el octavo aspecto de la presente invención, la etapa de evaluar la capacidad de la variante de anticuerpo o fragmento de anticuerpo para unirse a la fosforilcolina y/o a un conjugado de fosforilcolina puede comprender además la selección de las variantes que tienen una capacidad sustancialmente igual o incrementada para unirse a la fosforilcolina y/o un conjugado de fosforilcolina en comparación con el parental.

La capacidad de las variantes y los parentales para unirse a la fosforilcolina y/o un conjugado de fosforilcolina puede ser evaluada por procedimientos tales como los descritos anteriormente con respecto al primer aspecto de la presente invención.

El procedimiento del octavo aspecto de la presente invención puede además comprender opcionalmente la recuperación de una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico mutada que codifica la variante de anticuerpo o el fragmento de anticuerpo, y opcionalmente la transformación de una célula hospedadora con una composición que comprende la molécula de ácido nucleico recuperada y además, opcionalmente, la expresión de la variante del anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la célula hospedadora y también opcionalmente la recuperación de la variante del anticuerpo o fragmento de anticuerpo así expresado de la célula hospedadora, y a su vez opcionalmente, la formulación de la variante del anticuerpo o fragmento de anticuerpo recuperado de una composición farmacéuticamente aceptable.

También se desvela en el presente documento una variante de anticuerpo o fragmento de anticuerpo obtenida o que se puede obtener por el procedimiento según el octavo aspecto de la invención o una farmacéuticamente aceptable obtenida o que se puede obtener por el procedimiento según el octavo aspecto de la invención, para su uso en medicina.

También se desvela en el presente documento una variante de anticuerpo o fragmento de anticuerpo obtenida o que se puede obtener por el procedimiento según el octavo aspecto de la invención o una farmacéuticamente aceptable obtenida o que se puede obtener por el procedimiento según el octavo aspecto de la invención, para su uso en -

- 5 (i) la prevención, la profilaxis y/o el tratamiento de mamíferos, incluyendo seres humanos, contra la aterosclerosis, una enfermedad relacionada con la aterosclerosis o una enfermedad cardiovascular;
 (ii) en la profilaxis, la prevención y/o el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer;
 y/o
 (iii) en la inmunización o la profilaxis contra, o la prevención o el tratamiento de las enfermedades metabólicas en mamíferos, incluyendo seres humanos.

- 10 En otras palabras, también se desvela en el presente documento el uso de una variante de anticuerpo o fragmento de anticuerpo obtenida o que se puede obtener por el procedimiento del octavo aspecto de la invención o el uso de una farmacéuticamente aceptable obtenida o que se puede obtener mediante el procedimiento según el octavo aspecto de la invención, en la elaboración de un medicamento para -

- 15 (i) la prevención, la profilaxis y/o el tratamiento de mamíferos, incluyendo seres humanos, contra la aterosclerosis, un trastorno relacionado con la aterosclerosis o una enfermedad cardiovascular;
 (ii) en la profilaxis, la prevención y/o el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer; y/o
 (iii) en la inmunización o la profilaxis contra, o la prevención o el tratamiento de las enfermedades metabólicas en mamíferos, incluyendo seres humanos.

En consecuencia, también se desvela en el presente documento un procedimiento para -

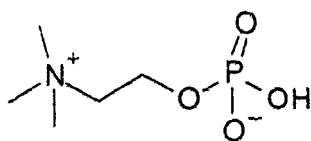
- 20 (i) la prevención, la profilaxis y/o el tratamiento de un mamífero, incluyendo un ser humano, contra la aterosclerosis, un trastorno relacionado con la aterosclerosis o una enfermedad cardiovascular,
 (ii) la inmunización y la profilaxis, la prevención y/o el tratamiento de un sujeto contra la enfermedad de Alzheimer; y/o
 25 (iii) la inmunización o la profilaxis contra las enfermedades metabólicas o la prevención o tratamiento de las mismas en mamíferos, incluyendo seres humanos,

comprendiendo el procedimiento la etapa de administrar al mamífero o sujeto una variante de anticuerpo o fragmento de anticuerpo obtenida o que se puede obtener por el procedimiento según el octavo aspecto de la invención o el uso de una farmacéuticamente aceptable obtenida o que se puede obtener por el procedimiento según el octavo aspecto de la invención.

- 30 La enfermedad metabólica que se ha de abordar y/o tratar de acuerdo con el octavo aspecto de la presente invención puede ser, por ejemplo, una afección seleccionada del grupo que consiste en síndrome metabólico, resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa, hiperglucemia, diabetes tipo I, diabetes tipo II, hiperlipidemia, hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, dislipidemia y síndrome de ovario poliquístico (PCOS).

Fosforilcolina

- 35 Por fosforilcolina (PC) se refiere a la fosforilcolina según la fórmula:



Por un conjugado de fosforilcolina se refiere a un resto de fosforilcolina unido a un vehículo, preferentemente por medio de un espaciador. El resto de fosforilcolina puede estar unido en forma covalente o no covalente al vehículo. Preferentemente, el resto fosforilcolina está unido al vehículo por el grupo fosfato.

- 40 El vehículo puede ser, por ejemplo, una proteína, un carbohidrato, un polímero, perlas de látex o un metal coloide.

El conjugado de fosforilcolina puede ser, por ejemplo, un conjugado proteína-PC, tal como un conjugado albúmina sérica humana (HSA)-PC, un conjugado transferrina-PC, un conjugado hemocianina de lapa californiana (KLH)-PC o un conjugado albúmina sérica bovina (BSA)-PC.

- 45 Cuando el conjugado de PC comprende PC unida a un vehículo por medio de un espaciador, entonces se puede usar cualquier espaciador adecuado. Los ejemplos no limitantes de espaciadores incluyen agentes de acoplamiento (por lo general, compuestos bifuncionales), tales como ácidos dicarboxílicos como el ácido succínico y glutárico, los correspondientes dialdehídos, diaminas tales como 1,6 diaminohexano, fenoles disustituidos tales como p-amino-fenol, p-diazo-fenol, p-fenilendiamina, p-benzoquinona y similares.

Enfermedad cardiovascular

La expresión enfermedades cardiovasculares pretende incluir, pero sin limitación, aterosclerosis, síndrome coronario agudo, infarto agudo de miocardio, infarto de miocardio (ataque cardíaco), angina de pecho estable e inestable, aneurismas, enfermedad arterial coronaria (CAD), enfermedad isquémica cardíaca, miocardio isquémico, muerte cardíaca y cardíaca súbita, cardiomiopatía, insuficiencia cardíaca congestiva, insuficiencia cardíaca, estenosis, enfermedad arterial periférica (PAD), claudicación intermitente, isquemia crítica de miembros y apoplejía.

El tratamiento o prevención de las enfermedades cardiovasculares usando anticuerpos con reactividad hacia la fosforilcolina y los conjugados de fosforilcolina se ha descrito, por ejemplo, en los documentos WO 2005/100405 y US 2007-0286868.

10 Enfermedad de Alzheimer

De acuerdo con la presente invención, se pueden usar los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos según el primer aspecto para tratar o prevenir la enfermedad de Alzheimer en individuos que lo necesitan o están en riesgo de padecerla.

15 El documento WO 2010/003602 y la solicitud de patente de Estados Unidos N°. 61/078677 describen el tratamiento o prevención de la enfermedad de Alzheimer mediante el uso de anticuerpos con reactividad hacia la fosforilcolina y a los conjugados de fosforilcolina, y desvela además modos en los que los anticuerpos o los fragmentos de anticuerpos de acuerdo con el primer aspecto se pueden usar para tratar o prevenir la enfermedad de Alzheimer.

Enfermedades metabólicas

20 La expresión enfermedades metabólicas pretende incluir, aunque no a modo de limitación, el síndrome metabólico X, resistencia a la insulina (IRS), intolerancia a la glucosa, hiperglucemia, diabetes tipo I, diabetes tipo II, hiperlipidemia, hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, dislipidemia, síndrome de ovario poliquístico (PCOS) y enfermedades relacionadas.

25 En el documento WO 2012/010291 se trata una descripción adicional de las enfermedades metabólicas que se han de tratar con los anticuerpos con reactividad hacia la fosforilcolina y hacia conjugados de fosforilcolina, que además desvela modos adicionales en los que los anticuerpos o los fragmentos de anticuerpos de acuerdo con el primer aspecto se pueden usar para tratar o prevenir las enfermedades metabólicas.

Identidad de secuencias de aminoácidos

30 El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina de la siguiente manera. En primer lugar, se compara una secuencia de aminoácidos con, por ejemplo, la SEQ ID NO: 1 usando el programa de Secuencias BLAST 2 (BI2seq) de la versión autónoma de BLASTZ que contiene la versión BLASTN 2.0.14 y la versión de BLASTP 2.0.14. Esta versión autónoma de BLASTZ se puede obtener del sitio web del Centro Nacional de Información sobre Biotecnología del gobierno de los Estados Unidos ncbi.nlm.nih.gov. Se pueden encontrar instrucciones para el uso del programa BI2seq en el archivo "readme" que acompaña al BLASTZ. BI2seq realiza una comparación entre dos secuencias de aminoácidos usando el algoritmo BLASTP. Para comparar dos secuencias de aminoácidos, se configuran las opciones de BI2seq de la siguiente manera: se establece -i en un archivo que contiene la primera secuencia de aminoácidos que se ha de comparar (por ejemplo, C:\seq1.txt); se establece -j en un archivo que contiene la segunda secuencia de aminoácidos que se ha de comparar (por ejemplo, C:\seq2.txt); se fija -p en blastp; se establece -o con cualquier nombre de archivo deseado (por ejemplo, C:\output.txt); y todas las demás opciones se dejan con su configuración por defecto. Por ejemplo, se puede usar el siguiente comando para generar un archivo de salida que contiene una comparación entre dos secuencias de aminoácidos: C:\BI2seq -i c:\seq1.txt -j c:\seq2.txt -p blastp -o c:\output.txt. Si las dos secuencias comparadas comparten homología, entonces el archivo de salida designado ha de presentar esas regiones de homología como secuencias alineadas. Si las dos secuencias comparadas no comparten homología, entonces el archivo de salida designado no ha de presentar secuencias alineadas. Una vez alineadas, se determina el número de coincidencias contando el número de posiciones en que se presenta un nucleótido o residuo aminoácido idéntico en ambas secuencias.

40 El porcentaje de identidad se determina dividiendo el número de coincidencias entre la longitud de la secuencia expuesta en una secuencia identificada y multiplicando después el valor obtenido por 100. Por ejemplo, si se está comparando una secuencia con la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: A (en la que la longitud de la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: A es 10) y el número de coincidencias es 9, entonces la secuencia tiene un porcentaje de identidad de 90 % (es decir, $9 \div 10 * 100 = 90$) con la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: A.

Anticuerpos

La expresión "anticuerpo o fragmento de anticuerpo" al que se hace referencia en el presente documento en el ámbito de la presente invención incluye anticuerpos enteros y se hace referencia a cualquier fragmento de unión al antígeno como "región de unión al antígeno" o cadenas simples del mismo.

Un "anticuerpo" puede referirse a una proteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces de disulfuro o una porción de unión al antígeno de las mismas. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de cadena pesada (abreviada en el presente documento como VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está compuesta por tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de cadena ligera (abreviada en el presente documento como VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está compuesta por un dominio, CL.

Las regiones VH y VL se pueden subdividir a su vez en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones de marco (FR). Cada VH comprende por lo general tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino-terminal al extremo carboxilo-terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Del mismo modo, cada VL comprende por lo general tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino-terminal al extremo carboxilo-terminal en el siguiente orden: FR5, CDR4, FR6, CDR5, FR7, CDR6, FR8. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar en la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores hospedadores, incluyendo diversas células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema clásico del complemento.

La expresión "región de unión al antígeno", usada en el presente documento se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno. Se ha demostrado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo puede ser ejecutada por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro del término "región de unión al antígeno" de un anticuerpo incluyen -

- (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CLyCH1;
- (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un enlace disulfuro en la región de bisagra;
- (iii) un fragmento Fab', que es esencialmente un Fab con parte de la región bisagra;
- (iv) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1;
- (v) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un brazo único de un anticuerpo,
- (vi) un fragmento dAb que consiste en un dominio VH;
- (vii) una región determinante de la complementariedad aislada (CDR) y
- (viii) un nanocuerpo, una región variable de cadena pesada que contiene un único dominio variable y dos dominios constantes.

Además, si bien los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, pueden unirse, usando procedimientos recombinantes, mediante un enlazador sintético que permite prepararlos en forma de cadena proteica única en la que las regiones VL y VH se aparean para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena simple (scFv)). Dichos anticuerpos de cadena simple también han de considerarse incluidos en la expresión "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo.

Los diacuerpos consisten en dos polipéptidos, cada uno de los cuales comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) de la misma cadena polipeptídica (VH-VL) conectada por el enlazador peptídico. Estos fragmentos de anticuerpos se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia y los fragmentos se analizan para determinar su utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos.

Un "anticuerpo aislado", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos con diferente especificidad antigénica (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a la fosforilcolina está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a otros antígenos aparte de la fosforilcolina). Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o sustancia química.

Las expresiones "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal", tal como se usa en el presente documento, se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpos de una composición de molécula única. Una composición de anticuerpos monoclonales presenta una única especificidad de unión y afinidad por un epítipo dado.

La expresión "anticuerpo humanizado" se pretende que se refiera a anticuerpos en los que las secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, han sido injertadas en las secuencias marco humanas. Se pueden efectuar otras modificaciones de regiones marco dentro de las secuencias marco humanas.

El término "anticuerpo quimérico" se pretende que se refiera a anticuerpos en los que las secuencias de regiones variables provienen de una especie y las secuencias de las regiones constantes provienen de otra especie, como por ejemplo un anticuerpo en el que las secuencias de las regiones variables provienen de un anticuerpo de ratón y las secuencias de las regiones constantes provienen de un anticuerpo humano.

Composiciones farmacéuticas

Una composición farmacéutica de acuerdo con la invención puede comprender una proteína de unión según la invención mezclada con un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable, que se seleccionará por lo general con respecto a la vía de administración pretendida y a la práctica farmacéutica convencional. La composición se puede presentar en forma de aplicaciones de liberación inmediata, retardada o controlada. Preferentemente, la formulación es una dosis unitaria que contiene una dosis o unidad diaria, una subdosis diaria o una fracción apropiada de la misma, del ingrediente activo.

La composición farmacéutica según la invención puede o no estar destinada, y por consiguiente ser formulada de manera adecuada para la administración parenteral, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, intracerebroventricular o subcutánea o se la puede administrar mediante técnicas de infusión. Como mejor se puede usar es en forma de solución acuosa estéril que puede contener otras sustancias, por ejemplo suficientes sales o glucosa para que la solución sea isotónica con sangre o líquido cefalorraquídeo (CSF, por sus siglas en inglés). Las soluciones acuosas pueden estar tamponadas de manera adecuada (preferentemente para lograr un pH de 3 a 9) en caso de ser necesario. La preparación de formulaciones farmacéuticas adecuadas en condiciones estériles se logra fácilmente mediante técnicas farmacéuticas convencionales muy conocidas por los expertos en la técnica.

Dichas formulaciones pueden incluir soluciones estériles no acuosas para inyección, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostatos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre o CSF del receptor al que están destinadas; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las formulaciones se pueden presentar en envases de dosis unitarias o multidosis, por ejemplo ampollas y frascos ampolla sellados, y pueden ser almacenadas en estado seco por congelación (liofilizado), que solo requiere la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo agua para inyección, inmediatamente antes del uso. Se pueden preparar soluciones y suspensiones extemporáneas para inyección con polvos, gránulos y tabletas estériles del tipo descrito anteriormente.

Una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo según la invención para la administración a un paciente, tal como un paciente humano basándose en un nivel de dosificación diaria puede ser de 0,01 a 1000 mg de anticuerpo o fragmento de anticuerpo por adulto (por ejemplo, de aproximadamente 0,001 a 20 mg por kg de peso corporal del paciente, como por ejemplo de 0,01 a 10 mg/kg, por ejemplo más de 0,1 mg/kg y menos de 20, 10, 5, 4, 3 o 2 mg/kg, tal como aproximadamente 1 mg/kg), administrado en una dosis única o dividida.

En cualquier caso, el médico ha de determinar la dosis real más adecuada para cualquier paciente individual y esta varía con la edad, peso y respuesta del paciente específico. Las dosis mencionadas son ilustrativas del caso promedio. Naturalmente, puede haber casos individuales en que se justifiquen intervalos de dosificación superiores o inferiores y estos están dentro del alcance de la presente invención.

Descripción de los dibujos

Figura 1. Cálculos estimativos de afinidad de unión de un análisis de unión en equilibrio de Biacore.
 (●) M99-B05 (lote W21573) ($K_d = 160 \pm 32$ nM), (○) M99-B05 (lote W22595) ($K_d = 148 \pm 8$ nM). El panel compara estas dos preparaciones diferentes del anticuerpo.

Figura 2. Unión de IgG purificadas a PC-BSA medida por ELISA.
 (●) M4-G02 ($CE_{50} = 0,14$ nM), (○) M73-G03 ($CE_{50} = 0,91$ nM), (Δ) M99-B05 ($CE_{50} = 0,11$ nM). Los datos se ajustaron a una ecuación logística de 4 parámetros con un B_{max} global para obtener cálculos estimativos del valor de CE_{50} .

Figura 3. Inhibición de la influencia de leucocitos CD45 positivos en la medial de ratones con manguito en la arteria femoral.

Se alimentó a ratones transgénicos machos ApoE*3 Leiden con una dieta con alto contenido de colesterol y alto contenido de grasa que contenía el 1 % de colesterol y el 0,05 % de colatos para inducir la hipercolesterolemia. Al cabo de tres semanas de la dieta con alto contenido de grasa, los ratones se anestesiaron y se efectuó la disección de la arteria femoral de su entorno y se enfundó de forma holgada con un manguito de polietileno no constrictor (Portex 0,40 mm de diámetro interno, 0,80 mm de diámetro externo y 2,0 mm de longitud). Los ratones se trataron con 10 mg/kg de anticuerpos IgG anti-PC recombinantes disueltos en PBS, o con 10 mg/kg de anticuerpos IgG anti-estreptavidina A2 disueltos en PBS o solo con PBS por inyección IP el día 0. Los ratones se sacrificaron tres días después de la cirugía y se recogieron las arterias femorales con manguitos y se embebieron en parafina. Se tomaron secciones transversales en serie (5 μ m) de toda la longitud del segmento con manguito de la arteria femoral para el análisis histoquímico. * $p < 0,01$, $n=15$.

Figura 4. Inhibición del engrosamiento de la íntima en ratones con manguito en la arteria femoral.
 Se alimentó a ratones transgénicos machos ApoE*3 Leiden con una dieta con alto contenido de colesterol y alto contenido de grasa que contenía el 1 % de colesterol y el 0,05 % de colatos para inducir la hipercolesterolemia. Al cabo de tres semanas de la dieta con alto contenido de grasa, los ratones se anestesiaron y se efectuó la disección de la arteria femoral de su entorno y se enfundó de forma holgada con un manguito de polietileno no constrictor (Portex, 0,40 mm de diámetro interno, 0,80 mm de diámetro externo y 2,0 mm de longitud). Los

ratones se trataron con 10 mg/kg de anticuerpos IgG anti-PC recombinantes disueltos en PBS, o con 10 mg/kg de anticuerpos IgG anti-estreptavidina A2 disueltos en PBS o solo con PBS por inyección IP el día 0, 3, 7, y 10 después de la cirugía. Los ratones se sacrificaron 14 días después de la cirugía y se recogieron las arterias femorales con manguito y se embebieron en parafina. Se tomaron secciones transversales en serie (5 μ m) de toda la longitud del segmento con manguito de la arteria femoral para el análisis histoquímico.

A. La comparación del área de la íntima (indicada por la flecha) en los 3 paneles indica que los anticuerpos M99-B05 redujeron el engrosamiento de la íntima observado 14 días después de la lesión vascular inducida por el manguito.

B. Engrosamiento de la íntima en (μ m)², n = 10, * p < 0,05

Figura 5. Actividad de unión a PC de los mutantes M99-B05 medida usando ELISA

(●) M99-B05 (CE₅₀ = 0,28 nM), (○) X19-A01 (CE₅₀ = 0,42 nM), (▼) X19-A03 (CE₅₀ = 0,54 nM), (△) X19-A05 (CE₅₀ = 0,52 nM), (■) X19-A07 (CE₅₀ = 0,62 nM), (□) X19-A09 (CE₅₀ = 0,58 nM), (◆) X19-A11 (CE₅₀ = 0,97 nM), (◇) X19-C01 (CE₅₀ = 1,4 nM).

Figura 6. Tinción inmunohistoquímica de tejido de lesión aterosclerótica humano congelado con un anticuerpo anti-fosforilcolina.

Se adquirió comercialmente tejido de lesión aterosclerótica humano, junto con un control de tejido normal de tejidos congelados, de Biochain Human. Se incubó el tejido con 0,1 μ g/ml de IgG anti-fosforilcolina biotinilada M99-B05 toda la noche a 4°C. Se visualizó la unión del anticuerpo al tejido después de la adición de estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (HRP) y sustrato para HRP. La presencia de la unión al anticuerpo se demuestra por el color que se genera en el sustrato para HRP. No se observó unión alguna con un isotipo control (datos no mostrados).

Figura 7. Inhibición del engrosamiento de la íntima en ratones con la arteria femoral con manguito.

Se alimentó a ratones transgénicos machos ApoE*3 Leiden con una dieta con alto contenido de colesterol y alto contenido de grasa que contenía el 1 % de colesterol y el 0,05 % de colatos para inducir la hipercolesterolemia. Al cabo de tres semanas de la dieta con alto contenido de grasa, los ratones se anestesiaron y se efectuó la disección de la arteria femoral de su entorno y se enfundó de forma holgada con un manguito de polietileno no constrictor (Portex, 0,40 mm de diámetro interno, 0,80 mm de diámetro externo y 2,0 mm de longitud). Los ratones se trataron con el anticuerpo indicado y la cantidad disuelta en PBS por inyección IP el día 0, 3, 7 y 10 después de la cirugía. Los ratones se sacrificaron 14 días después de la cirugía y se recogieron las arterias femorales con manguito y se embebieron en parafina. Se tomaron secciones transversales en serie (5 μ m) de toda la longitud del segmento con manguito de la arteria femoral para el análisis histoquímico y se calculó el engrosamiento de la íntima en (μ m)², n = 10, * p < 0,05.

Ejemplos

En la medida en que los ejemplos queden fuera del alcance de las reivindicaciones, se proporcionan solo con fines ilustrativos.

Se incluyen los siguientes ejemplos con el propósito de ilustrar adicionalmente diversos aspectos de la invención. Los expertos apreciarán que las técnicas descritas en los ejemplos que siguen representan técnicas y/o composiciones que el inventor ha comprobado que dan buen resultado al poner en práctica la invención y, por consiguiente, se puede considerar que constituyen las modalidades preferidas para su práctica. Sin embargo, los expertos en la materia deben apreciar, a la luz de la presente divulgación, que se pueden efectuar numerosos cambios a las realizaciones específicas que se describen y de todas maneras obtener un resultado igual o similar..

Cribado de una biblioteca de presentación en fago

Se llevó a cabo una campaña de selección y cribado de presentación en fago para identificar los anticuerpos humanos que se unen a la PC y neutralizan la actividad proinflamatoria de la PC que llega a estar expuesta en oxLDL o células endoteliales apoptóticas en la enfermedad cardiovascular.

Se dirigió la selección de los anticuerpos anti-PC usando PC conjugada con albúmina sérica bovina (BSA) y se alternó entre rondas con PC conjugada a ferritina.

Se analizó el producto de la selección de presentación en fago como fago individual para la unión a PC-BSA por ELISA y se sometió a las coincidencias a secuenciación de ADN para identificar el número exacto de anticuerpos únicos, todos los cuales fueron convertidos de manera recombinante a IgG. En total, después de realizar las selecciones en dos bibliotecas de presentación en fago diferentes, los presentes autores identificaron y produjeron 41 IgG completamente humanas. Estos anticuerpos se identificaron después del análisis de un total de 10.660 clones diferentes de fagos por ELISA, de los cuales hubo 1.511 ELISA positivos.

Se definió un ELISA positivo por tener una señal en un blanco inmovilizado (es decir, PC-BSA) que fue al menos 3 veces mayor que la señal de fondo (placa recubierta con estreptavidina).

Después de secuenciar los 1.511 ELISA positivos y de convertir los anticuerpos de los fragmentos Fab presentados en fago en IgGs completamente humanas, se recuperaron 56 secuencias de anticuerpos diferentes que se unen a la PC, 26 de la primera biblioteca de fagémidos y 30 de la segunda biblioteca de fagos.

Reconversión, expresión y purificación de IgG

- 5 Los presentes autores describen aquí los resultados de la recuperación de 40 de los 56 anticuerpos después de la reconversión recombinante de Fab presentado en fago a la IgG de longitud completa.

Se preparó ADN para cada IgG y se transfectó en células renales humanas 293T para generar transitoriamente IgG después de una recolección de medios de 10 días. Las IgG usadas para los estudios *in vitro* se purificaron usando proteína A Sepharose (MabSelect) e intercambiando el tampón en PBS.

- 10 Se purificaron las IgG destinadas a los ensayos *in vivo* mediante proteína A Sepharose, seguida por intercambio iónico de cationes (Poros HS) con elución en gradiente. Se intercambiaron los tampones de los anticuerpos IgG destinadas a los ensayos *in vivo* con tampón para formulaciones de anticuerpos (citrato-fosfato 0,1 M, NaCl 50 mM, 0,01 % de Tween-80, 2 % de Trehalosa, pH 6,0). Se determinaron las concentraciones de anticuerpos en muestras purificadas por la absorbancia a 280 nm (1 mg/ml = 1,4 D.O.).

15 Ensayos *in vitro*

Las 40 IgG se analizaron en una serie de ensayos *in vitro* con el fin de identificar los anticuerpos con las propiedades deseadas. La Tabla 1 resume las propiedades de unión correspondientes a una selección de anticuerpos IgG anti-fosforilcolina completamente humanos.

- 20 La segunda columna (columna A) de la Tabla 1 ilustra la señal de ELISA obtenida usando solo 15,6 ng/ml de IgG agregada a PC-BSA inmovilizada en la superficie de una placa de 96 pocillos. Se estima que los anticuerpos con señales de ELISA > 1 son anticuerpos con mayor afinidad.

- 25 La tercera columna (columna B) de la Tabla 1 ilustra la señal obtenida cuando se inyectaron los anticuerpos sobre aminofenil fosforilcolina covalentemente inmovilizada en una microplaca de biosensor y se detectó la unión por resonancia de plasmón superficial usando un instrumento Biacore 3000. Cuanto más elevada era la señal de Biacore, más unión se observó.

- 30 La cuarta columna (columna C) de la Tabla 1 ilustra los resultados del ensayo para determinar la especificidad de los anticuerpos hacia la fosforilcolina, mediante el análisis para detectar la unión al aminofenol covalentemente inmovilizado, que es un enlazador usado para acoplar covalentemente la fosforilcolina a BSA o a la microplaca de biosensor. Varios de los anticuerpos se unen a la molécula de enlazador tanto o mejor que a la aminofenil fosforilcolina. No es probable que estos anticuerpos sean anticuerpos anti-fosforilcolina terapéuticamente eficaces.

- 35 La quinta columna (columna D) de la Tabla 1 resume los resultados de los ensayos de capacidad de los anticuerpos para inhibir la captación de oxLDL por los macrófagos, que es un evento temprano en la inflamación cardiovascular y lleva a la formación de células espumosas. Se realizó un seguimiento de la captación de macrófagos por citometría de flujo usando oxLDL modificada por fluorescencia en presencia o ausencia de 80 µg/ml del anticuerpo analizado. En cada experimento, se usaron como control positivo 100 µg/ml de anticuerpos policlonales IgM anti-PC purificados de afinidad. Se dividió la cantidad de oxLDL capturada por los macrófagos en presencia de los anticuerpos, realizando un seguimiento por intensidad de fluorescencia, por la fluorescencia observada en ausencia del anticuerpo y se multiplicó por 100. Así, un valor inferior a 100 indica que el anticuerpo en una concentración de 80 µg/ml fue más eficaz en la inhibición de la captación de oxLDL que el anti-PC policlonal extraído del suero humano en una concentración de 100 µg/ml. Un valor por encima de 100 indica, de forma similar, que el anticuerpo fue menos eficaz que el anti-PC policlonal.

Se observó que varios de los anticuerpos inhibían la captación de manera similar o mejor que el control policlonal anti-PC. Además, se observó que varios anticuerpos estimulaban la captación de oxLDL por los macrófagos, una propiedad que excluye a estos anticuerpos de la primera selección.

- 45 La última columna (columna E) de la Tabla 1 muestra los datos de ELISA obtenidos mediante la adición de las IgG a los pocillos de una placa de 96 pocillos que contienen oxLDL o LDL natural. En la Tabla 1 se enumera la proporción de la señal de ELISA observada para la unión a oxLDL dividida entre la observada con LDL por cada anticuerpo analizado. Es evidente que ciertos anticuerpos tienen mejor unión de oxLDL en comparación con la LDL.

Tabla 1. Resumen de las propiedades de unión de anticuerpos IgG anti-PC completamente humanos

ID de la muestra	A	B	C	D	E
M0004-B02	1,24	366,4	38,6	233,3	6,7
M0004-C02	0,11	44,8	0,2	93	1,2
M0004-G02	1,23	1028,5	15,7	nd	8,4
M0007-H10	0,49	415,8	2,7	105	0,6
M0009-A06	0,48	912,1	2,5	80,5	2,8
M0011-F05	1,56	4473,6	155,6	547,5	10,3
M0024-B01	0,26	nd	nd	nd	11,1
M0026-H05	0,03	1,6	17,8	73,7	1,4
M0027-H05	0,03	-3,3	1,4	79,3	1,1
M0028-H05	0,03	1,8	5	86	0,6
M0029-H05	0,08	nd	nd	370	0,9
M0030-H05	0,02	19,1	32,8	nd	nd
M0031-H05	0,03	-4,1	0,2	81	1
M0034-G12	0,84	462,3	14,6	78	nd
M0035-E11	0,14	41,5	2,1	68	0,5
M0039-H05	2,73	-6,4	2,1	80,4	0,7
M0042-G07	nd	-2,9	2,3	93,7	0,8
M0043-D09	1,24	172,7	2,1	1310	16,8
M0050-H09	0,22	279,1	7	71,5	Nd
M0073-G03	0,18	46,3	19,9	51,1	1,2
M0077-A11	0,26	836,3	1,3	78,4	0,7
M0086-F02	0,99	1,4	12,6	315	Nd
M0086-H01	0,41	51,2	4,9	85	1
M0086-H11	1	-1,1	0,9	74	Nd
M0097-B04	0,22	109,5	-0,5	98	1,3
M0097-B05	1,01	699,6	-3,2	80	1,1
M0099-B05	1,03	5219,3	23,3	71	1,6
M0099-D11	0,03	170,7	8,6	560	2,1
M0100-A01	1,53	7532,8	3934,7	nd	1,1
M0102-E11	0,02	1,8	-1,3	63	Nd
M0108-H03	nd	532,7	4,8	nd	1,1
M0126-A04	0,03	34,2	-8	nd	2,8

(continuación)

ID de la muestra	A	B	C	D	E
M0126-F10	nd	32,9	-1,3	nd	Nd
M0126-H08	0,03	114,3	566,1	98	Nd
M0127-A09	0,03	18,2	-8,7	160	1,6
M0127-B07	0,05	16,3	-7	67	nd
M0127-E06	nd	21,0	-4,2	nd	nd
M0127-E07	nd	15,4	-6,2	nd	1,8
M0127-F01	0,02	9,6	3,6	77	Nd
X0009-A01	0,23	198,1	2	95	1,5

Encabezados completos de las columnas
A) Unión a PC conjugado a BSA por ELISA en 15,6 ng/ml de Ab (DO)
B) Unión a aminofenil PC por Biacore (RU)
C) Unión al enlazador aminofenol por Biacore (RU)
D) Porcentaje de la captación de oxLDL por macrófagos en presencia de 80 µg/ml de Ab (a)
E) Unión a oxLDL frente a LDL por ELISA (señal de oxLDL/señal de LDL) (b)

5 a) Captación de OxLDL por los macrófagos Se investigó la captación de LDL oxidada con Cu y marcada con Dil (perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'- tetrametilindocarbocianina) (oxLDL, Intracel Corp, Estados Unidos) en macrófagos derivados de monocitos THP-1 humanos (ATCC, Estados Unidos). Se indujo la diferenciación mediante incubación con PMA 100 nM (Sigma-Aldrich) en RPMI y FCS al 10 % durante 24 h, tras lo cual se reemplazó el medio y se dejaron las células durante 48 horas más. A continuación se incubaron las células con los anticuerpos de la manera indicada a 37 °C por espacio de 50-60 min. Seguidamente, se agregaron 20 µg/ml de oxLDL y se continuó con la incubación durante 5 horas. Al final del período de incubación, se lavaron las células dos veces con PBS/BSA al 0,2 % helado y una vez con PBS. Se cosecharon las células en PBS con contenido de PFA al 2 %. Para la adquisición y análisis de los datos, se usó FACS Calibur con el programa informático Cell Quest. Por cada muestra se analizó un mínimo de 10.000 células.

10 b) OxLPL ELISA. Se aplicó un recubrimiento de hLDL (Kalen Biomedical N° de ref. 770200-4), oxLDL (Kalen Biomedical N° de ref. 770252-7) (datos no mostrados) en una concentración de 10 µg/ml y un volumen de 100 µl/pocillo en una placa de ELISA (Immulon 2HB) toda la noche a 4 °C. Se bloquearon las placas con una solución de BSA al 1 % (300 µl/pocillo) 2 horas a temperatura ambiente. Después del lavado, se incubó la placa con los anticuerpos indicados (100 µl/pocillo; 25-100 nM) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se agregó un anticuerpo secundario de cabra anti-humano conjugado con AP (ThermoScientific N° de ref. 31316) en una dilución de 1:5000 a la placa lavada a razón de 100 µl/pocillo y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Se agregó reactivo de detección (ThermoScientific N° de ref. 37621) (100 µl/pocillo) e inmediatamente se leyó la placa en el modo cinético a 405 nm con la temperatura a 30°C. Los resultados se exponen en términos de DO_{oxLDL}/DO_{LDL} .

Análisis de la afinidad de IgG anti-PC por la PC por SPR

25 Se cribaron las IgG para la unión a PC usando el biosensor de resonancia de plasmón superficial (SPR) de Biacore. Se acopló aminofenil fosforilcolina (Biosearch Technologies) por medio del grupo amina libre a una celda de flujo de una microplaca CM5 a una densidad de 120 RU. Se acopló otro enlazador de aminofenol a otra celda de flujo de la misma microplaca CM5 a una densidad de aproximadamente 120 RU. También se acoplaron PC-KLH y PC-BSA a celdas de flujo separadas de una microplaca CM5.

30 Usando estas superficies con PC inmovilizada en diferentes contextos, los anticuerpos fueron inyectados en una concentración de 100 nM a 50 µl/min y se obtuvieron sensogramas de unión. Se investigó la afinidad de M99-B05 mediante el flujo de diferentes concentraciones del anticuerpo sobre la superficie a 50 µl/min. Hacia este antígeno inmovilizado los anticuerpos presentan una velocidad rápida en estado activo (on) y rápida en estado inactivo (off), lo que nos impidió obtener cálculos estimativos confiables de k_{on} y k_{off} con los sensogramas cinéticos.

35 Se representó la señal observada por cada concentración de anticuerpo cerca del final de la inyección frente a la concentración de anticuerpo y se ajustaron los datos a una ecuación hiperbólica de unión en equilibrio standard (Figura 1), Como se aprecia en la Figura 1, M99-B05 parece unirse a la aminofenil PC con una K_d aparente de aproximadamente 150 nM. Ambas preparaciones analizadas tuvieron valores de K_d equivalentes aunque la R_{max}

(la respuesta máxima) difiere. Los valores de Kd aparentes observados por cada anticuerpo sobre esta superficie pueden o no representar la afinidad observada sobre sustratos más fisiológicos.

Análisis de detección por ELISA de IgG Anti-PC

5 También se analizaron las IgG purificadas para detectar la unión a PC usando un ELISA con PC-BSA. Estos datos fueron ajustados para obtener valores estimativos de CE₅₀ (Figura 2).

Inhibición de la liberación de MCP1 inducida por oxLDL de los monocitos

10 Se analizaron varios de los anticuerpos para determinar su capacidad para bloquear la liberación de la quimiocina MCP-1 de las células endoteliales en respuesta a la estimulación con oxLDL. Como se expone en la Tabla 2, M99-B05 fue muy eficaz para bloquear la liberación de MCP-1 inducida por oxLDL. Este anticuerpo inhibió con potencia la liberación de MCP-1 con una CI₅₀ en el intervalo de nM.

MCP-1 es una potente quimiocina proinflamatoria que promueve el flujo de leucocitos en el sitio de una lesión aterosclerótica (Reape y Groot. 1999. *Chemokines y atherosclerosis*. *Atherosclerosis* 147, 213-225). El control de IgG anti-estreptavidina A2 como control negativo no presentó inhibición alguna de la liberación de MCP-1 inducida por oxLDL de los monocitos (datos no mostrados).

15 **Tabla 2. Inhibición anti-PC de la secreción de MCP-1 inducida por oxLDL de monocitos humanos.**

	CI ₅₀ de M99-B05
Donante1	1,8 ±0,74 nM
Donante 2	1,3 + 0,7 nM

Se aislaron monocitos de sangre humana y se los estimuló con 2 µg/ml de oxLDL oxidada con cobre en presencia o ausencia de IgG anti-PC de 10 pM a 40 nM. Se cuantificaron los niveles de MCP-1 en el medio celular usando un kit ELISA específico para MCP-1 disponible en el mercado.

20 También se demostró que el anticuerpo (M99-B05) se unía al tejido de lesión aterosclerótica humana (Figura 6).

Ensayos in vivo

Basándose en una combinación de propiedades y funcionalidad favorables *in vitro* en ensayos *in vitro*, los anticuerpos M4-G2, M73-G03 y M99-B05 se analizaron además en un modelo de inflamación coronaria *in vivo*.

25 Este modelo de ratón midió la influencia de células inflamatorias en el tejido subendotelial (es decir, el medio) en respuesta a una lesión vascular inducida por la colocación de un manguito restrictivo alrededor de la arteria femoral expuesta (Figura 3). Resulta evidente a partir de la Figura 3 que M99-B05 redujo el flujo de leucocitos en la capa subendotelial, siendo la reducción observada estadísticamente significativa. Por el contrario, y pese a sus propiedades y funcionalidad favorables *in vitro* en ensayos *in vitro*, ninguno de M4-G2 o M73-G03 mostró reducción estadísticamente significativa alguna en comparación con el anticuerpo control (la IgG anti-estreptavidina A2 denominada "HulgG1 a-A2").

30 El efecto muy distintivo de M99-B05 en este ensayo, en comparación con M4-G2 y M73-G03, era imprevisible y fue una sorpresa para los inventores. Esto demuestra que la eficacia *in vivo* de los anticuerpos anti-PC pueden no surgir de manera previsible de los datos positivos *in vitro*.

35 En consecuencia, se analizó el M99-B05 en un modelo de restenosis vascular en ratones, en el que una vez más se indujo una lesión mediante la colocación de un manguito alrededor de la arteria femoral, aunque se la dejó progresar durante 14 días en lugar de 3 días. A continuación se analizó por inmunohistoquímica la cantidad de estenosis, observada en forma de engrosamiento de la neointima vascular en las arterias afectadas, (Figura 4). A partir de la Figura 4 es evidente que M99-B05 inhibía significativamente el engrosamiento de la pared vascular después de la lesión vascular inducida por el manguito. Esto demuestra además que M99-B05 es muy eficaz *in vivo*.

Construcción de la línea germinal y mutantes con estabilidad

Un análisis de la secuencia de aminoácidos de los dominios variables tanto de la cadena pesada como la ligera del anticuerpo M99-B05, identificó las sustituciones de aminoácidos para la construcción con el fin de reducir la posible inmunogenicidad y evitar las modificaciones de aminoácido susceptibles que puedan tener lugar durante la expresión y purificación del anticuerpo.

45 Las siguientes tablas demuestran el alineamiento de la secuencia de aminoácidos del dominio variable con su secuencia de anticuerpo de línea germinal más estrechamente relacionada, usando la base de datos de Kabat.

También se resaltan en las tablas las sustituciones de aminoácidos que realizaron en el anticuerpo para aproximarlos más a la línea germinal, además de mutantes que suprimieran los posibles sitios de desamidación, un enlace de disulfuro de HCDR3, todo lo cual puede suscitar inquietudes con respecto a la facilidad de elaboración (llamados "Mutantes con estabilidad").

5 Mutantes de M99-B05

El X19-A01 mutante tiene las mismas secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera que el M99-B05 de tipo silvestre, salvo que se ha suprimido el primer aminoácido de la cadena ligera de M99-B05 (una glutamina) en X19-A01 para coincidir mejor con la secuencia de la línea germinal.

10 La secuencia del mutante X19-A03 codifica el anticuerpo totalmente de línea germinal, con respecto a las secuencias de línea germinal de cadena pesada JH3 de VH3-23 y cadena ligera JK1 de VK4-B3, sin la inserción de una fenilalanina (F) en el marco 1 de la región variable pesada (HV-FR1), más sustituciones de aminoácidos (mutaciones de estabilidad) para reducir potencialmente la modificación de aminoácidos de la proteína durante la expresión y purificación. Se descubrió que el anticuerpo M99-B05 tenía un aminoácido F suprimido en la cola del HV-FR1 con respecto a la secuencia de la línea germinal. Insertando la F en esta posición se acerca al anticuerpo a
15 la secuencia de la línea germinal y posiblemente hay menos probabilidades de que sea inmunogénico. Se construyó el mutante X19-A03 de manera que contuviera todas las demás sustituciones de la línea germinal excepto la inserción de F en caso de que esta inserción afectase a la unión a PC. Los mutantes de estabilidad contienen una mutación G a A en la HV-CDR3 que se efectuó para alterar un posible sitio de desamidación (NG) y una sustitución de N a Q en LV-CDR1 para eliminar otro posible sitio de desamidación.

20 La secuencia del mutante X19-A05 contiene todas las sustituciones de la línea germinal, incluyendo la F insertada en la HV-FR1, además de las mutaciones de estabilidad. El anticuerpo X19-A05 es el único anticuerpo mutante generado en este ejemplo que contiene todas las sustituciones de la línea germinal y las mutaciones de estabilidad.

El mutante X19-A11 tiene la misma secuencia que X19-A01 pero tiene dos sustituciones de C a S en la HNA-CDR3 para eliminar el disulfuro cuya formación se prevé en esta región.

25 El X19-C01 es llevado a la línea germinal, sin la inserción de F y con los mutantes de estabilidad con las sustituciones C a S para eliminar el disulfuro. El anticuerpo comparable (con anterioridad a la remoción del disulfuro) es X19-A03.

Tabla 3. Optimización de la secuencia de cadena pesada de M99-B05

M99-B05	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFT-S <u>GYWM</u> HWVRQAPGKGLEWVS
X19-A01	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFT-S <u>GYWM</u> HWVRQAPGKGLEWVS
X19-A03	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFT-S <u>GYWM</u> HWVRQAPGKGLEWVS
X19-A05	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFS <u>GYWM</u> HWVRQAPGKGLEWVS
X19-A07	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFT-S <u>GYWM</u> HWVRQAPGKGLEWVS
X19-A09	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFS <u>GYWM</u> HWVRQAPGKGLEWVS
X19-A11	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFT-S <u>GYWM</u> HWVRQAPGKGLEWVS
X19-C01	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFT-S <u>GYWM</u> HWVRQAPGKGLEWVS

M99-B05	<u>YISPSGGGTHYADSVKG</u> RFRTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAR
X19-A01	<u>YISPSGGGTHYADSVKG</u> RFRTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAR
X19-A03	<u>YISPSGGGTHYADSVKG</u> RFRTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAR
X19-A05	<u>YISPSGGGTHYADSVKG</u> RFRTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAR
X19-A07	<u>YISPSGGGTHYADSVKG</u> RFRTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAR
X19-A09	<u>YISPSGGGTHYADSVKG</u> RFRTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAR
X19-A11	<u>YISPSGGGTHYADSVKG</u> RFRTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAR
X19-C01	<u>YISPSGGGTHYADSVKG</u> RFRTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAR

M99-B05	<u>VRFRSVCSNGVCRPTAYDAFDI</u> WGQGTAVTVSS SEC ID NO: 3
X19-A01	<u>VRFRSVCSNGVCRPTAYDAFDI</u> WGQGTAVTVSS SEC ID NO: 5
X19-A03	<u>VRFRSVCSNAVCRPTAYDAFDI</u> WGQGTMTVTVSS SEC ID NO: 7
X19-A05	<u>VRFRSVCSNAVCRPTAYDAFDI</u> WGQGTMTVTVSS SEC ID NO: 1
X19-A07	<u>VRFRSVCSNGVCRPTAYDAFDI</u> WGQGTMTVTVSS SEC ID NO: 9
X19-A09	<u>VRFRSVCSNGVCRPTAYDAFDI</u> WGQGTMTVTVSS SEC ID NO: 11
X19-A11	<u>VRFRSVSSNGVSRPTAYDAFDI</u> WGQGTAVTVSS SEC ID NO: 13
X19-C01	<u>VRFRSVSSNAVSRPTAYDAFDI</u> WGQGTMTVTVSS SEC ID NO: 15
***** . * . * . ***** *****	

Las mutaciones de secuencia en la línea germinal aparecen en **negrita**. Las mutaciones de restos que pueden mitigar los posibles problemas de elaboración están subrayadas. Las regiones CDR están en **recuadros**.

Tabla 4. Optimización de secuencia de cadena ligera de M99-B05

M99-B05	QDIQMTQSPDSLAVSLGERATINC	KSSQSVFYNSNKKNYLA	WYQQKAGQPPKL
X19-A01	-DIQMTQSPDSLAVSLGERATINC	KSSQSVFYNSNKKNYLA	WYQQKAGQPPKL
X19-A03	-DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC	KSSQSVFYQSNKKNYLA	WYQQKPGQPPKL
X19-A05	-DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC	KSSQSVFYQSNKKNYLA	WYQQKPGQPPKL
X19-A07	-DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC	KSSQSVFYNSNKKNYLA	WYQQKPGQPPKL
X19-A09	-DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC	KSSQSVFYNSNKKNYLA	WYQQKPGQPPKL
X19-A11	-DIQMTQSPDSLAVSLGERATINC	KSSQSVFYNSNKKNYLA	WYQQKAGQPPKL
X19-C01	-DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC	KSSQSVFYQSNKKNYLA	WYQQKPGQPPKL
** *****:*****.*****			
M99-B05	LIH WASTRES GVPDRFSGSGSGTDFTLTISN	LAEDVALYYC	QQYFNAPRTF
X19-A01	LIH WASTRES GVPDRFSGSGSGTDFTLTISN	LAEDVALYYC	QQYFNAPRTF
X19-A03	LIY WASTRES GVPDRFSGSGSGTDFTLTIS	SLQAEDEVAVYYC	QQYFNAPRTF
X19-A05	LIY WASTRES GVPDRFSGSGSGTDFTLTIS	SLQAEDEVAVYYC	QQYFNAPRTF
X19-A07	LIY WASTRES GVPDRFSGSGSGTDFTLTIS	SLQAEDEVAVYYC	QQYFNAPRTF
X19-A09	LIY WASTRES GVPDRFSGSGSGTDFTLTIS	SLQAEDEVAVYYC	QQYFNAPRTF
X19-A11	LIH WASTRES GVPDRFSGSGSGTDFTLTISN	LAEDVALYYC	QQYFNAPRTF
X19-C01	LIY WASTRES GVPDRFSGSGSGTDFTLTIS	SLQAEDEVAVYYC	QQYFNAPRTF
** *****:*****.*****			
M99-B05	GQGTKVEIK SEC ID NO: 4		
X19-A01	GQGTKVEIK SEC ID NO: 6		
X19-A03	GQGTKVEIK SEC ID NO: 8		
X19-A05	GQGTKVEIK SEC ID NO: 2		
X19-A07	GQGTKVEIK SEC ID NO: 10		
X19-A09	GQGTKVEIK SEC ID NO: 12		
X19-A11	GQGTKVEIK SEC ID NO: 14		
X19-C01	GQGTKVEIK SEC ID NO: 16		

Las mutaciones de secuencia en la línea germinal aparecen en negrita. Las mutaciones de residuos que pueden mitigar los posibles problemas de elaboración están subrayadas. Las regiones CDR están en recuadros.

- 5 Para evitar toda duda, en caso de cualquier disparidad inadvertida entre la presentación de secuencias dentro de esta solicitud, las secuencias presentadas con respecto a los Dominios VH y VL y las diversas secuencias de CDR de las Tablas 3 y 4 son las secuencias definitivas.

Unión a PC de los mutantes de M99-B05

- 10 La unión a PC de los mutantes de M99-BQ5 se evaluó por ELISA (Figura 5). De los datos de ELISA (Figura 5) resulta evidente que muchas de las mutaciones presentes en M99-B05 no afectaron significativamente a la unión a PC. Sin embargo, el reemplazo de los restos de cisteína en la Hv-CDR3 con serina (X19-A11 y X19-C01) no redujo la afinidad. Se prevé que estos residuos de cisteína formen un disulfuro y estén presentes en la secuencia de línea germinal del anticuerpo codificada por VK4-B3. Las diferencias en las señales de unión observadas se pueden

atribuir a diferencias en la cantidad de anticuerpo activo en cada preparación y/o a leves errores de medición de las concentraciones. El mutante de anticuerpo de M99-B05 que contenía el número máximo de sustituciones optimizadas de secuencia permisibles fue X19-A05. Este anticuerpo contenía todas sustituciones de estabilidad y de línea germinal, aunque conserva el disulfuro de Hv-CDR3.

5 Comparación del efecto *in vitro* de M99-B05 y X19-A05

10 M99-B05 y X19-AG5 fueron analizados en el modelo de restenosis vascular en ratones, en el cual se indujo una vez más una lesión mediante la colocación de un manguito alrededor de la arteria femoral, aunque se la dejó progresar durante 14 días en lugar de 3 días. A continuación se analizó por histoquímica la cantidad de estenosis, observada en forma de engrosamiento de la neointima del vaso en las arterias afectadas, y se calculó el engrosamiento de la íntima (Figura 7). De la Figura 7 resulta evidente que X19-A05 inhibió significativamente el engrosamiento de la pared vascular después de la lesión inducida por el manguito en un grado similar, en comparación con M99-B05. El efecto de X19-A05 también exhibió una clara relación dosis-respuesta.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo capaz de unirse a la fosforilcolina y/o a un conjugado de fosforilcolina, en el que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) y/o un dominio variable de cadena ligera (VL), y en el que:

5 (a) el dominio VH comprende una secuencia de aminoácidos que incluye tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) seleccionadas del grupo que consiste en:

una secuencia de CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 75 % o el 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 17;

10 una secuencia de CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 94 % o el 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 18 y

una secuencia de CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 95 % o el 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 19, 20, 21 o 22; y

(b) el dominio VL comprende una secuencia de aminoácidos que incluye tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) seleccionadas del grupo que consiste en:

15 una secuencia de CDR4 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 94 % o el 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 23 o 24;

una secuencia de CDR5 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 85 % o el 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 25;

20 una secuencia de CDR6 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 88 % o el 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 26,

en el que el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo se une a la aminofenil-fosforilcolina inmovilizada con una Kd de no más de 500 nM, cuando se prueba en las condiciones de resonancia de plasmón superficial usadas en los ejemplos.

2. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo según la reivindicación 1 en el que

25 la secuencia de CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17;

la secuencia de CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18; y

la secuencia de CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19, 20, 21 o 22; y

(b) la secuencia de CDR4 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23 o 24;

30 la secuencia de CDR5 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25;

la secuencia de CDR6 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26.

3. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que-

35 el dominio VH comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 o 15 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, 85 %, 90 % o el 95 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 o 15; y

el dominio VL comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 o 16 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, 85 %, 90 % o el 95 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 o 16.

40 4. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que - el dominio VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, 85 %, 90 % o el 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1, y

el dominio VL comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, 85 %, 90 % o el 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2;

45 el dominio VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o el 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3; y

el dominio VL comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o el 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 4;

50 el dominio VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o el 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5; y

el dominio VL comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o el 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 6;

el dominio VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o el 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 7; y

55 el dominio VL comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o el 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 8;

el dominio VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o el 100 %

- de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 9; y
 el dominio VL comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o el 100 %
 de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 10;
- 5 el dominio VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o el 100 %
 de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 11; y
 el dominio VL comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o el 100 %
 de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 12;
- 10 el dominio VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o el 100 %
 de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 13 y
 el dominio VL comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o el 100 %
 de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 14; o
 el dominio VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o el 100 %
 de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 15 y
- 15 el dominio VL comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o el 100 %
 de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 16.
5. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo según la reivindicación 3 o 4 en el que
 el dominio VH, el dominio VL o preferentemente tanto el dominio VH como el VL, comprenden una secuencia de
 aminoácidos que tiene el 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO indicada; o
- 20 el dominio VH, el dominio VL o tanto el dominio VH como el VL, comprenden una secuencia de aminoácidos que
 tiene menos del 100 %, aunque al menos el 90 %, 95 %, de identidad de secuencia con una o más de cada una de
 las SEQ ID NO indicadas.
6. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo humano capaz de unirse a la fosforilcolina, en el que el anticuerpo o el
 fragmento de anticuerpo comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) y un dominio variable de cadena
 ligera (VL) y en el que-
- 25 el dominio VH comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, y
 el dominio VL comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4;
 el dominio VH comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, y
 el dominio VL comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6;
- 30 el dominio VH comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y
 el dominio VL comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8;
 el dominio VH comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9, y
 el dominio VL comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10;
- 35 el dominio VH comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11, y
 el dominio VL comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12;
 el dominio VH comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13, y
 el dominio VL comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14; o
 el dominio VH comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15, y
 el dominio VL comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16.
7. El anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de la reivindicación 6 en el que el dominio VH comprende la secuencia
 de la SEQ ID NO: 1 unida a la región CH de la SEQ ID NO: 28 y el dominio VL comprende la secuencia de la SEQ
 ID NO: 2 unida a la región CL de la SEQ ID NO: 29.
8. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con
 cualquiera de las reivindicaciones anteriores y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, opcionalmente
 en el que los únicos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos presentes en la composición son los definidos
 mediante cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
- 45 9. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o una
 composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8 para su uso en medicina.
10. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o una
 composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8 para su uso en:
- 50 la prevención, la profilaxis y/o el tratamiento de mamíferos, incluyendo los seres humanos, frente a la aterosclerosis,
 una enfermedad relacionada con aterosclerosis o enfermedad cardiovascular, opcionalmente en la que la
 enfermedad cardiovascular se selecciona del grupo que consiste en aterosclerosis, síndrome coronario agudo,
 infarto agudo de miocardio, infarto de miocardio (ataque cardíaco), angina de pecho estable e inestable, aneurismas,
 enfermedad arterial coronaria (CAD), enfermedad isquémica cardíaca, miocardio isquémico, muerte cardíaca y
 cardíaca súbita, cardiomiopatía, insuficiencia cardíaca congestiva, insuficiencia cardíaca, estenosis, enfermedad
 55 arterial periférica (PAD), claudicación intermitente, isquemia crítica de miembros y apoplejía.
11. Una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de acuerdo con
 cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

12. Un vector o plásmido que comprende la secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 11.

13. Una célula hospedadora que comprende la secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 11 y/o un vector o plásmido de acuerdo con la reivindicación 12.

5 14. Un procedimiento de producción de un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 que comprende cultivar una célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 13, y recuperar de la misma un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

10 15. Un procedimiento de preparación de una variante de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, cuya variante conserva la capacidad de unión a la fosforilcolina, comprendiendo el procedimiento -

(i) proporcionar un ácido nucleico según la reivindicación 11 que codifica un anticuerpo o fragmento de anticuerpo parental;

15 (ii) introducir una o más mutaciones de nucleótidos en las regiones codificantes de aminoácidos de la secuencia de ácido nucleico, opcionalmente dentro de las regiones que codifican el o los dominios VH y/o VL, de tal manera que el ácido nucleico mutado codifique una variante de anticuerpo o fragmento de anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos diferente en comparación con el anticuerpo o fragmento de anticuerpo parental;

(iii) expresar la variante de anticuerpo o fragmento de anticuerpo variante codificado por la secuencia de ácido nucleico mutada;

20 y
(iv) comparar la capacidad de la variante de anticuerpo o fragmento de anticuerpo y el anticuerpo o fragmento de anticuerpo parental para unirse a la fosforilcolina.

Figura 1

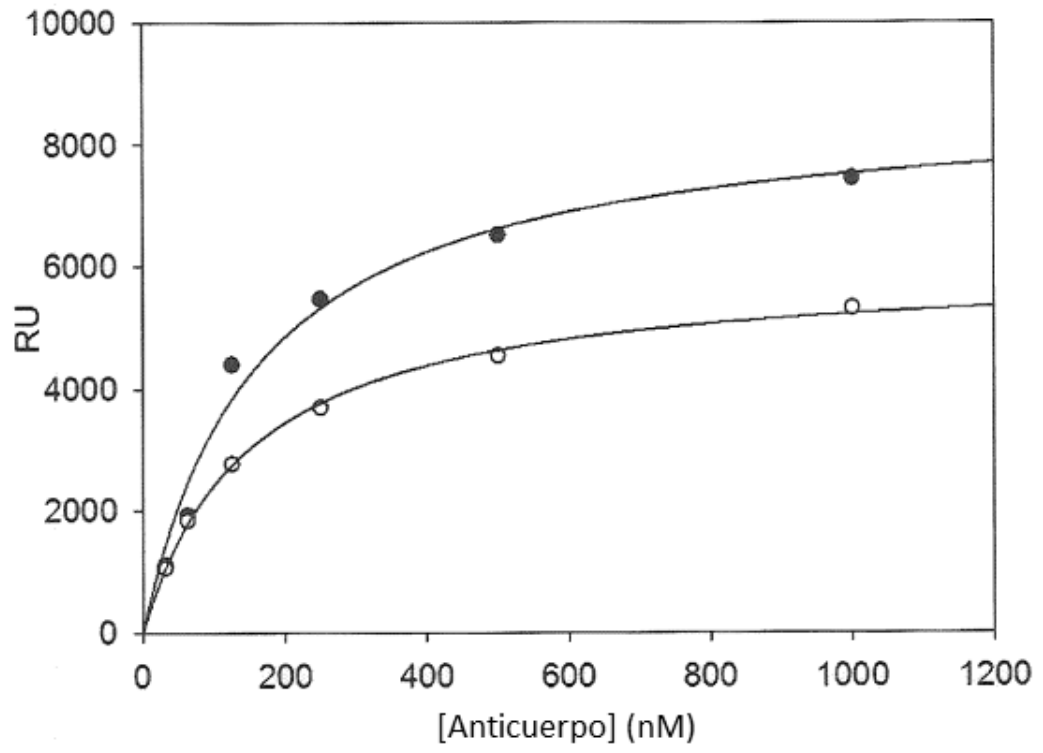


Figura 2

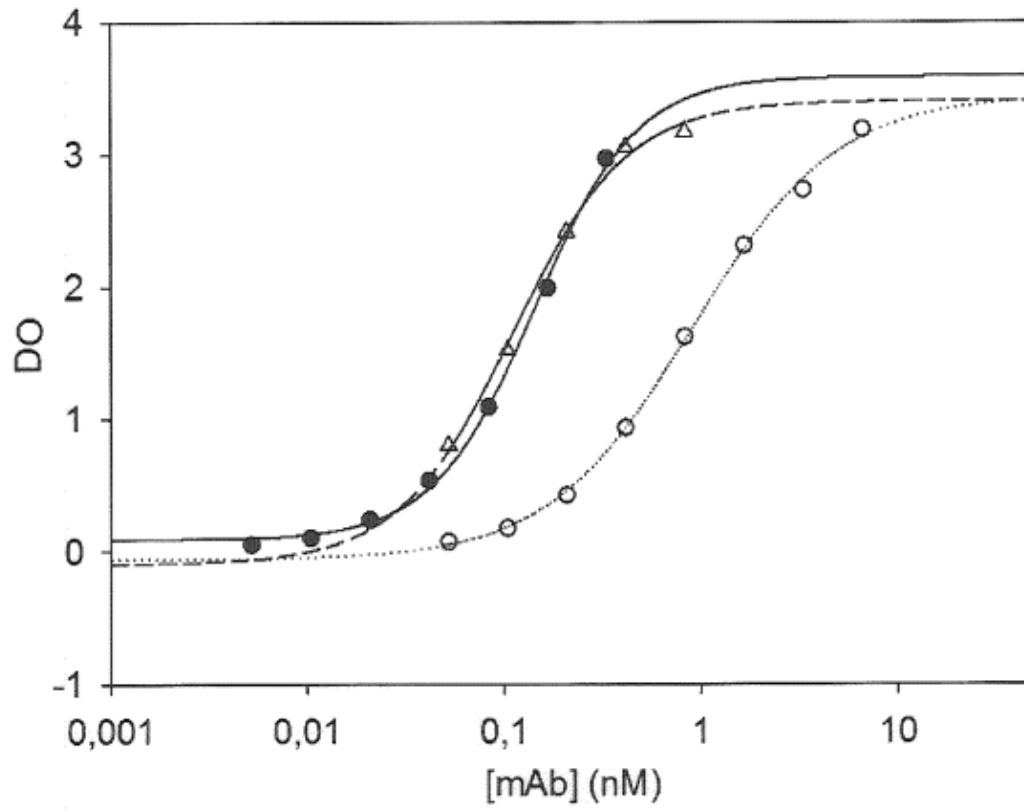


Figura 3

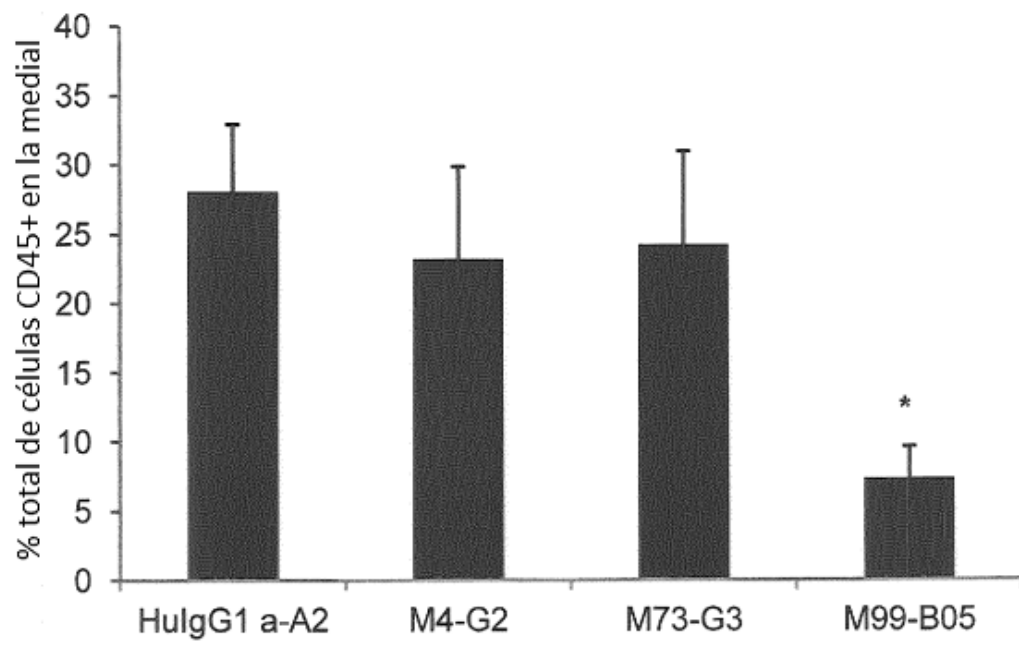


Figura 4

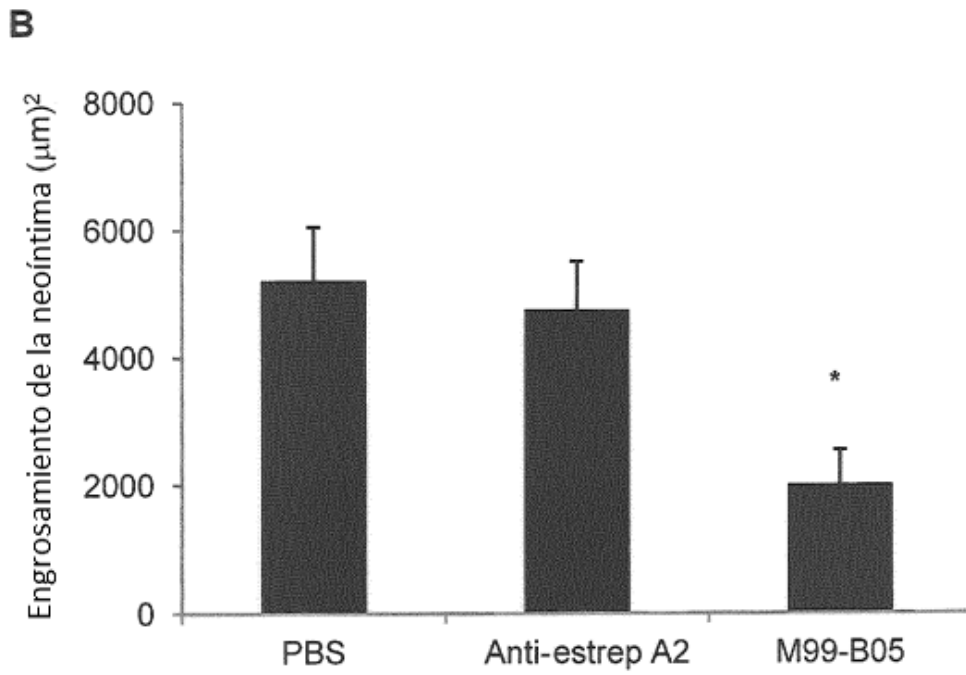
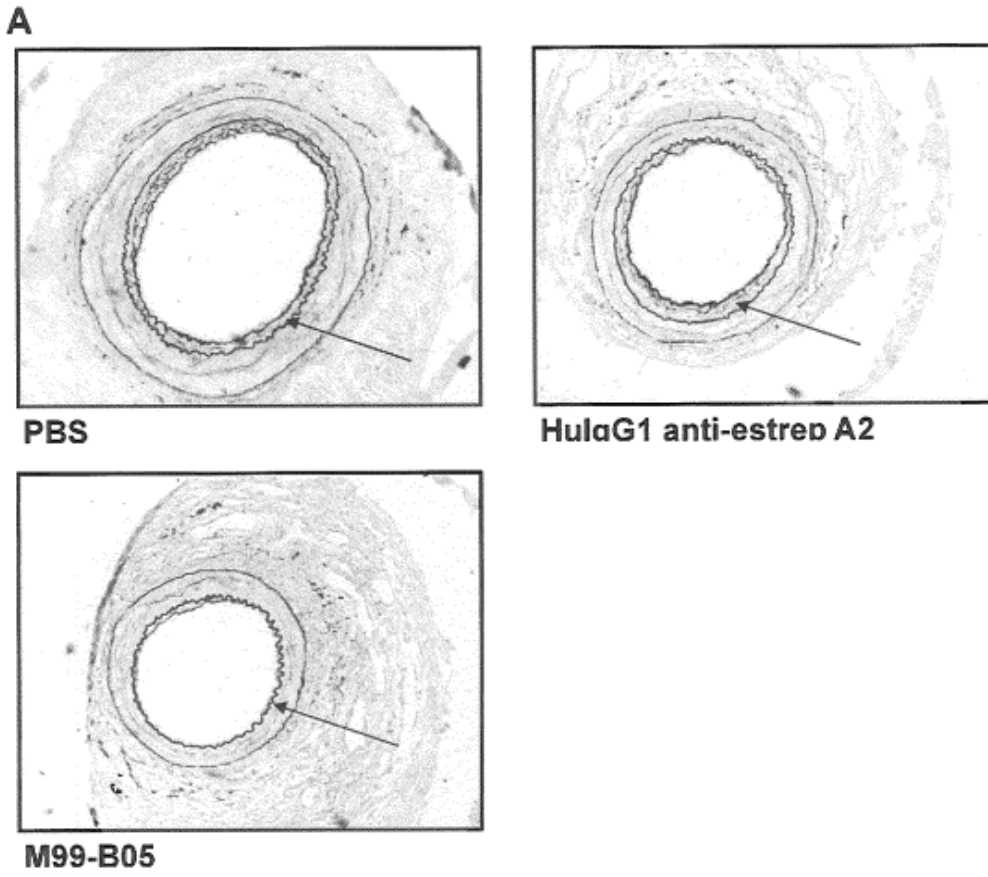


Figura 5

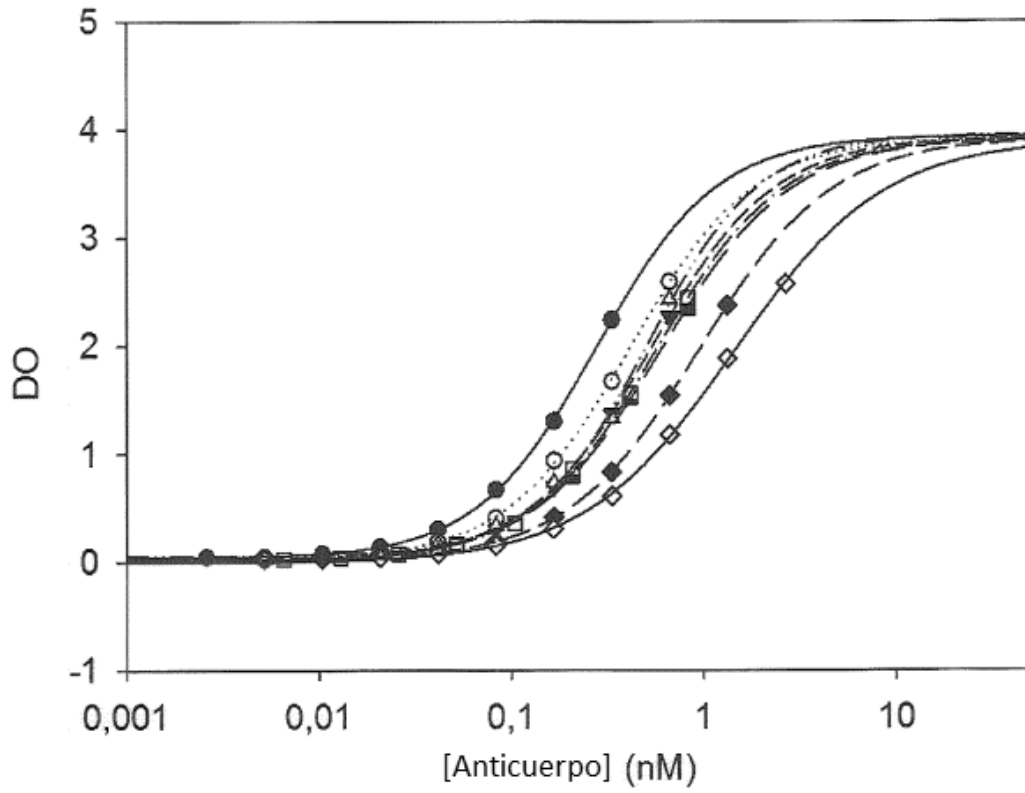
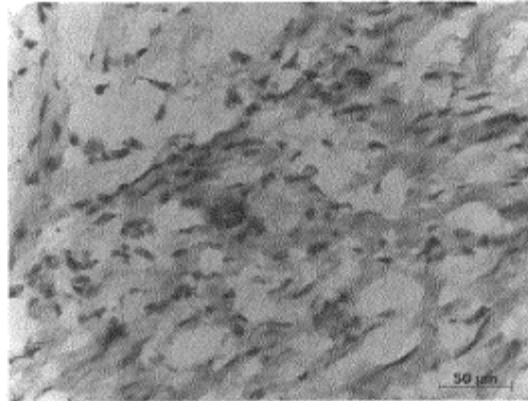


Figura 6

Normal



Patológico

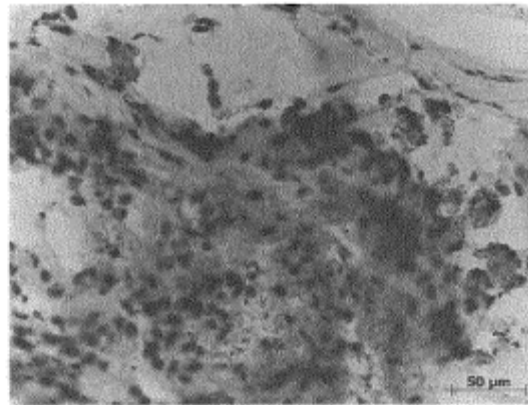


Figura 7

