

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 769 123**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.03.2014 E 18153438 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2019 EP 3348569**

54 Título: **Anticuerpos de quimiocinas PAN ELR+ CXC**

30 Prioridad:

15.03.2013 US 201361792800 P

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

24.06.2020

73 Titular/es:

**ELI LILLY AND COMPANY (100.0%)
Lilly Corporate Center
Indianapolis, IN 46285, US**

72 Inventor/es:

**BEIDLER, CATHERINE BRAUTIGAM;
KIKLY, KRISTINE KAY;
STRIFLER, BETH ANN;
WITCHER, DEREK RYAN y
BOYLES, JEFFREY STREETMAN**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 769 123 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos de quimiocinas PAN ELR⁺ CXC

La presente invención se refiere a anticuerpos contra quimiocinas CXC ELR⁺ y sus usos en el tratamiento de enfermedades en las que la patogénesis está mediada por quimiocinas CXC ELR⁺.

5 Las quimiocinas CXC ELR⁺ (así llamadas porque todos los miembros de la familia de las quimiocinas poseen un motivo de aminoácido E-L-R inmediatamente adyacente a su motivo CXC) desempeñan un papel importante en una variedad de mecanismos patógenos, incluyendo la migración de neutrófilos a sitios de inflamación y angiogénesis. Los neutrófilos contribuyen a la patogénesis de varias enfermedades inflamatorias/autoinmunes agudas y crónicas, tales como enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), psoriasis en placa y pustulosis palmoplantar. Las quimiocinas
10 CXC ELR⁺ también desempeñan un papel crítico en tumorigénesis y metástasis tumoral. Estas quimiocinas se expresan altamente en tumores. Dentro del ambiente tumoral, las quimiocinas CXC ELR⁺ están implicadas en diversas rutas, por ejemplo, angiogénesis, movilización e invasión de células endoteliales y leucocitos en sitios tumorales y proliferación y supervivencia de células tumorales.

15 Las quimiocinas se agrupan en cuatro subfamilias: CXC, CC, (X)C y CX3C. En las quimiocinas CXC, un aminoácido separa las dos primeras cisteínas ("el motivo CXC"). Las quimiocinas CXC ELR⁺ son ligandos para receptores de quimiocinas CXCR1 y/o CXCR2, que son receptores acoplados a proteína G del tipo de siete dominios transmembrana que se unen específicamente a quimiocinas CXC ELR⁺. Las siete quimiocinas CXC ELR⁺ humanas son Gro-alfa humana (también conocida como CXCL1), Gro-beta humana (también conocida como CXCL2), Gro-gamma humana (también conocida como CXCL3), ENA-78 humana (también conocida como CXCL5), GCP-2 humana (también conocida como CXCL6), NAP-2 humana (también conocida como CXCL7) e IL-8 humana (también conocida como CXCL8). Todas las quimiocinas CXC ELR⁺ se unen al receptor CXCR2; además, algunas quimiocinas CXC ELR⁺ se unen a los dos receptores CXCR1 y CXCR2 (es decir, CXCL6 y CXCL8), lo que contribuye a la redundancia en las rutas de activación.

25 Se han descrito previamente anticuerpos que se unen a quimiocinas CXC ELR⁺ individuales. Se han evaluado dos anticuerpos monoclonales contra CXCL8 (IL-8) en ensayos clínicos tempranos con eficacia en enfermedades inflamatorias. (J Mol Biol 66: 401-410; J Biol Chem 181: 669-679.) Además, el documento WO 2008/130969 desvela un anticuerpo que se une a IL-8 humana (CXCL8), Gro-alfa humana (CXCL1), Gro-beta humana (CXCL2), Gro-gamma humana (CXCL3) y ENA-78 humana (CXCL5). Sin embargo, la divulgación no demuestra que el anticuerpo se una firmemente a GCP-2 (CXCL6) y guarda silencio con respecto a la unión a NAP-2 (CXCL7).

30 Sin embargo, todavía no se ha desvelado un anticuerpo que sea capaz de unirse y neutralizar las siete quimiocinas CXC ELR⁺ humanas. La selección de una o unas pocas quimiocinas CXC ELR⁺ humanas deja abierta la oportunidad para otras quimiocinas CXC ELR⁺ para obtener múltiples funciones biológicas. La neutralización de las siete quimiocinas CXC ELR⁺ podría afectar a la capacidad de células CXCR1⁺ o CXCR2⁺ para migrar a sitios de inflamación y podría inhibir la angiogénesis. Dada la redundancia significativa en las rutas de activación del receptor
35 CXCR1 y CXCR2, existe todavía una necesidad de un anticuerpo que se una a las siete quimiocinas CXC ELR⁺ humanas con especificidad y con alta afinidad. Existe una necesidad de un anticuerpo que neutralice las siete quimiocinas CXC ELR⁺ humanas. También existe una necesidad de un anticuerpo que sea físicamente estable. Por lo tanto, es deseable proporcionar un anticuerpo septaespecífico que sea capaz de unirse y neutralizar las siete quimiocinas CXC ELR⁺ humanas y sea físicamente estable.

40 La presente divulgación proporciona un anticuerpo que neutraliza Gro-alfa, Gro-beta, Gro-gamma, ENA-78, GCP-2, NAP-2 e IL-8 humanas. La presente invención proporciona un anticuerpo que neutraliza Gro-alfa, Gro-beta, Gro-gamma, ENA-78, GCP-2, NAP-2 e IL-8 humanas, en la que el anticuerpo se une a IL-8 (SEQ ID NO: 27) en los siguientes aminoácidos: Arg 6, Ile 10, Ala 35, Ile 40. La presente invención además proporciona un anticuerpo que neutraliza Gro-alfa, Gro-beta, Gro-gamma, ENA-78, GCP-2, NAP-2 e IL-8 humanas, en la que el anticuerpo se une a
45 IL-8 (SEQ ID NO: 27) en los siguientes aminoácidos: Arg 6, Ile 10, Ala 35, Ile 40 y Leu 49.

La presente divulgación proporciona un anticuerpo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en el que el anticuerpo comprende una cadena ligera, en la que la cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (LCVR), en la que la LCVR comprende LCDR1 (RASQSISSLNLH (SEQ ID NO: 7)), LCDR2 (YTSRSVS (SEQ ID NO: 8)) y LCDR3 (GQNNEWPEV (SEQ ID NO: 9)), y una cadena pesada, en la que la cadena pesada
50 comprende una región variable de cadena pesada (HCVR), en el que la HCVR comprende HCDR1 (GYEFTSYWIH (SEQ ID NO: 10)), HCDR2 (NISPNSGSANYNEKFKS (SEQ ID NO: 11)) y HCDR3 (EGPYSYPSREYYGSDL (SEQ ID NO: 12)).

55 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un anticuerpo en el que la secuencia de aminoácidos de la HCVR es la SEQ ID NO: 2. La presente divulgación proporciona además un anticuerpo en el que la secuencia de aminoácidos de la LCVR es la SEQ ID NO: 4.

La presente divulgación proporciona un anticuerpo en el que la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada es la SEQ ID NO: 1. La presente divulgación también proporciona un anticuerpo en el que la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera es la SEQ ID NO: 3.

La presente divulgación también proporciona una molécula de ADN que comprende una primera secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o 13; y que comprende una segunda secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3 o 15.

- 5 La presente divulgación proporciona una célula de mamífero que comprende las moléculas de ADN descritas anteriormente, en la que la célula es capaz de expresar un anticuerpo que comprende una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o 13 y una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 o 15. Las células hospedadoras de mamífero conocidas por ser capaces de expresar inmunoglobulinas funcionales incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), células COS y células NS0. Las células hospedadoras preferentes para su uso en la invención son células NS0.

La presente divulgación proporciona además un procedimiento para producir un anticuerpo que comprende una cadena ligera cuya secuencia de aminoácidos es la SEQ ID NO: 3 o 15 y una cadena pesada cuya secuencia de aminoácidos es la SEQ ID NO: 1 o 13, que comprende cultivar una célula de mamífero descrita anteriormente en condiciones tales que el anticuerpo se exprese, y recuperar el anticuerpo expresado.

- 15 La presente divulgación proporciona un procedimiento para tratar colitis ulcerosa, cáncer renal y cáncer de ovario, que comprende la administración a un paciente que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de la presente divulgación.

- La presente divulgación además proporciona un anticuerpo de la presente invención para su uso en terapia. Además, la presente divulgación proporciona un anticuerpo de la presente invención para su uso en el tratamiento de colitis ulcerosa, cáncer renal o cáncer de ovario. Además, la presente divulgación proporciona el uso de un anticuerpo de la presente invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de colitis ulcerosa, cáncer renal o cáncer de ovario.

La presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de la presente invención y uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

- 25 Como se usa en el presente documento, la expresión "quimiocinas CXC ELR⁺ humanas" pretende referirse a las siete quimiocinas CXC conocidas que tienen un motivo E-L-R y que se unen al receptor CXCR1 y/o CXCR2. Las quimiocinas CXC ELR⁺ humanas son Gro-alfa humana (también conocida como CXCL1) (SEQ ID NO: 21), Gro-beta humana (también conocida como CXCL2) (SEQ ID NO: 22), Gro-gamma humana (también conocida como CXCL3) (SEQ ID NO: 23), ENA-78 humana (también conocida como CXCL5) (SEQ ID NO: 24), GCP-2 humana (también conocida como CXCL6) (SEQ ID NO: 25), NAP-2 humana (también conocida como CXCL7) (SEQ ID NO: 26) e IL-8 humana (también conocida como CXCL8) (SEQ ID NO: 27). De forma colectiva, en el presente documento las siete quimiocinas CXC ELR⁺ humanas se llaman "todas las quimiocinas CXC ELR⁺ humanas".

- El término "anticuerpo", tal como se usa en el presente documento, pretende referirse a moléculas de inmunoglobulinas monoclonales que comprenden cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas mediante enlaces disulfuro. Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (HCVR) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada comprende tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de cadena ligera (LCVR) y una región constante de cadena ligera, CL. Las regiones HCVR y LCVR se pueden subdividir además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), entremezcladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada HCVR y LCVR se compone de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones CDR en HCVR se denominan HCDR1, HCDR2 y HCDR3. Las regiones CDR en LCVR se denominan LCDR1, LCDR2 y LCDR3. Las CDR contienen la mayoría de los restos que forman interacciones específicas con el antígeno. Existen actualmente tres sistemas de asignaciones de CDR para anticuerpos que se utilizan para delineación de secuencias. La definición de CDR en Kabat (Kabat y col., "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)) se basa en la variabilidad de secuencias de anticuerpos. La definición de CDR de Chothia (Chothia y col., "Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins", Journal of Molecular Biology, 196, 901-917 (1987); Al-Lazikani y col., "Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins", Journal of Molecular Biology, 273, 927-948 (1997)) se basa en estructuras tridimensionales de anticuerpos y topologías de los bucles de CDR. Las definiciones de CDR de Chothia son idénticas a las definiciones de CDR de Kabat con la excepción de HCDR1 y HCDR2. Para los fines de la presente invención, se utiliza un híbrido de las definiciones de Kabat y Chothia para definir las CDR. El asignamiento de aminoácidos en las regiones HCVR y LCVR está de acuerdo con la convención de numeración de Kabat. Se entiende además que el término "anticuerpo" abarca cualquier modificación celular postraduccional en el anticuerpo, que incluye, pero sin limitarse a, acilación y glucosilación.

Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo neutralizante" pretende referirse a un anticuerpo cuya unión a una quimiocina CXC ELR⁺ da como resultado la inhibición de una actividad biológica inducida mediante esa quimiocina. Esta inhibición de una actividad biológica inducida por quimiocina ELR⁺ se puede evaluar mediante

uno o más de los diversos ensayos *in vitro* estándar conocidos en la materia (véase los ejemplos). Se entiende además que los términos "inhibir" o "neutralizar" como se usan en el presente documento con respecto a una actividad de un anticuerpo de la invención significan la capacidad para antagonizar, reducir o interrumpir la progresión, intensidad o gravedad de una actividad biológica inducida mediante una o más quimiocinas CXC ELR⁺.

- 5 Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo septaespecifico" pretende abarcar un anticuerpo que se une a las siete quimiocinas CXC ELR⁺ humanas con alta afinidad (por ejemplo, con afinidad de unión (K_D) en el intervalo de aproximadamente 5×10^{-11} M a aproximadamente 1×10^{-9} M).

10 Como se usa en el presente documento, un "paciente" se refiere a un mamífero, preferentemente un ser humano con una enfermedad, trastorno o dolencia que se beneficiaría de un nivel reducido de quimiocinas CXC ELR⁺ humanas o bioactividad disminuida inducida por quimiocinas CXC ELR⁺ humanas.

15 Como se usa en el presente documento, "tratamiento" o "tratar" pretende referirse a todos los procedimientos en los que puede haber una desaceleración, control o interrupción de la progresión de los trastornos desvelados en el presente documento, pero no indica necesariamente una eliminación total de todos los síntomas del trastorno. Tratamiento incluye la administración de un anticuerpo de la presente invención para el tratamiento de una enfermedad o dolencia en un paciente, particularmente en un ser humano.

20 Los anticuerpos de la presente invención se unen a todas las quimiocinas CXC ELR⁺ humanas con alta afinidad. Por ejemplo, los presentes anticuerpos se unen a las siete quimiocinas CXC ELR⁺ humanas con una afinidad de unión (K_D) en el intervalo de aproximadamente 5×10^{-11} M a aproximadamente 1×10^{-9} M, por ejemplo, de aproximadamente $1,0 \times 10^{-10}$ M a aproximadamente $8,6 \times 10^{-10}$ M, medida mediante resonancia del pasmón superficial, cuando se expresa como un anticuerpo IgG4 de longitud completa. Los anticuerpos de la presente invención se caracterizan además en que mientras se unen a todas las quimiocinas CXC ELR⁺ humanas con especificidad, no se unen específicamente a otras quimiocinas CXC, por ejemplo, factor derivado de células del estroma 1 alfa (SDF-1 α , también conocido como CXCL12).

25 En una realización, los anticuerpos de la invención pueden tener una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en los que la región variable de cadena pesada comprende regiones CDR con las siguientes secuencias de aminoácidos: HCDR1 (SEQ ID NO: 10), HCDR2 (SEQ ID NO: 11) y HCDR3 (SEQ ID NO: 12); y en los que la región variable de cadena ligera comprende regiones CDR con las siguientes secuencias de aminoácidos: LCDR1 (SEQ ID NO: 7), LCDR2 (SEQ ID NO: 8) y LCDR3 (SEQ ID NO: 9).

30 En otro punto divulgado, los anticuerpos pueden tener una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en los que la región variable de cadena pesada comprende regiones CDR con las siguientes secuencias de aminoácidos: HCDR1 (SEQ ID NO: 10), HCDR2 (SEQ ID NO: 11) y HCDR3 (SEQ ID NO: 19); y en los que la región variable de cadena ligera comprende regiones CDR con las siguientes secuencias de aminoácidos: LCDR1 (SEQ ID NO: 7), LCDR2 (SEQ ID NO: 8) y LCDR3 (SEQ ID NO: 9).

35 En una realización adicional, los anticuerpos de la invención pueden comprender una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4.

En otra realización adicional, los anticuerpos de la invención pueden comprender una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

40 Preferentemente, los anticuerpos comprenden dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas. Preferentemente, la cadena ligera con secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 3 está codificada mediante un ácido nucleico que comprende la secuencia polinucleotídica mostrada en la SEQ ID NO: 6. Preferentemente, la cadena pesada con secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 1 está codificada mediante un ácido nucleico que comprende la secuencia polinucleotídica mostrada en la SEQ ID NO: 5.

45 Preferentemente, la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera como se muestra en la SEQ ID NO: 15 está codificada mediante un ácido nucleico que comprende la secuencia polinucleotídica mostrada en la SEQ ID NO: 18. Preferentemente, la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada como se muestra en la SEQ ID NO: 13 está codificada mediante un ácido nucleico que comprende la secuencia polinucleotídica mostrada en la SEQ ID NO: 17.

50 La realización más preferida de la invención es un anticuerpo que comprende dos cadenas pesadas idénticas que tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y dos cadenas ligeras idénticas que tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

55 Los anticuerpos de la presente invención se pueden incorporar en composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración en un paciente. La composición farmacéutica, normalmente, comprende un anticuerpo de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares, que sean fisiológicamente compatibles. Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden comprender, además,

cantidades menores de sustancias auxiliares que mejoran la vida útil o la efectividad del anticuerpo.

Las composiciones pueden estar en una diversidad de formas. La forma preferente depende del modo de administración y aplicación terapéutica prevista. Las composiciones preferentes normalmente están en la forma de soluciones inyectables o infundibles, tales como composiciones similares a las utilizadas para inmunización pasiva de seres humanos. El modo de administración preferente es parenteral (por ejemplo, intravenoso, subcutáneo, intraperitoneal o intramuscular). El anticuerpo puede administrarse mediante inyección intraperitoneal o subcutánea. Sin embargo, como apreciará el experto en la materia, la ruta y/o el modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados.

También pueden incorporarse compuestos activos complementarios a las composiciones farmacéuticas. En determinadas aplicaciones, un anticuerpo de la invención se coformula con y/o coadministra con uno o más agentes terapéuticos adicionales que son útiles para el tratamiento de trastornos en los que la actividad de las quimiocinas CXC ELR⁺ es perjudicial. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención puede coformularse y/o coadministrarse con uno o más agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, sunitinib o cisplatino).

Las composiciones farmacéuticas pueden incluir una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un anticuerpo de la invención. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosis y durante periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo puede variar de acuerdo con factores tales como la patología, la edad, el sexo y el peso del individuo y la capacidad del anticuerpo para desencadenar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz es, también, aquella en la que los efectos tóxicos o perjudiciales del anticuerpo se compensan con los efectos terapéuticamente beneficiosos.

Los regímenes de dosificación se pueden ajustar para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar un único bolo, se pueden administrar en el tiempo varias dosis divididas o la dosis se puede reducir o aumentar proporcionalmente como indican las exigencias de la situación terapéutica.

Los valores de dosificación pueden variar en función del tipo y de la gravedad de la dolencia que se va a aliviar. Se entiende además que, para cualquier sujeto particular, los regímenes de dosificación específicos se deben ajustar en el tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el criterio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones.

La unión específica de y la neutralización mediante un anticuerpo de la presente invención a quimiocinas CXC ELR⁺ humanas permite que dicho anticuerpo se utilice como agente terapéutico para enfermedades y trastornos que se benefician de la inhibición de la bioactividad de quimiocinas CXC ELR⁺ humanas. Dada su capacidad para unir y neutralizar las siete quimiocinas CXC ELR⁺ humanas, los anticuerpos de la presente invención ofrecen ventajas sobre monoterapias que se dirigen a quimiocinas CXC ELR⁺ humanas únicas y terapias en combinación que se dirigen a múltiples quimiocinas CXC ELR⁺ humanas.

La divulgación también proporciona un procedimiento para el tratamiento de colitis ulcerosa o cáncer, tal como cáncer renal o cáncer de ovario. La divulgación también proporciona un anticuerpo para su uso en el tratamiento de colitis ulcerosa o cáncer, tal como cáncer renal o cáncer de ovario.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

40 Expresión y producción de anticuerpos

Los anticuerpos de la presente invención se pueden expresar y purificar de la siguiente manera. Un vector de expresión que contiene la secuencia de ADN de SEQ ID NO: 5 (que codifica un polipéptido de cadena pesada de SEQ ID NO: 1) y SEQ ID NO: 6 (que codifica un polipéptido de cadena ligera de SEQ ID NO: 3) se utiliza para transfectar células NS0. Un anticuerpo resultante de este vector de expresión es el "anticuerpo 1".

Además, un vector de expresión que contiene la secuencia de ADN de SEQ ID NO: 17 (que codifica un polipéptido de cadena pesada de SEQ ID NO: 13) y SEQ ID NO: 18 (que codifica un polipéptido de cadena ligera de SEQ ID NO: 15) se utiliza para transfectar células NS0. Un anticuerpo resultante de este vector de expresión es el "anticuerpo 2".

Para el anticuerpo 1 o el anticuerpo 2, los grupos transfectados se colocan en placas en baja densidad para permitir sobrecrecimiento, cercano a la clonación, de células de expresión estable. Los pocillos maestros se criban para expresión de anticuerpos y, luego, se amplían en cultivos en suspensión libres de suero para utilizarlos en la producción. El medio clarificado, en el que se ha secretado el anticuerpo, se aplica a una columna con proteína A o G que se ha equilibrado con un tampón compatible, tal como solución salina tamponada con fosfato (pH 7,4). Se lava la columna para eliminar componentes de unión no específicos. El anticuerpo unido se eluye mediante gradiente de pH (tal como tampón fosfato de sodio 0,1 M pH 6,8 a tampón citrato de sodio 0,1 M pH 2,5). Las

fracciones de anticuerpos se detectan mediante SDS-PAGE y, luego, se combinan. La purificación adicional es opcional, dependiendo del uso previsto. El anticuerpo se puede concentrar y/o filtrar de forma estéril utilizando técnicas comunes. Se pueden eliminar eficazmente los multímeros y agregados solubles mediante técnicas comunes, incluyendo cromatografía de exclusión por tamaño, de interacción hidrófoba, de intercambio iónico o de hidroxipatita. La pureza del anticuerpo después de estas fases de cromatografía puede ser mayor que 99 %. El producto se puede congelar inmediatamente a -70 °C o se puede liofilizar.

Afinidad de unión a quimiocinas CXC ELR⁺ humanas

Se utilizan el instrumento Biacore 2000 y el software de evaluación Biacore 2000 versión 4.1 para el análisis de resonancia de plasmón superficial. Se prepara una micromatriz CM5 utilizando el procedimiento de acoplamiento de amina EDC/NHS del fabricante. En resumen, se activan las superficies de las cuatro celdas de flujo mediante inyección de una mezcla 1:1 de EDC/NHS durante 7 minutos a 10 µl/min. Se diluye proteína A en 100 µg/ml en acetato 10 mM, tampón a pH 4,5 y se inmoviliza para lograr aproximadamente 10.000 RU en las 4 celdas de flujo mediante inyección de 7 minutos a un caudal de 10 µl/minuto. Se bloquean sitios sin reaccionar con inyección de 7 minutos de etanolamina a 10 µl/minuto. Se utilizan dos inyecciones de glicina (pH 1,5) durante 30 segundos a 10 µl/minuto para eliminar cualquier proteína asociada de forma no covalente. El tampón de migración es HBS-EP+.

Se diluye el anticuerpo 1 o el anticuerpo 2 a 2 µg/ml en tampón de migración y se capturan, aproximadamente, 400-600 RU en la celda de flujo (Fc). Se diluyen ligandos desde 100 µg/ml hasta 50 nM en el tampón de migración y, luego, se diluyen a la mitad de forma seriada en el tampón de migración hasta 3,125 nM. Se inyectan inyecciones por duplicado de cada concentración de ligando a 100 µl/min durante 150 segundos seguido de una fase de disociación. La fase de disociación es de 1800 segundos para todos los ligandos. Se realiza regeneración mediante la inyección de glicina 10 mM (pH 1,5) durante 60 segundos a 50 µl/min en todas las celdas de flujo. Se recogen los datos de referencia sustraídos como Fc2-Fc1, Fc3-Fc1 y Fc4-Fc1. Se obtienen las mediciones a 25 °C. Se evalúan la tasa de activación (k_{on}) y la tasa de inactivación (k_{off}) para cada ligando utilizando un modelo de unión "unión 1:1 (transferencia de masa)". Se calcula la afinidad (K_D) a partir de la cinética de unión de acuerdo con la relación: $K_D = k_{off}/k_{on}$.

Las quimiocinas CXC ELR⁺ humanas producen una respuesta de unión dependiente de la concentración con el anticuerpo 1 y el anticuerpo 2. Las tablas 1 y 2 resumen los valores de k_{on} , k_{off} y K_D para el anticuerpo 1 y el anticuerpo 2. Estos resultados demuestran que el anticuerpo 1 y el anticuerpo 2 se unen a las siete quimiocinas CXC ELR⁺ humanas con alta afinidad.

Tabla 1 Afinidades de unión *in vitro* a las quimiocinas CXC ELR⁺ humanas para el anticuerpo 1

Quimiocina	k_{on} (1/MS) x 10 ⁵	k_{off} (1/s) x 10 ⁻⁵	K_D (pM)
CXCL1 humana (Gro alfa)	9,30 ± 0,45	10,50 ± 0,14	113 ± 4
CXCL2 humana (Gro beta)	7,73 ± 0,86	13,15 ± 0,64	171 ± 11
CXCL3 humana (Gro gamma)	7,16 ± 0,08	12,35 ± 1,06	172 ± 13
CXCL5 humana (ENA-78)	5,43 ± 0,61	12,20 ± 0,00	226 ± 25
CXCL6 humana (GCP-2)	7,07 ± 0,11	57,80 ± 3,68	818 ± 40
CXCL7 humana (NAP-2)	9,00 ± 0,75	16,15 ± 1,77	181 ± 35
CXCL8 humana (IL-8)	3,39 ± 0,03	13,00 ± 0,57	384 ± 13

Tabla 2 Afinidades de unión *in vitro* a las quimiocinas CXC ELR⁺ humanas para el anticuerpo 2

Quimiocina	k_{on} (1/MS) x 10 ⁵	k_{off} (1/s) x 10 ⁻⁵	KD (pM)
CXCL1 humana (Gro alfa)	6,28	1,53	243
CXCL2 humana (Gro beta)	1,14	2,05	180
CXCL3 humana (Gro gamma)	4,65	1,76	379
CXCL5 humana (ENA-78)	4,27	1,51	354
CXCL6 humana (GCP-2)	7,19	6,11	849
CXCL7 humana (NAP-2)	5,21	2,18	418
CXCL8 humana (IL-8)	2,61	1,24	473

Evaluación de estabilidad física

La agregación y la autoasociación de proteínas es una propiedad indeseable en anticuerpos ya que podría exacerbar potencialmente efectos no deseados, tales como desencadenar una respuesta inmune. De ese modo, el mantenimiento del anticuerpo en un estado monomérico es altamente deseable. El agregado porcentual de alto peso molecular (% HMW) es un indicador de agregación y autoasociación de proteínas. Un mayor agregado % HMW indica aumento de agregación/autoasociación de proteínas y aumento de inestabilidad física. La estabilidad física del anticuerpo 1 y del anticuerpo 2 se determina de la siguiente forma.

Se dializa el anticuerpo durante la noche a 4 °C en citrato 10 mM, pH 6 +/- NaCl 150 mM. A la mañana siguiente, se concentran las muestras a 50 mg/ml, se filtran a través de filtros de 0,2 micrómetros y, luego, se añade Tween-80 a una concentración final de 0,02 %. Se incuba cada muestra a 25 °C durante el tiempo especificado. La formación de agregado soluble es seguida mediante SEC analítico utilizando una columna TSK3000SWXL de 5 micrómetros con dimensiones de 30 cm x 0,78 cm. La fase móvil es fosfato de sodio 50 mM, pH 7, NaCl 175 mM, a un caudal de 0,5 ml/min. Se aplican muestras como inyecciones de 1 µl y se controlan a 280 nm para determinar el aumento del agregado % HMW (Tabla 3).

Se incuban las formulaciones de 50 mg/ml durante 1 y 4 semanas a 25 °C para evaluar la estabilidad a largo plazo en condiciones de estrés. Se determina el agregado % HMW delta mediante la sustracción del agregado % HMW en tiempo cero (designado como 'Inicial' en la tabla 3) del % HMW en el punto temporal de 1 semana o 4 semanas. Después de 1 y 4 semanas, el anticuerpo 1 y el anticuerpo 2 demostraron % HMW delta por debajo del 1 %, lo que demuestra buena estabilidad física.

Tabla 3 Agregado % de alto peso molecular

Anticuerpo 1			
	Inicial (4 °C)	% HMW 50 mg/ml (t=1 semana)	% HMW 50 mg/ml (t=4 semanas)
Citrato 10 mM pH 7, NaCl 150 mM	0,78 %		
25 °C		1,24 %	1,41 %
Δ %HMW		0,46%	0,63%
Citrato 10 mM pH 7, NaCl 150 mM, Tween-80 al 0,02 %	1,05		
25 °C		1,46%	1,75%
Δ %HMW		0,41%	0,7%
Anticuerpo 2			
	Inicial (4 °C)	% HMW 50 mg/ml (t=1 semana)	% HMW 50 mg/ml (t=4 semanas)
Citrato 10 mM pH 7, NaCl 150 mM	0,37 %		
25 °C		0,48 %	0,59 %
Δ %HMW		0,11 %	0,22 %
Citrato 10 mM pH 7, NaCl 150 mM, Tween-80 al 0,02 %	0,42 %		
25 °C		0,55 %	0,74 %
Δ %HMW		0,13 %	0,32 %

Cartografía de epítipo de anticuerpos para el anticuerpo 1

Se llevan a cabo múltiples enfoques para caracterizar el epítipo para el anticuerpo 1, incluyendo análisis por transferencia Western, cocristalización del anticuerpo con diversas quimiocinas CXC ELR⁺ y análisis mutacional para la unión y neutralización.

Análisis por transferencia Western

Para determinar si el anticuerpo 1 es capaz de unirse a un epítipo lineal o conformacional, se realiza análisis por transferencia Western utilizando condiciones reducidas y no reducidas. Se realiza electroforesis de las proteínas utilizando geles Bis-Tris NuPAGE® premoldeados al 4-12 %. Se añade tampón de migración NuPAGE® SDS MES a las cámaras internas (200 ml) y externas (al menos 600 ml) de las mini celdas. Se hacen diluciones seriadas de CXCL8 humana (400 ng, 100 ng o 25 ng por carril) en el tampón de muestra NuPAGE® LDS 4X con o sin agente reductor de muestra NuPAGE® 10X. Se calientan las muestras a 95 °C durante 2 minutos. Los volúmenes de carga

son 10 μ l por carril para las muestras y 5 μ l por carril para el marcador estándar preteñido SeeBlue Plus2. Los geles se procesan a 200 V durante 35 minutos a temperatura ambiente.

5 Se transfieren las proteínas a PVDF utilizando el sistema de transferencia en seco iBlot® con iBlot® Transfer Stack, Nitrocellulose, Mini. Se bloquea la membrana en solución bloqueante (leche descremada al 3 % en solución salina tamponada con fosfato) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se añade el anticuerpo 1 a la solución bloqueante a una concentración final de 1 μ g/ml y, luego, se incuba durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de la incubación primaria, se elimina la solución anticuerpo/bloqueante y se lava la membrana 3 veces durante 15 minutos en tampón de lavado (solución salina tamponada con fosfato + Tween 20 al 0,05 %). Luego se incuba la membrana con anticuerpo secundario IgG específico de burro anti Fc humano conjugado con HRP (0,1 μ g/ml en solución bloqueante) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de la eliminación del anticuerpo secundario, se lava la membrana 4 veces durante 10 minutos con tampón de lavado. Luego se incuba la membrana con solución funcional de la solución de peróxido estable y la solución luminol/potenciador (Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate) durante 5 minutos. Se introduce la membrana en un protector de membrana de plástico en un casete de película de rayos X con película CL-X Posure™ durante 30 segundos. Se desarrolla la película utilizando un sistema Konica SRX-101.

En condiciones no reductoras, a una concentración de CXCL8 de 400 ng, aparecieron dos bandas a aproximadamente 17 kDa y a aproximadamente 10 kDa. A una concentración de CXCL8 de 100 ng, apareció una banda a aproximadamente 10 kDa. A una concentración de CXCL8 de 25 ng, no aparecieron bandas. En condiciones reductoras, no aparecieron bandas a ninguna de las concentraciones probadas.

20 Los resultados demostraron que el anticuerpo 1 es capaz de unirse a CXCL8 humano desnaturalizado no reducido, pero no es capaz de unirse a CXCL8 humano desnaturalizado reducido. Por lo tanto, se necesitan los dos enlaces disulfuro en CXCL8 para mantener el epítipo de anticuerpo. Estos resultados demuestran un epítipo conformacional para el anticuerpo 1.

Análisis de estructura de cristal

25 Se obtienen estructuras de cristal del complejo Fab/antígeno para CXCL8 humana y CXCL2, CXCL3 y CXCL7 de macaco para determinar la superficie de unión completa del anticuerpo 1. 1-66 CXCL8 humana truncada de tipo silvestre, mutantes puntuales de CXCL8 humana y CXCL7 de macaco se expresan en *E. coli* con etiquetas His-SUMO N terminales. Se repliegan estas proteínas; se escinden las etiquetas; y se purifican las proteínas mediante técnicas de purificación estándar. Se expresan CXCL2 y CXCL3 de macaco en células HEK293 EBNA y se purifican mediante técnicas de purificación estándar. Se confirma la formación de enlaces disulfuro mediante digestión trípica y análisis de impronta de masa y se confirma actividad mediante ensayo de quimiotaxis de neutrófilos. Se expresa un Fab del anticuerpo 1 en células HEK293 EBNA y se purifica mediante técnicas de purificación estándar. Se forman complejos Fab/antígeno mediante la adición de un ligero exceso molar de antígeno al Fab, seguido de purificación por cromatografía de exclusión por tamaño para eliminar el exceso de antígeno libre. Se cristalizan los complejos y se resuelven las estructuras de cristal mediante reemplazo molecular utilizando Buster 2.9.5 (Global Phasing Ltd.).

Estas estructuras de cristal confirmaron que el epítipo para el anticuerpo 1 incluía el extremo N de las quimiocinas CXC ELR⁺, pero también mostraron contactos entre el Fab y el bucle β 1- β 2 y las hebras β 2 y β 3 de las quimiocinas CXC ELR⁺. Las estructuras de cristal también demuestran que el anticuerpo reconoce específicamente el pliegue de las quimiocinas CXC ELR⁺, ya que las estructuras de cristal eran superponibles. También se observaron numerosas interacciones de enlaces de hidrógeno y de Van der Waals. De forma más notable, la cadena lateral de R6 conservada del motivo ELR estaba en un bolsillo de unión profundo formado por la cadena pesada de Fab en los restos W33, Y102 e Y110 y la cadena ligera de Fab en el resto W94. La quimiocina CXCL8 humana truncada de tipo silvestre también se une por enlaces de hidrógeno con la cadena pesada de Fab en el resto E99 y con la cadena ligera de Fab en el carbonilo de la cadena principal de N91. Otros enlaces de hidrógeno observados estaban entre el carbonilo de la cadena principal de L5 de la quimiocina CXCL8 humana truncada de tipo silvestre y la amida de la cadena principal de W94 de la cadena ligera de Fab; el carbonilo de la cadena principal de 110 de la quimiocina CXCL8 humana truncada de tipo silvestre y la cadena lateral de S52 de la cadena pesada de Fab; la cadena lateral de K11 de la quimiocina CXCL8 humana truncada de tipo silvestre y las cadenas laterales de T30 y S31 de la cadena pesada de Fab; la cadena lateral de H33 de la quimiocina CXCL8 humana truncada de tipo silvestre y el carbonilo de la cadena principal de W94 de la cadena ligera de Fab; la amida de la cadena principal de A35 y la cadena lateral de N59 de la cadena pesada de Fab; y la amida de la cadena principal de C50 de la quimiocina CXCL8 humana truncada de tipo silvestre y el carbonilo de la cadena principal de Y104 de la cadena pesada de Fab. Además, los restos N terminales 5 a 13 de la quimiocina CXCL8 humana truncada de tipo silvestre realizaron numerosos contactos con el Fab cuando el extremo N estaba en un surco entre la CDR2 y CDR3 de la cadena pesada de Fab. Además, el bucle de la CDR3 de la cadena pesada de Fab se extendió desde este surco e interactuó con el resto 140 no N terminal en la hebra β 2 y los restos Glu48, Leu49 y Cys50 en la hebra β 3 de la quimiocina CXCL8 humana truncada de tipo silvestre. Finalmente, los restos 33-36 del bucle β 1- β 2 en la quimiocina CXCL8 humana truncada de tipo silvestre se empaqueta contra la CDR2 de la cadena pesada de Fab.

Análisis mutacional

Se observan diversos contactos clave entre el Fab del anticuerpo 1 y la CXCL8 humana de tipo silvestre en la estructura de cristal y, además, se probaron a través de estudios cinéticos de unión y neutralización del lector de placa de imagen fluorescente U937-huCXCR2 (FLIPR) de mutantes puntuales de la CXCL8 humana. Para estudiar estos contactos clave, varios mutantes puntuales (R6A, I10A, A35P, I40A y L49A) se basan en la secuencia de la CXCL8 humana (SEQ ID NO: 27). Los mutantes puntuales de la CXCL8 humana de tipo silvestre, R6A, I10A, A35P, I40A y L49A se expresan, se repliegan y se purifican de acuerdo con técnicas estándar. Se confirma la formación de enlaces disulfuro mediante digestión triptica y análisis de impronta de masa y se confirma actividad mediante ensayo de quimiotaxis de neutrófilos.

Se prueban cinéticas de unión en un instrumento Biacore 2000 con el software de evaluación Biacore 2000 versión 4.1 como se describe anteriormente. Se prueban CXCL8 humanas de tipo silvestre y mutantes para actividad biológica y para neutralización mediante el anticuerpo 1 utilizando el ensayo U937-huCXCR2. U937-huCXCR2 es una línea celular monocítica transducida con retrovirus para la expresión de CXCR2 humana.

Se diluyen de forma seriada mutantes de CXCL8 en tampón de ensayo que contiene BSA al 0,2 % en pocillos de placas de polipropileno de 96 pocillos con fondo en v. Las concentraciones de ligando son 3 veces la concentración final de ensayo (intervalo de concentraciones finales de ensayo de 300 a 0,0051 nM). Se cargan una placa de células y una placa de ligandos en un lector de placa de imagen fluorescente (FLIPR-3, Molecular Devices) programado para transferir 50 µl de ligando a los pocillos de la placa de células. Se registra fluorescencia a intervalos de 1 segundo durante 90 segundos. Se calcula el cambio en fluorescencia [unidades relativas de fluorescencia delta (URFD), URF Max-URF Min] a partir de las imágenes 10 a 90. Se representa URFD frente a log (concentración de ligandos) y se determinan valores EC₅₀ mediante regresión no lineal utilizando Graph Pad Prism. Se realizan ensayos por triplicado sobre tres placas de ensayo.

Se diluye de forma seriada el anticuerpo 1 en tampón de ensayo que contiene BSA al 0,2 %. Las concentraciones de anticuerpo son 3 veces la concentración final de ensayo (intervalo de concentraciones finales desde 10 a 0,0195 µg/ml). Se preparan soluciones madre de la CXCL8 humana de tipo silvestre y mutantes CXCL8 en tampón de ensayo + BSA al 0,2 % a 240 nM (30x la concentración final de ensayo de 8 nM). Se mezclan 20 µl de ligando con 180 µl de anticuerpo 1 en pocillos de placas de polipropileno de 96 pocillos con fondo en v. Se incuban el ligando y el anticuerpo a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se cargan una placa de células y una placa de ligando-anticuerpo en un lector de placas de imagen fluorescente (FLIPR-3, Molecular Devices) programado para transferir 50 µl de ligando-anticuerpo a los pocillos de la placa de células. Se registra fluorescencia a intervalos de 1 segundo durante 90 segundos. Se calcula el cambio en fluorescencia (URFD) a partir de las imágenes 10 a 90. Se representa URFD frente a log (concentración de anticuerpos) y se determinan valores IC₅₀ mediante regresión no lineal utilizando Graph Pad Prism. Se realizan ensayos por triplicado sobre tres placas de ensayo.

La cinética de unión, la actividad biológica y los resultados de neutralización se resumen en la tabla 4. Se obtienen las mediciones a 25 °C. Se evalúan la tasa de activación (k_{on}) y la tasa de inactivación (k_{off}) para cada ligando utilizando un modelo de unión "unión 1:1 (transferencia de masa)". Se calcula la afinidad (K_D) a partir de la cinética de unión de acuerdo con la relación: $K_D = k_{off}/k_{on}$.

Varias de las mutaciones anulaban la actividad del receptor (EC₅₀) y, por lo tanto, no se pudo probar para neutralización. Se observa que la mutación A35P eliminó por completo la actividad neutralizante a pesar de tener actividad completa en el receptor. Estos resultados destacan los contactos clave (R6, I10, A35, I40 y L49) dentro de la interfaz de unión del antígeno CXCL8 que son importantes para la unión del anticuerpo.

Tabla 4. Cinética de unión, actividad U937 FLIPR (EC₅₀) y neutralización U937 FLIPR (IC₅₀) del tipo silvestre y mutantes de la CXCR8 humana.

Variante	k_{on} (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_{off} (s ⁻¹)	K_D (pM)	EC ₅₀ (µg/ml)	IC ₅₀ (µg/ml)
Tipo silvestre	3,03 ± 3,78 x 10 ⁶	4,41 ± 4,55 x 10 ⁻⁴	236 ± 144	1,3 ± 0,8 (n=4)	0,9
R6A	Sin unión			No activo	
I10A	2,77 ± 0,39 x 10 ⁵	3,44 ± 0,01 x 10 ⁻⁴	1260 ± 184	No activo	
A35P	1,06 ± 0,07 x 10 ⁶	4,97 ± 1,72 x 10 ⁻³	4740 ± 1920	1,9 ± 0,3 (n=2)	Sin neutralización
I40A	1,61 ± 0,21 x 10 ⁴	4,24 ± 1,16 x 10 ⁻⁴	27100 ± 10700	No activo	
L49A	1,43 ± 0,24 x 10 ⁵	5,44 ± 0,42 x 10 ⁻⁴	3830 ± 354	5,6 ± 1,3 (n=2)	1,5

En general, el análisis de cartografía del epítipo para el anticuerpo 1 demostró que la interfaz de unión del antígeno incluye el extremo N de las quimiocinas CXC ELR⁺ (aminoácidos 5-13), el bucle β 1- β 2 (aminoácidos 33-36) y las hebras β 2 y β 3 (aminoácidos 40, 48-50). Los contactos clave dentro de esta interfaz que son importantes para la unión de anticuerpos incluyen los aminoácidos R6, I10, A35, I40 y L49 en CXCL8 (SEQ ID NO: 27).

5 Ensayos de neutralización

Neutralización in vitro de quimiocinas CXC ELR⁺ humanas utilizando células HMEC transfectadas con CXCR2 humana

Dado que todas las quimiocinas CXC ELR⁺ se pueden unir al receptor CXCR2, se seleccionan células que expresan CXCR2 para estudios *in vitro*. HMEC-huCXCR2 es una línea celular endotelial humana inmortalizada transducida con retrovirus para la expresión del receptor CXCR2 humano. Las células HMEC que expresan CXCR2 humano son capaces de inducir flujo de entrada de Ca²⁺ intracelular en respuesta a quimiocinas CXC ELR⁺ humanas, de macaco, de rata y de ratón. Se puede detectar el flujo de entrada de Ca²⁺ intracelular mediante un lector de placas de imagen fluorescente (FLIPR). Por lo tanto, la neutralización de quimiocinas también debería neutralizar el flujo de entrada de Ca²⁺ intracelular inducido por estas quimiocinas.

Se mantiene HMEC-huCXCR2 en medio MCDB 31 suplementado con suero fetal bovino al 10 %, 2x GlutaMax, 1x aminoácidos no esenciales, 1 μ g/ml de hidrocortisona, 10 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico humano y 0,4 μ g/ml de puomicina a 37 °C en CO₂ al 5 %. Se mantienen los cultivos a densidades subconfluentes (50-80% de confluencia). Se recogen las células con TrypLE Express, se ajusta la densidad celular a 3x10⁵ células/ml en medio de cultivo completo y se siembran 100 μ l de la suspensión celular en pocillos de placas de ensayo de fondo negro transparente. Se incuban las placas de células a temperatura ambiente durante 30 minutos para permitir que las células sedimenten en el fondo de los pocillos antes de incubar las placas durante la noche a 37 °C en CO₂ al 5 %. En cada placa de ensayo, se suspende el contenido de un vial de reactivo Fluo-4NW en 10 ml de tampón de ensayo y 100 μ l de probenecida para preparar reactivo 1x Fluo-4NW. Después de la incubación, se aspira el medio de cultivo y se añaden 100 μ l de la solución 1x Fluo-4NW a cada pocillo de la placa de ensayo. Se incuban las placas durante 30 minutos a 37 °C, seguido de 30 minutos adicionales a temperatura ambiente y protegidas de la luz. Se diluye de forma seriada el anticuerpo 1 en tampón de ensayo que contiene BSA al 0,2 %. Las concentraciones de anticuerpos son 3x la concentración final de ensayo (intervalo de concentraciones finales de 10-0,0195 μ g/ml). Se preparan soluciones madre de ligandos en tampón de ensayo + BSA al 0,2 % a 300 nM (30x la concentración final de ensayo de 10 nM). Se mezclan 20 μ l de ligando con 180 μ l de anticuerpo en pocillos de placas de polipropileno de 96 pocillos con fondo en v. Se incuban el ligando y el anticuerpo a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se cargan una placa de células y una placa de ligando/anticuerpo en un Lector de Placas de Imagen Fluorescente (FLIPR-3, Molecular Devices) programado para transferir 50 μ l de ligando-anticuerpo a los pocillos de la placa de células. Se registra fluorescencia cada segundo durante 90 segundos. Se calcula el cambio en fluorescencia (URFD) a partir de las imágenes 10 a 90. Se representa URFD frente a log (concentración de anticuerpos) y se determinan valores IC₅₀ mediante regresión no lineal utilizando Graph Pad Prism. Se realizan ensayos por triplicado sobre tres placas de ensayo. Los valores se expresan como la media de repeticiones.

Los resultados se resumen en la Tabla 5. Estos resultados demuestran que el anticuerpo 1 era capaz de neutralizar las siete quimiocinas CXC ELR⁺ humanas. Se expresan valores IC₅₀ como μ g/ml de anticuerpo (las desviaciones estándar están entre paréntesis). Se utilizaron las formas de 72 aminoácidos y 77 aminoácidos de CXCL8. Los datos son promedio de 2-5 repeticiones.

Tabla 5: *Estudio FLIPR in vitro utilizando células HMEC que expresan CXCR2 humana*

	IC ₅₀ (μ g/ml)
CXCL1	0,867 (\pm 0,153)
CXCL2	1,281 (\pm 0,449)
CXCL3	0,731 (\pm 0,187)
CXCL5	0,681 (\pm 0,347)
CXCL6	1,122 (\pm 0,523)
CXCL7	1,068 (\pm 0,324)
CXCL8 (72)	0,951 (\pm 0,416)
CXCL8 (77)	0,358 (\pm 0,078)

Neutralización in vitro de quimiotaxis inducida por CXCL8 o CXCL1 humanas que utiliza neutrófilos humanos primarios

Se eligió un ensayo de quimiotaxis que utiliza neutrófilos humanos para determinar la actividad de neutralización del anticuerpo 1 en células que expresan de forma natural CXCR1 y CXCR2. Se extrae sangre periférica de voluntarios sanos en dos tubos de heparina sódica de 10 ml. Para aislar neutrófilos, se colocan 5 ml de sangre sobre 5 ml de Polymorphprep en cuatro tubos de 15 ml. Se centrifugan los tubos durante 30 minutos a 470 xg, 18 °C. Se retiran y se descartan el plasma y la banda celular superior (células mononucleares). Se combina la segunda banda (neutrófilos) de los 4 tubos y se añade igual volumen de PBS. Se centrifuga el tubo durante 10 minutos a 400 xg, 18 °C. Se lava el sedimento con 12 ml de PBS, se centrifuga como antes y se resuspende el sedimento con 11 ml de HBSS/BSA (HBSS, BSA 7,5 mg/ml). Se suspenden 60×10^6 células en 12 ml de HBSS/BSA y CMFDA 5 μ M y se incuban durante 30 minutos a 37 °C. Después de la incubación, se centrifuga el tubo para sedimentar las células, se lava una vez con 12 ml de HBSS/BSA y, luego, se resuspenden las células en 12 ml de HBSS/BSA (5×10^6 células/ml).

Se diluyen el anticuerpo 1 y el control de isotipo (anticuerpo IgG4 humano) a 1495 nM utilizando HBSS/BSA (dilución 1) y, luego, se diluyen de forma seriada a 1:5 con HBSS/BSA. Se diluye CXCL8 a 20 nM con HBSS/BSA. Se diluye CXCL1 a 10,1 nM con HBSS/BSA.

Se mezclan 70 μ l de anticuerpo 1 o HBSS/BSA con 70 μ l de solución CXCL8 o CXCL1 y se incuban a temperatura ambiente durante ~30 minutos. Se dispensan 30 μ l de la mezcla en los pocillos de la cámara inferior de una placa ChemoTx por triplicado. Los pocillos que contienen solo HBSS/BSA (sin quimiocina ni anticuerpo) mostrarán la señal de fondo. Se coloca el filtro ChemoTx sobre la cámara inferior y se dispensan 50 μ l (250.000 células) por encima de cada pocillo. Se incuba la placa ChemoTX durante 3 horas a 37°C, CO₂ al 5%. Después de la incubación, se enjuagan las células de la superficie superior con PBS y se elimina el filtro ChemoTx. Se lee la fluorescencia (contador Wallac Victor³ 1420) 485/535 utilizando solo el detector de fondo. Se sustrae la fluorescencia media de los pocillos de fondo (solo HBSS/BSA) de la fluorescencia del pocillo de prueba y se calculan las desviaciones medias y estándar en Excel.

A una concentración de CXCL8 de 5 nM, la IC₅₀ para el anticuerpo 1 (PM 150.000 kDa) fue 26,4 (\pm 0,236) nM. A una concentración de CXCL8 de 10 nM, la IC₅₀ para el anticuerpo 1 fue 43,7 (\pm 0,086) nM. A una concentración de CXCL1 de 5 nM, la IC₅₀ para el anticuerpo 1 fue 18,5 (\pm 0,158) nM. A una concentración de CXCL1 de 20 nM, la IC₅₀ para el anticuerpo 1 fue 40,3 (\pm 0,112) nM. A todas las concentraciones probadas de CXCL1 y CXCL8, el anticuerpo de control de isotipo no afectó a la quimiotaxis. Los datos muestran que el anticuerpo 1 puede bloquear la actividad quimiotáctica de CXCL8 o CXCL1 humanas de una forma dependiente de la dosis mientras que la actividad quimiotáctica no se vio afectada por el anticuerpo de control de isotipo.

Modelo in vivo de colitis DSS aguda en ratones

El sulfato de dextrano de sodio (DSS) es el modelo más utilizado de colitis ulcerosa (UC). En este modelo, DSS es un irritante químico que se añade al agua potable para inducir una enfermedad aguda que se asemeja a la UC. La fase aguda de la colitis DSS se caracteriza por el reclutamiento de neutrófilos en la mucosa y submucosa y una mayor expresión de quimiocinas CXC ELR⁺. Sin embargo, la exposición crónica a DSS causa daño intestinal severo y pérdida de peso significativa, que no es adecuada en un modelo de colitis. Para acomodar la naturaleza aguda de este modelo, se utilizó el anticuerpo 1 de una forma profiláctica para probar su capacidad para inhibir el reclutamiento de neutrófilos y el desarrollo de colitis. En este modelo, la proteína CXCL5 (LIX) de ratón aumenta significativamente en el tejido del colon (Kwon 2005); sin embargo, el anticuerpo 1 no neutraliza esta quimiocina de ratón.

Se obtienen ratones C57BL/6, de 8-10 semanas de edad, que pesan 18-22 g. Se recoge sangre mediante punción cardiaca y se analiza para establecer una línea basal. Para inducir colitis, los ratones reciben DSS al 2,5 % (PM = 36.000-50.000) en el agua potable durante 5 días (1-5 días) seguidos por 6 días de agua sin DSS (que refleja inflamación aguda). Los ratones sanos de control reciben solo agua (grupo "sin DSS"). Los ratones que reciben DSS se dosifican por inyección subcutánea en el día 0, 2, 4 y 8 con anticuerpo IgG4 humano de control (25 mg/kg) o anticuerpo 1 (25 mg/kg). Se registra el peso corporal diariamente. El número de ratones utilizados para cada tratamiento es 9 (excepto en el grupo sano "sin DSS" que se utilizaron 5 ratones sanos). Se realiza el estudio por cuadruplicado.

Como se muestra en la Tabla 6, los ratones que recibieron anticuerpo IgG4 humano de control perdieron peso dramáticamente entre el día 5 y el día 8. Los ratones DSS que recibieron anticuerpo 1 antes de la inducción de colitis y durante la fase aguda de la enfermedad mostraron menor pérdida de peso entre el día 5 y el día 8 que los ratones DSS tratados con anticuerpo IgG4 humano de control (94,0 % de peso corporal inicial para anticuerpo 1 frente a 85,3 % de peso corporal inicial para el control IgG4 en el día 8). Estos resultados demuestran que la administración sistémica del anticuerpo 1 mitigó eficazmente la pérdida de peso en colitis inducida por DSS, lo que apoya la conclusión de que el anticuerpo 1 neutraliza la actividad de ciertas quimiocinas CXC ELR⁺ de ratón y disminuye el reclutamiento de neutrófilos al colon.

Tabla 6

Día	% de peso corporal inicial		
	Sin DSS	IgG4	Anticuerpo 1
1	104,4	99,9	100,0
2	103,9	99,8	102,9
3	103,0	100,3	101,4
4	101,0	99,5	100,9
5	101,2	97,5	96,9
8	102,2	85,3	94,0
9	99,8	89,6	93,5
10	100,7	93,7	93,6
11	101,3	98,2	97,0

Neutralización in vivo en el modelo de xenoinjerto de células renales de células claras 786-O

Se mezclan 1:1 células de carcinoma de células renales 786-O (RCC) con matrigel y se implanta subcutáneamente en el flanco trasero derecho de ratones hembra atímicos desnudos a $3,0 \times 10^6$ células por inyección. Ratones portadores de xenoinjertos 786-O que tienen volúmenes tumorales que alcanzaron 100 mm^3 se sometieron a sonda oral con 10 mg/kg de sunitinib dos veces al día en un régimen de dosificación continua hasta que los ratones comenzaron a progresar con crecimiento tumoral incluso bajo tratamiento con sunitinib como ratones tratados con control (IgG4 y vehículo al 10 %). Los ratones que progresaban con el crecimiento tumoral en el tratamiento con sunitinib se dividieron aleatoriamente en 2 grupos. Un grupo recibe sunitinib a 10 mg/kg dos veces al día más anticuerpo IgG4 de control a 20 mg/kg una vez a la semana. El otro grupo recibe sunitinib a 10 mg/kg dos veces al día más anticuerpo 1 a 20 mg/kg una vez a la semana. Los volúmenes tumorales promedio (error estándar entre paréntesis) se muestran en la tabla 7. La adición de anticuerpo 1 al tratamiento con sunitinib redujo el crecimiento tumoral significativamente a lo largo del tiempo ($p < 0,0001$), indicando que el anticuerpo 1 resensibilizó tumores RCC de células claras al tratamiento con sunitinib.

Tabla 7

Día	Volumen tumoral promedio (mm^3)		
	IgG4 y vehículo al 10 %	IgG4 y sunitinib	Anticuerpo 1 y sunitinib
11	82,84 ($\pm 18,52$)	73,21($\pm 8,91$)	72,54 ($\pm 40,89$)
17	112,12 ($\pm 25,06$)	95,34 ($\pm 11,6$)	95,99 ($\pm 54,11$)
24	148,41 ($\pm 33,17$)	124,86 ($\pm 15,19$)	138,32 ($\pm 77,97$)
27	180,24 ($\pm 40,29$)	138,08 ($\pm 16,8$)	152,87 ($\pm 86,18$)
34	205,22 ($\pm 45,87$)	183,2 ($\pm 22,29$)	181,08 ($\pm 102,08$)
38	221,66 ($\pm 49,55$)	207,46 ($\pm 25,25$)	211,1 (± 119)
41	255,46 ($\pm 57,1$)	210,04 ($\pm 25,56$)	222,01 ($\pm 125,15$)
46	267,75 ($\pm 59,85$)	267,53 ($\pm 32,55$)	248,74 ($\pm 140,22$)
48	292,17 ($\pm 65,31$)	268,24 ($\pm 32,64$)	276,78 ($\pm 156,03$)
52	325,13 ($\pm 72,68$)	301,1 ($\pm 36,64$)	286,57 ($\pm 161,55$)
55	331,39 ($\pm 74,37$)	328,55 ($\pm 39,98$)	262,9 ($\pm 148,21$)
59	373,91 ($\pm 84,32$)	371,36 ($\pm 45,19$)	304,06 ($\pm 171,41$)

(continuación)

Día	Volumen tumoral promedio (mm ³)		
	IgG4 y vehículo al 10 %	IgG4 y sunitinib	Anticuerpo 1 y sunitinib
62	413,09 (± 93,47)	387,79 (± 47,19)	313,16 (± 176,54)
66	479,4 (± 108,92)	417,33 (± 50,78)	285,85 (± 161,14)
69	537,74 (± 122,53)	494,68 (± 60,19)	276,64 (± 155,95)
73	520,11 (± 118,92)	527,88 (± 64,23)	244,07 (± 137,59)
76	532,57 (± 122,53)	595,93 (± 72,52)	228,91 (± 129,04)
81	597,7 (± 137,49)	601,51 (± 73,19)	196,06 (± 110,52)
84	720,91 (± 166,16)	652,01 (± 79,34)	193,08 (± 108,84)
87	713,64 (± 164,79)	663,62 (± 80,75)	181,85 (± 102,51)
90	785,88 (± 181,79)	775,05 (± 94,31)	175,88 (± 99,15)
94	891,11 (± 206,57)	836,89 (± 101,84)	192,57 (± 108,56)
97	1073,86 (± 249,3)	1010,26 (± 122,93)	210,16 (± 118,47)

Neutralización *in vivo* en el modelo de xenoinjerto de cáncer de ovario SKOV3-Luc

5 SKOV3-Luc es una línea celular de cáncer de ovario humano que expresa el gen de luciferasa de luciérnaga. Las células SKOV3-Luc se utilizan, a menudo, *in vivo* para estabilizar el crecimiento tumoral del adenocarcinoma de ovario humano.

10 Las células de cáncer de ovario SKOV3-Luc se mezclaron 1:1 con matrigel y se implantaron subcutáneamente en el flanco trasero derecho de ratones hembra atímicos desnudos a $3,0 \times 10^6$ células por inyección. Los ratones se dividieron aleatoriamente en 4 grupos al inicio de acuerdo con el volumen tumoral después de que los xenoinjertos crecieran a un volumen tumoral promedio de 200 mm³. Los ratones recibieron anticuerpo IgG4 de control (2,5 mg/kg una vez a la semana), cisplatino (2,5 mg/kg una vez a la semana), anticuerpo 1 (20 mg/kg una vez a la semana) o una combinación de cisplatino (2,5 mg/kg una vez a la semana) y anticuerpo 1 (20 mg/kg una vez a la semana) mediante inyección intraperitoneal. El crecimiento tumoral se muestra en la Tabla 8. La monoterapia con cisplatino no mostró inhibición de crecimiento tumoral estadísticamente significativa en comparación con el control de isotipo.

15 Sin embargo, la combinación de cisplatino y anticuerpo 1 mostró inhibición del crecimiento tumoral estadísticamente significativa ($p \leq 0,001$) en comparación con el control de isotipo y la monoterapia con cisplatino, lo que indica que el anticuerpo 1 aumenta sinérgicamente la quimioterapia en el modelo de xenoinjerto de cáncer de ovario SKOV3-Luc.

Tabla 8

Día	Volumen tumoral promedio (mm ³)			
	IgG4	Cisplatino	Anticuerpo 1	Anticuerpo 1 y cisplatino
14	128,45 (± 7,25)	122,65 (± 12,2)	109,35 (± 12,7)	127,17 (± 26,72)
19	182,92 (± 10,33)	190,65 (± 18,97)	173,95 (± 20,2)	167,94 (± 35,29)
22	269,83 (± 15,23)	289,15 (± 28,77)	234,58 (± 27,25)	218,81 (± 45,98)
26	507,66 (± 28,66)	484,72 (± 48,23)	364,42 (± 42,33)	349,81 (± 73,51)
32	904,66 (± 51,07)	806,31 (± 80,23)	739,26 (± 85,86)	530,63 (± 111,5)
35	1052,88 (± 59,44)	923,02 (± 91,85)	821,83 (± 95,45)	579,7 (± 121,81)
40	1143,39 (± 64,55)	941,42 (± 93,68)	1026,68 (± 119,25)	585,37 (± 123)
43	1382,03 (± 78,03)	1047,34 (± 104,22)	1098,72 (± 127,61)	626,99 (± 131,75)

Secuencias

Secuencia de aminoácidos de cadena pesada del anticuerpo 1: SEQ ID NO: 1

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYEFTSYWIHWVRQAPGQGLEWMGNISP
NSGSANYNEKFKSRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCAREGPYSYPS
REYYGSDLWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP
VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSN
TKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLGLG

Región variable de cadena pesada del anticuerpo 1: SEQ ID NO: 2

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYEFTSYWIHWVRQAPGQGLEWMGNISP
NSGSANYNEKFKSRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCAREGPYSYPS
REYYGSDLWGQGTLVTVSS

Secuencia de aminoácidos de cadena ligera del anticuerpo 1: SEQ ID NO: 3

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSSISNNLHWYQQKPGQAPRLLIYYTSRSVS
GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCGQNNEWPEVFGGGTKVEIKRTVAA
PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Región variable de cadena ligera del anticuerpo 1: SEQ ID NO: 4

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSSISNNLHWYQQKPGQAPRLLIYYTSRSVS
GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCGQNNEWPEVFGGGTKVEIK

Secuencia de ADN de cadena pesada del anticuerpo 1: SEQ ID NO: 5

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGTGTGCTGAAGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAG
TGAAGGTGTCCTGCAAGGCATCTGGCTACGAGTTCACCAGCTACTGGATTAC
TGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAAATATTTCTC
CTAATAGTGGTAGTGCTAACTACAATGAGAAGTTCAAGAGCAGAGTCACCAT
GACCAGGGACACGTCCACGAGCACAGTCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGA
TCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAGGGCCCTTACAGTTATTA
TCCGAGTAGGGAGTACTATGGCTCTGACCTCTGGGGGCAAGGGACCCTAGTC
ACAGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCGCTAGCGCCCTG
CTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGAC

TACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCG
GCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGC
AGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCA
ACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCA
AATATGGTCCCCCATGCCACCCTGCCAGCACCTGAGTTCCTGGGGGGACCA
TCAGTCTTCTGTTCCCCCAAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGAC
CCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTC
CAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGC
CGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTTCAGCGTCTCACCCT
CCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAAC
AAAGGCCTCCCGTCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGC
CCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAA
GAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATC
GCCGTGGAGTGGGAAAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATAAGACCACG
CCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAGGCTAACCGT
GGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAT
GAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGT

Secuencia de ADN de cadena ligera del anticuerpo 1: SEQ ID NO: 6

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAG
AGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAAAGTATCAGCAATAACCTACACTGG
TACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATTATACTTCCCG
GTCCGTCTTGCCATCCCAGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACT
TCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGT
GGACAGAATAACGAGTGGCCTGAGGTGTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAG
ATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGA
GCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATC
CCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAA
CTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTC
AGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTAC
GCCTGCGAAGTCAACCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAAAAGAGCTTCA
ACAGGGGAGAGTGC

LCDR1 del anticuerpo 1/anticuerpo 2: SEQ ID NO: 7
RASQISNNLH

LCDR2 del anticuerpo 1/anticuerpo 2: SEQ ID NO: 8
YTSRSVS

LCDR3 del anticuerpo 1/anticuerpo 2: SEQ ID NO: 9
GQNNEWPEV

HCDR1 del anticuerpo 1/anticuerpo 2: SEQ ID NO: 10
GYEFTSYWIH

HCDR2 del anticuerpo 1/anticuerpo 2: SEQ ID NO: 11
NISPNSGSANYNEKFKS

HCDR3 del anticuerpo 1: SEQ ID NO: 12
EGPYSYPSREYYGSDL

Secuencia de aminoácidos de cadena pesada del anticuerpo 2: SEQ ID NO: 13

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYEFTSYWIHWVRQAPGQGLEWMGNISP
NSGSANYNEKFKSRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCAREGPYSYYP
RQYYGSDLWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP
VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNVDPKPSN
TKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVS
QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLGLG

Región variable de cadena pesada del anticuerpo 2: SEQ ID NO: 14

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYEFTSYWIHWVRQAPGQGLEWMGNISP
NSGSANYNEKFKSRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCAREGPYSYYP
RQYYGSDLWGQGLTVTVSS

Secuencia de aminoácidos de cadena ligera del anticuerpo 2: SEQ ID NO: 15

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQISINNLHWYQQKPGQAPRLLIYYTSRSVS
GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCGQNNEWPEVFGGGTKVEIKRTVAA
PSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

Región variable de cadena ligera del anticuerpo 2: SEQ ID NO: 16

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQISINNLHWYQQKPGQAPRLLIYYTSRSVS
GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCGQNNEWPEVFGGGTKVEIK

Secuencia de ADN de cadena pesada del anticuerpo 2: SEQ ID NO: 17

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGTGCTGAAGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAG
TGAAGGTGTCCTGCAAGGCATCTGGCTACGAGTTCACCAGCTACTGGATTAC
TGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAAATATTTCTC
CTAATAGTGGTAGTGCTAACTACAATGAGAAGTTCAAGAGCAGAGTCACCAT
GACCAGGGACACGTCCACGAGCACAGTCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGA

TCTGAGGACACGGCCGTGTACTACTGTGCGAGAGAGGGCCCTTACAGTTATTA
TCCGAGTAGGCAGTACTATGGCTCTGACCTCTGGGGGCAAGGGACCCTAGTC
ACAGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCGCTAGCGCCCTG
CTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGAC
TACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTTGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCG
GCGTGCACACCTTCCCGGTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGC
AGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCA
ACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCA
AATATGGTCCCCCATGCCACCCTGCCAGCACCTGAGTTCCTGGGGGGACCA
TCAGTCTTCTGTTCCCCCAAAAACCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGAC
CCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTC
CAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGC
CGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTTCAGCGTCTCACCGT
CCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAAC
AAAGGCCTCCCGTCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGC
CCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCAGGAGGAGATGACCAA
GAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATC
GCCGTGGAGTGGGAAAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCAG
CCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAGGCTAACCGT
GGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAT
GAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGT

Secuencia de ADN de cadena ligera del anticuerpo 2: SEQ ID NO: 18

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAG
AGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAAAGTATCAGCAATAACCTACACTGG
TACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATTATACTTCCCG
GTCCGTCTCTGGCATCCCAGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACT
TCACTCTACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGT
GGACAGAATAACGAGTGGCCTGAGGTGTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAG
ATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGA
GCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATC
CCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAA
CTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTC
AGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTAC
GCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCA
ACAGGGGAGAGTGC

HCDR3 del anticuerpo 2: SEQ ID NO: 19
EGPYSYPSRQYYGSDL

Secuencia consenso de HCDR3: SEQ ID NO: 20
EGPYSYPSRXaaYYGSDL
en la que Xaa es E o Q

Gro-alfa humana (CXCL1): SEQ ID NO: 21

ASVATELRCQCLQTLQGIHPKNIQSVNVKSPGPHCAQTEVIATLKNGRKAACLNPA
SPIVKKIIEKMLNSDKSN

Gro-beta humana (CXCL2): SEQ ID NO: 22

APLATELRCQCLQTLQGIHLKNIQSVKVKSPGPHCAQTEVIATLKNGQKACLNPA
SPMVKKIIEKMLKNGKSN

Gro-gamma humana (CXCL3): SEQ ID NO: 23

ASVVTELRCQCLQTLQGIHLKNIQSVNVRSPGPHCAQTEVIATLKNGKKACLNPA
SPMVQKIIEKILNKGSTN

ENA-78 humana (CXCL5): SEQ ID NO: 24

AAVLRELRCVCLQTTQGVHPKMISNLQVFAIGPQCSKVEVVASLKNGKEICLDPE
APFLKKVIQKILDGGNKEN

GCP-2 humana (CXCL6): SEQ ID NO: 25

VSAVLTELRCCTCLRVTLRVNPKTIGKLQVFPAGPQCSKVEVVASLKNGKQVCLD
PEAPFLKKVIQKILDGSGNKKN

NAP-2 humana (CXCL7): SEQ ID NO: 26

AELRCMCIKTTSGIHPKNIQSLEVIGKGTNCNQEVIATLKDGRKICLDPDAPRIK
KIVQKKLAGDESAD

IL-8 humana (CXCL8): SEQ ID NO: 27

SAKELRCQCIKTYSKPFHPKFIKELRVIESGPHCANTEIIVKLSDGRELCLDPKENW
VQRVVEKFLKRAENS

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Eli Lilly and Company

<120> Anticuerpos de quimiocinas pan-ELR⁺ CXC

<130>X19897

<150> 61/792800

<151> 15-03-2013

<150> PCT/US2014/020605

<151> 05-03-2014

<160> 27

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 452

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> construcción sintética

<400> 1

ES 2 769 123 T3

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

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

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

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

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Gly Pro Tyr Ser Tyr Tyr Pro Ser Arg Glu Tyr Tyr Gly
 100 105 110

Ser Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 115 120 125

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr
 130 135 140

ES 2 769 123 T3

Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
 145 150 155 160

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
 165 170 175

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
 180 185 190

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr
 195 200 205

Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val
 210 215 220

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe
 225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 260 265 270

Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
 290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser
 325 330 335

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
 355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 385 390 395 400

ES 2 769 123 T3

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
 405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 435 440 445

Leu Ser Leu Gly
 450

<210> 2

<211> 126

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> construcción sintética

<400> 2

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

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

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

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

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Gly Pro Tyr Ser Tyr Tyr Pro Ser Arg Glu Tyr Tyr Gly
 100 105 110

Ser Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 3

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> construcción sintética

ES 2 769 123 T3

<400> 3

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Asn
 20 25 30

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

Tyr Tyr Thr Ser Arg Ser Val Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Gln Asn Asn Glu Trp Pro Glu
 85 90 95

Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 4
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 769 123 T3

<220>

<223> construcción sintética

<400> 4

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Asn
20 25 30

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

Tyr Tyr Thr Ser Arg Ser Val Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Gln Asn Asn Glu Trp Pro Glu
85 90 95

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

<210> 5

<211> 1356

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> construcción sintética

<400> 5

ES 2 769 123 T3

caggtgcagc tgggtgcagtc tgggtgctgaa gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtg 60
 tcctgcaagg catctggcta cgagttcacc agctactgga ttcactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggaaat atttctccta atagtggtag tgctaactac 180
 aatgagaagt tcaagagcag agtcaccatg accagggaca cgtccacgag cacagtctac 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagagggc 300
 ccttacagtt attatccgag tagggagtac tatggctctg acctctgggg gcaagggacc 360
 ctagtcacag tctcctcagc ctccaccaag ggcccatcgg tcttcccgt agcgcctgc 420
 tccaggagca cctccgagag cacagccgcc ctgggctgcc tgggtcaagga ctacttcccc 480

 gaaccggtga cgggtgtcgtg gaactcaggc gccctgacca gcggcgtgca caccttcccc 540
 gctgtcctac agtcctcagg actctactcc ctccagcagc tgggtgaccgt gccctccagc 600
 agcttgggca cgaagaccta cacctgcaac gtagatcaca agcccagcaa caccaaggtg 660
 gacaagagag ttgagtccaa atatgggtccc ccatgcccac cctgcccagc acctgagttc 720
 ctgggggggac catcagtcct cctgttcccc ccaaaaccca aggacactct catgatctcc 780
 cggaccctc aggtcacgtg cgtgggtggtg gacgtgagcc aggaagacc cggaggtccag 840
 ttcaactggt acgtggatgg cgtggaggtg cataatgcca agacaaaagcc gcgggaggag 900
 cagttcaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtccctcaccg tcctgcacca ggactggctg 960
 aacggcaagg agtacaagtg caaggtctcc aacaaaggcc tcccgtcctc catcgagaaa 1020
 accatctcca aagccaaagg gcagccccga gagccacagg tgtacaccct gccccatcc 1080
 caggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctacccc 1140
 agcgacatcg ccgtggagtg ggaaagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg 1200
 cctcccgtgc tggactccga cggctccttc ttctctaca gcaggctaac cgtggacaag 1260
 agcaggtggc aggaggggaa tgtcttctca tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac 1320
 cactacacac agaagagcct ctccctgtct ctgggt 1356

<210> 6
 <211> 642
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> construcción sintética

<400> 6

ES 2 769 123 T3

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca aagtatcagc aataacctac actggtacca acagaaacct 120
 ggccaggctc ccaggctcct catctattat acttcccggc cgtctctgg catcccagcc 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240
 gaagattttg cagtttatta ctgtggacag aataacgagt ggcctgaggt gttcggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa acgaactgtg gctgcacat ctgtttcat attcccgcca 360
 tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
 cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggt gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gc 642

<210> 7
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> construcción sintética
 <400> 7

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Asn Leu His
 1 5 10

<210> 8
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> construcción sintética
 <400> 8

Tyr Thr Ser Arg Ser Val Ser
 1 5

<210> 9
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> construcción sintética
 <400> 9

Gly Gln Asn Asn Glu Trp Pro Glu Val
 1 5

<210> 10
 <211> 10
 <212> PRT

ES 2 769 123 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> construcción sintética

<400> 10

Gly Tyr Glu Phe Thr Ser Tyr Trp Ile His
1 5 10

<210> 11

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> construcción sintética

<400> 11

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

Ser

<210> 12

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> construcción sintética

<400> 12

Glu Gly Pro Tyr Ser Tyr Tyr Pro Ser Arg Glu Tyr Tyr Gly Ser Asp
1 5 10 15

Leu

<210> 13

<211> 452

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> construcción sintética

<400> 13

ES 2 769 123 T3

Ala Arg Glu Gly Pro Tyr Ser Tyr Tyr Pro Ser Arg Gln Tyr Tyr Gly
100 105 110

Ser Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
115 120 125

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr
130 135 140

Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
145 150 155 160

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
165 170 175

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
180 185 190

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr
195 200 205

Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val
210 215 220

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe
225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
260 265 270

Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser
325 330 335

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
340 345 350

ES 2 769 123 T3

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Leu Gly
450

<210> 14

<211> 126

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> construcción sintética

<400> 14

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

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

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

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

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

ES 2 769 123 T3

Ala Arg Glu Gly Pro Tyr Ser Tyr Tyr Pro Ser Arg Gln Tyr Tyr Gly
100 105 110

Ser Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 15

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> construcción sintética

<400> 15

ES 2 769 123 T3

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

<210> 16
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 769 123 T3

<220>

<223> construcción sintética

<400> 16

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Asn
 20 25 30

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

Tyr Tyr Thr Ser Arg Ser Val Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Gln Asn Asn Glu Trp Pro Glu
 85 90 95

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

<210> 17

<211> 1356

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> construcción sintética

<400> 17

caggtgcagc tgggtgcagtc tgggtgctgaa gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtg 60

tcctgcaagg catctggcta cgagttcacc agctactgga ttcactgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggaaat atttctccta atagtggtag tgctaactac 180

ES 2 769 123 T3

aatgagaagt tcaagagcag agtcacccatg accagggaca cgtccacgag cacagtctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagagggc 300
ccttacagtt attatccgag taggcagtac tatggctctg acctctgggg gcaagggacc 360
ctagtcacag tctcctcagc ctccaccaag ggcccatcgg tcttcccgtc agcgcctcgc 420
tccaggagca cctccgagag cacagccgcc ctgggctgcc tggtaagga ctacttcccc 480
gaaccggtga cgggtgctg gaactcaggc gccctgacca gcggcgtgca caccttcccc 540
gctgtcctac agtcctcagg actctactcc ctccagcagc tggtaaccgt gccctccagc 600
agcttgggca cgaagacct cacctgcaac gtagatcaca agcccagca caccaaggtg 660
gacaagagag ttgagtccaa atatggtccc ccatgccac cctgccagc acctgagttc 720
ctggggggac catcagtctt cctgttcccc ccaaaacca aggacactct catgatctcc 780
cggacccctg aggtcacgtg cgtgggtggtg gacgtgagcc aggaagacct cgaggtccag 840
ttcaactggt acgtggatgg cgtggaggtg cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag 900
cagttcaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg 960
aacggcaagg agtacaagt caaggtctcc aacaaaggcc tcccgtcctc catcgagaaa 1020
accatctcca aagccaaagg gcagccccga gagccacagg tgtacacct gcccccctcc 1080
caggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tggtaaaagg cttctacccc 1140
agcgacatcg ccgtggagt ggaaagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg 1200
cctcccgtgc tggactccga cggctccttc ttctctaca gcaggctaac cgtggacaag 1260
agcaggtggc aggaggggaa tgtcttctca tgctccgtga tgcataggc tctgcacaac 1320
cactacacac agaagagcct ctccctgtct ctgggt 1356

<210> 18

<211> 642

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> construcción sintética

<400> 18

ES 2 769 123 T3

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtc aagtatcagc aataacctac actggtacca acagaaacct 120
ggccaggctc ccaggctcct catctattat acttcccggc cgtctctggt catcccagcc 180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240
gaagattttg cagtttatta ctgtggacag aataacgagt ggcctgaggt gttcggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa acgaactgtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcc 360
tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgtttgtg gcctgctgaa taacttctat 420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gc 642

<210> 19
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> construcción sintética

<400> 19

Glu Gly Pro Tyr Ser Tyr Tyr Pro Ser Arg Gln Tyr Tyr Gly Ser Asp
1 5 10 15

Leu

<210> 20
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> construcción sintética

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (11)..(11)
<223> La posición 11 Xaa es Glu o Gln

<400> 20

Glu Gly Pro Tyr Ser Tyr Tyr Pro Ser Arg Xaa Tyr Tyr Gly Ser Asp
1 5 10 15

Leu

<210> 21
<211> 73
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

ES 2 769 123 T3

<400> 21

Ala Ser Val Ala Thr Glu Leu Arg Cys Gln Cys Leu Gln Thr Leu Gln
 1 5 10 15

Gly Ile His Pro Lys Asn Ile Gln Ser Val Asn Val Lys Ser Pro Gly
 20 25 30

Pro His Cys Ala Gln Thr Glu Val Ile Ala Thr Leu Lys Asn Gly Arg
 35 40 45

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

Lys Met Leu Asn Ser Asp Lys Ser Asn
 65 70

<210> 22

<211> 73

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 22

Ala Pro Leu Ala Thr Glu Leu Arg Cys Gln Cys Leu Gln Thr Leu Gln
 1 5 10 15

Gly Ile His Leu Lys Asn Ile Gln Ser Val Lys Val Lys Ser Pro Gly
 20 25 30

Pro His Cys Ala Gln Thr Glu Val Ile Ala Thr Leu Lys Asn Gly Gln
 35 40 45

Lys Ala Cys Leu Asn Pro Ala Ser Pro Met Val Lys Lys Ile Ile Glu
 50 55 60

Lys Met Leu Lys Asn Gly Lys Ser Asn
 65 70

<210> 23

<211> 73

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 23

ES 2 769 123 T3

Ala Ser Val Val Thr Glu Leu Arg Cys Gln Cys Leu Gln Thr Leu Gln
 1 5 10 15

Gly Ile His Leu Lys Asn Ile Gln Ser Val Asn Val Arg Ser Pro Gly
 20 25 30

Pro His Cys Ala Gln Thr Glu Val Ile Ala Thr Leu Lys Asn Gly Lys
 35 40 45

Lys Ala Cys Leu Asn Pro Ala Ser Pro Met Val Gln Lys Ile Ile Glu
 50 55 60

Lys Ile Leu Asn Lys Gly Ser Thr Asn
 65 70

<210> 24
 <211> 74
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 24

Ala Ala Val Leu Arg Glu Leu Arg Cys Val Cys Leu Gln Thr Thr Gln
 1 5 10 15

Gly Val His Pro Lys Met Ile Ser Asn Leu Gln Val Phe Ala Ile Gly
 20 25 30

Pro Gln Cys Ser Lys Val Glu Val Val Ala Ser Leu Lys Asn Gly Lys
 35 40 45

Glu Ile Cys Leu Asp Pro Glu Ala Pro Phe Leu Lys Lys Val Ile Gln
 50 55 60

Lys Ile Leu Asp Gly Gly Asn Lys Glu Asn
 65 70

<210> 25
 <211> 75
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 25

ES 2 769 123 T3

Val Ser Ala Val Leu Thr Glu Leu Arg Cys Thr Cys Leu Arg Val Thr
 1 5 10 15

Leu Arg Val Asn Pro Lys Thr Ile Gly Lys Leu Gln Val Phe Pro Ala
 20 25 30

Gly Pro Gln Cys Ser Lys Val Glu Val Val Ala Ser Leu Lys Asn Gly
 35 40 45

Lys Gln Val Cys Leu Asp Pro Glu Ala Pro Phe Leu Lys Lys Val Ile
 50 55 60

Gln Lys Ile Leu Asp Ser Gly Asn Lys Lys Asn
 65 70 75

<210> 26
 <211> 70
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 26

Ala Glu Leu Arg Cys Met Cys Ile Lys Thr Thr Ser Gly Ile His Pro
 1 5 10 15

Lys Asn Ile Gln Ser Leu Glu Val Ile Gly Lys Gly Thr His Cys Asn
 20 25 30

Gln Val Glu Val Ile Ala Thr Leu Lys Asp Gly Arg Lys Ile Cys Leu
 35 40 45

Asp Pro Asp Ala Pro Arg Ile Lys Lys Ile Val Gln Lys Lys Leu Ala
 50 55 60

Gly Asp Glu Ser Ala Asp
 65 70

<210> 27
 <211> 72
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 27

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo que neutraliza Gro-alfa, Gro-beta, Gro-gamma, ENA-78, GCP-2, NAP-2 e IL-8 humanas, en el que el anticuerpo se une a IL-8 (SEQ ID NO: 27) en los siguientes aminoácidos: Arg 6, Ile 10, Ala 35, Ile 40.

5 2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo se une adicionalmente a IL-8 (SEQ ID NO: 27) en Leu 49.