

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 905 545**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

C07K 16/40 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.01.2011** **E 18185298 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.10.2021** **EP 3459564**

54 Título: **Proteínas de unión a calicreína plasmática**

30 Prioridad:

06.01.2010 US 29261410 P

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

11.04.2022

73 Titular/es:

TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED
(100.0%)

1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku
Osaka-shi, Osaka, JP

72 Inventor/es:

SEXTON, DANIEL J. y
VISWANATHAN, MALINI

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 905 545 T3

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

DESCRIPCIÓN

Proteínas de unión a calicreína plasmática

Antecedentes

La calicreína plasmática es una serina proteasa. La precalicreína es el precursor de la calicreína plasmática.

5 Sumario

La calicreína plasmática es un componente de serina proteasa del sistema de contacto y una posible diana de fármacos para diferentes enfermedades inflamatorias, cardiovasculares, infecciosas (septicemia) y de oncología (Sainz I.M. et al., Thromb Haemost 98, 77-83, 2007). El sistema de contacto se activa por cualquier factor XIIa tras la exposición a superficies extrañas o negativamente cargadas o sobre superficies de células endoteliales por proilicarboxipeptidasas (FIGURA 1) (Sainz I.M. et al., Thromb Haemost 98, 77-83, 2007). La activación de la calicreína plasmática amplifica la coagulación intrínseca mediante su activación de factor XII de retroalimentación y potencia la inflamación mediante la producción del nonapéptido proinflamatorio bradiquinina. Como cininogenasa primaria en la circulación, la calicreína plasmática es ampliamente responsable de la generación de bradiquinina en la vasculatura. Una deficiencia genética en la proteína inhibidora de C1 (C1-INH), el principal inhibidor natural de la calicreína plasmática, conduce a angioedema hereditario (AEH). Los pacientes con AEH padecen ataques agudos de edema doloroso, frecuentemente precipitados por desencadenantes desconocidos (Zuraw B.L. et al., N Engl J Med 359, 1027-1036, 2008). Mediante el uso de agentes farmacológicos o estudios genéticos en modelos animales, el sistema calicreína plasmática-cinina (KKS plasmático) participa en diversas enfermedades.

El documento WO 2005/075665 describe una KLKB1 humana que se asocia con trastornos cardiovasculares, trastornos hormonales y del sistema endocrino, enfermedades metabólicas, enfermedades gastrointestinales y hepáticas, enfermedades inflamatorias, trastornos cancerosos, trastornos musculoesqueléticos, trastornos neurológicos y trastornos urológicos.

Las proteínas de unión a calicreína plasmática (por ejemplo, anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos inhibidores) son agentes terapéuticos útiles para una variedad de enfermedades y afecciones, por ejemplo, enfermedades y afecciones que implican la actividad de calicreína plasmática, debido a su alta potencia, especificidad y prolongada residencia en el suero. La alta potencia se puede traducir en eficacia y una baja dosificación de fármaco, y la alta especificidad puede reducir los efectos secundarios debido a la inhibición de serina proteasas inespecíficas relacionadas. En general, las serina proteasas de molécula pequeña no son tan específicas como los inhibidores de anticuerpos. La prolongada residencia en el suero puede permitir dosificación poco frecuente.

En algunos aspectos, la invención se refiere a una proteína aislada (por ejemplo, anticuerpo, por ejemplo, anticuerpo humano) que se une a la forma activa de calicreína plasmática (por ejemplo, calicreína plasmática humana y/o calicreína plasmática de ratón) y, por ejemplo, no se une a precalicreína plasmática (por ejemplo, precalicreína plasmática humana y/o precalicreína plasmática de ratón), como se define en las reivindicaciones.

La invención proporciona un ácido o ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en:

(i) un anticuerpo que comprende una secuencia VH de

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYIMMWVRQAPGKGLEWVSGIYSS
GGITVYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAYRRIGVPRRDE
FDIWGQGTMTVTVSS

y una secuencia VL de

(ii) un anticuerpo que comprende una secuencia VH de

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYIMMWVRQAPGKGLEWVSGIYSS
GGITVYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAYRRRTGIPRRDA
FDIWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS

y una secuencia VL de

(iii) un anticuerpo que comprende una secuencia VH de

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYLMTWVRQAPGKGLEWVSYISPS
GGHTIYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVARGIAARSR
TSYFDYWGQGTLVTVSS

y una secuencia VL de

EIVLTQSPGTL SLSPGERATLSCRTSQFVNSNYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSR
ATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQSSRTPWTFGQGTKVEIK;

(iv) un anticuerpo que comprende una secuencia VH de

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYLMTWVRQAPGKGLEWVSYISPS
GGHTIYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVARGIAARSR
TSYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS

y una secuencia VL de

QDIQMTQSPGTL SLSPGERATLSCRTSQFVNSNYLAWYQQTPGQAPRLLIYGASS
RATGIPDRFSGTGYGTDFTLTISRLEPEDYGTYYCQQSSRTPWTFGQGTRVEIK;

(v) un anticuerpo que comprende una secuencia VH de

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYLMTWVRQAPGKGLEWVSYISPS
GGHTIYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVARGIAARSR
TSYFDYWGQGTLVTVSS

y una secuencia VL de

EIVLTQSPGTL SLSPGERATLSCRTSQFVNSNYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSR
ATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQSSRTPWTFGQGTKVEIK;

(vi) un anticuerpo que comprende una secuencia VH de

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYLMTWVRQAPGKGLEWVSYISPS
GGHTIYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVARGIAARSR
TSYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS

y una secuencia VL de

QDIQMTQSPSFLSASV GDRVITITCRASQGISSYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASL
QSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQQLNSYPLTFGGGKVEIK;

(vii) un anticuerpo que comprende una secuencia VH de

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSAYSMIWVRQAPGKGLEWVSYIRPS
GGRTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGLLLWFR
LKSNYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS

y una secuencia VL de

QDIQMTQSPSSLSAFV GDRVITITCRASQPIDNYLNWYHQKPGKAPKLLIYAASRL
QSGVPSRSLSGSGFGTDFTLTISLQPEDFGNYYCQQSYTPYTFGGGKVEIR;

(viii) un anticuerpo que comprende una secuencia VH de

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSAYSMIWVRQAPGKGLEWVSYIRPS
GGRTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGLLLWNRE
LKSNYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS

y una secuencia VL de

QDIQMTQSPSSLSAFV GDRVITITCRASQPIDNYLNWYHQKPGKAPKLLIYAASRL
QSGVPSRSLSGSGFGTDFTLTISLQPEDFGNYYCQQSYTPYTFGGGKVEIR;

(ix) un anticuerpo que comprende una secuencia VH de

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSAYSMIWVRQAPGKGLEWVSYIRPS
GGRTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGLLLWARE
LKSNYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS

y una secuencia VL de

QDIQMTQSPSSLSAFVGDRVITTCRASQPIDNYLNWYHQKPGKAPKLLIYAASRL
QSGVPSRLSGSGFGTDFTLTISLQPEDFGNYCQQSYTPYTFGGGTKVEIR;

5 (x) un anticuerpo que comprende una secuencia VH de

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYLMTWVRQAPGKGLEWVSYISPS
GGHTIYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAMVGQGIRGRSR
TSYFAQWGQGTLVTVSS

y una secuencia VL de

EIVLTQSPGTL SLSPGERATLSCRTS QFVNSNYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSR
ATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQSSRTPWTFGQGTKVEIK;

(xi) un anticuerpo que comprende una secuencia VH de

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYLMTWVRQAPGKGLEWVSSIVPS
GGHTHYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVARGIAARS
RTSYFDYWGQGTLVTVSS

10

y una secuencia VL de

EIVLTQSPGTL SLSPGERATLSCRTS QFVNSNYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSR
ATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQSSRTPWTFGQGTKVEIK;

(xii) un anticuerpo que comprende una secuencia VH de

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYLMTWVRQAPGKGLEWVSYISPS
GGHTIYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVAQGIAARSR

15

TSSVDQWGQGTLVTVSS

y una secuencia VL de

EIVLTQSPGTL SLSPGERATLSCRTS QFVNSNYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSR
ATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQSSRTPWTFGQGTKVEIK;

(xiii) un anticuerpo que comprende una secuencia VH de

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYLMTWVRQAPGKGLEWVSYISPS
GGHTIYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVAQGISARSR
TSYFDYWGQGTLVTVSS

20

y una secuencia VL de

EIVLTQSPGTL SLSPGERATLSCRTS QFVNSNYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSR
ATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQSSRTPWTFGQGTKVEIK;

(xiv) un anticuerpo que comprende una secuencia VH de

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYIMMWVRQAPGKGLEWVSGIYSS
GGITVYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAWRRIGVPRRDS
FDMWGQGTMTVTVSS

y una secuencia VL de

DIQMTQSPSTLSASVGDRVITTCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASTLES
GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYCQQYNTYWTFGQGTKVEIK;

(xv) un anticuerpo que comprende una secuencia VH de

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYSMHWVRQAPGKGLEWVSSIYPSR
GMTWYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAYRRTGIPRRDA
FDIWGQGTMTVSS

y una secuencia VL de

DIQMTQSPSTLSASVGDRVITTCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASTLES
GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYCQQYNTYWTFGQGTKVEIK;

5

(xvi) un anticuerpo que comprende una secuencia VH de

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYIMMWVRQAPGKGLEWVSGIYSS
GGITVYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAYRRTGVPRRDE
FDIWGQGTMTVSS

y una secuencia VL de

DIQMTQSPSTLSASVGDRVITTCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASTLES
GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYCQQYNTYWTFGQGTKVEIK;

10

(xvii) un anticuerpo que comprende una secuencia VH de

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSWYTMVWVRQAPGKGLEWVSYIYP
SGGATFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAMGSYDIYWG
FYSDHWGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS

y una secuencia VL de

QSALTQPPTVSVSPGQTARITCSGNKLGDKYVAWYQQKPGQSPMLVIYQDTRP
SRVSEFSGSNSANTATLSISGTQALDEADYYCQAWDSSIVIFGGGTRLTVL;

15

(xviii) un anticuerpo que comprende una secuencia VH de

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYRMSWVRQAPGKGLEWVSSIYPS
GGRTVYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDKFEWRLLF
RGIGNDAFDIWGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS

y una secuencia VL de

QSVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYTSWYQQRPGQSPVLVIYQDIKRPS
GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSPNARVFGSGTKVTVL.

20 La invención proporciona además un vector o vectores que comprenden el ácido o ácidos nucleicos de la invención.

La invención proporciona además una célula hospedadora que comprende el ácido o ácidos nucleicos de la invención o el vector o vectores de la invención.

La invención proporciona además un método para producir un anticuerpo que se une a la forma activa de la calicreína plasmática humana y no se une a la precalicreína humana, que comprende

25 cultivar la célula hospedadora de la invención en un medio de cultivo, para producir de esta manera el anticuerpo.

En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática se une al mismo epítipo o compite por la unión con una proteína de unión a calicreína descrita en el presente documento. En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática se une al mismo epítipo o compite por la unión con una proteína (por ejemplo, epi-Kal2) y/o una molécula pequeña (por ejemplo, AEBF) descrita en el presente documento y no se une a precalicreína plasmática.

30

La proteína descrita en el presente documento se selecciona del grupo que consiste en M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01 (también denominadas en el presente documento DX-2922), X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X115-G04, M29-D09, M145-D11, M06-D09 y M35-G04.

- 5 En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática compite con o se une al mismo epítipo que X81-B01 y, por ejemplo, no se une a precalicreína plasmática.

En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática compite con o se une al mismo epítipo que X67-D03 y, por ejemplo, no se une a precalicreína plasmática.

- 10 En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática compite con o se une al mismo sitio que X101-A01 y, por ejemplo, no se une a precalicreína plasmática.

En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática compite con o se une al mismo sitio que M162-A04 y, por ejemplo, no se une a precalicreína plasmática.

En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática compite con o se une al mismo sitio que X63-G06 y, por ejemplo, no se une a precalicreína plasmática.

- 15 En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática no se une a precalicreína (por ejemplo, precalicreína humana y/o precalicreína de ratón), pero se une a la forma activa de calicreína plasmática (por ejemplo, calicreína plasmática humana y/o calicreína plasmática de ratón).

- 20 En ciertas realizaciones, la proteína se une en o cerca del sitio activo del dominio catalítico de calicreína plasmática, o un fragmento de la misma, o se une al epítipo que solapa con el sitio activo de calicreína plasmática y, por ejemplo, no se une a precalicreína plasmática.

En algunas realizaciones, la proteína se une a uno o más aminoácidos que forman la triada catalítica de calicreína plasmática: His434, Asp483 y/o Ser578 (numeración basada en la secuencia humana) y, por ejemplo, no se une a precalicreína plasmática.

- 25 En algunas realizaciones, la proteína se une a uno o más aminoácidos de: Ser479, Tyr563 y/o Asp585 (numeración basada en la secuencia humana) y, por ejemplo, no se une a precalicreína plasmática.

- 30 En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática se une a uno o más aminoácidos de: Arg551, Gln553, Tyr555, Thr558 y/o Arg560 (numeración basada en la secuencia de calicreína humana). En otros casos, la proteína de unión a calicreína plasmática se une a dos, tres, cuatro o cinco (es decir, todos) los aminoácidos de: Arg551, Gln553, Tyr555, Thr558 y/o Arg560 (numeración basada en la secuencia humana) y, por ejemplo, no se une a precalicreína plasmática.

En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática se une a uno o más aminoácidos de: S478, N481, S525 y K526 (numeración basada en la secuencia de calicreína humana). En otros casos, la proteína de unión a calicreína plasmática se une a dos, tres o cuatro (es decir, todos) los aminoácidos de: S478, N481, S525 y K526 (numeración basada en la secuencia de calicreína humana).

- 35 En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática disminuye la producción de factor XIIa y/o bradiquinina en más de aproximadamente 5 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 25 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 35 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 45 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 55 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 65 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, o aproximadamente 95 % en comparación con un patrón, por ejemplo, la producción de factor XIIa y/o bradiquinina en las mismas condiciones pero en ausencia de la proteína.

En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática tiene una constante de inhibición aparente ($K_{i,ap}$) inferior a 1000, 500, 100, 10, 1, 0,5 o 0,2 nM.

- 45 En una realización, las secuencias del dominio variable de HC y LC son componentes de la misma cadena de polipéptidos.

En otra realización, las secuencias del dominio variable de HC y LC son componentes de diferentes cadenas de polipéptidos. Por ejemplo, la proteína de unión a calicreína plasmática es una IgG, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. La proteína de unión a calicreína plasmática puede ser un Fab soluble (sFab).

- 50 En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática tiene un tiempo de residencia en suero de 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas o más, *in vivo*, por ejemplo, en seres humanos. En un caso, la proteína de unión a calicreína plasmática es una IgG, por ejemplo, una IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, que tiene un tiempo de residencia en suero de 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas o más *in vivo*, por ejemplo, en seres humanos.

En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática se asocia físicamente con un resto que mejora el tiempo de residencia en suero, por ejemplo, un resto descrito en el presente documento.

En otras realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática incluye un Fab2', scFv, minicuerpo, fusión scFv::Fc, fusión Fab::HSA, fusión HSA::Fab, fusión Fab::HSA::Fab, u otra molécula que comprende el sitio de combinación del antígeno de una de las proteínas de unión en el presente documento. Las regiones VH y VL de estos Fab se pueden proporcionar como IgG, Fab, Fab2, Fab2', scFv, Fab PEGilado, scFv PEGilado, Fab2 PEGilado, VH::CH1::HSA+LC, HSA::VH::CH1+LC, LC::HSA+VH::CH1, HSA::LC+VH::CH1, u otra construcción apropiada.

En una realización, la proteína de unión a calicreína plasmática es un anticuerpo humano o humanizado o es no inmunogénica en un humano. Por ejemplo, la proteína incluye una o más regiones estructurales de anticuerpo humano, por ejemplo, todas las regiones estructurales humanas.

En una realización, la proteína de unión a calicreína plasmática incluye un dominio Fc humano, o un dominio Fc que es al menos 95, 96, 97, 98 o 99 % idéntico a un dominio Fc humano.

En una realización, la proteína de unión a calicreína plasmática es un anticuerpo de primate o primatizado o es no inmunogénica en un humano. Por ejemplo, la proteína incluye una o más regiones estructurales de anticuerpo de primate, por ejemplo, todas las regiones estructurales de primate.

En una realización, la proteína de unión a calicreína plasmática incluye un dominio Fc de primate, o un dominio Fc que es al menos 95, 96, 97, 98 o 99 % idéntico a un dominio Fc de primate. "Primate" incluye seres humanos (*Homo sapiens*), chimpancés (*Pan troglodytes* y *Pan paniscus* (bonobos)), gorilas (*Gorilla gorilla*), gibones, monos, lemures, aye-ayes (*Daubentonia madagascariensis*) y tarseros.

En una realización, la proteína de unión a calicreína plasmática incluye regiones estructurales humanas, o regiones estructurales que son al menos 95, 96, 97, 98 o 99 % idénticas a regiones estructurales humanas.

En ciertas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática no incluye secuencias de ratones o conejos (por ejemplo, no es un anticuerpo murino o de conejo).

En ciertas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática es capaz de unirse a una célula o tejido, por ejemplo, que expresa calicreína plasmática.

En una realización, la proteína de unión a calicreína plasmática se asocia físicamente con una nanopartícula, y se puede usar para guiar una nanopartícula a una célula o tejido que expresa calicreína plasmática.

En ocasiones, la divulgación caracteriza una proteína aislada (por ejemplo, anticuerpo, por ejemplo, anticuerpo humano) que se une al mismo epítipo o compite por la unión con una proteína de unión a calicreína descrita en el presente documento.

En ocasiones, la proteína se une al mismo epítipo o compite por la unión con una proteína (por ejemplo, epi-Kal2) y/o una molécula pequeña (por ejemplo, AEBSF) descrita en el presente documento.

En algunos casos, la proteína aislada comprende una secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena pesada y una secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena ligera, en la que:

la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena pesada comprende una, dos o tres (por ejemplo, tres) regiones CDR del dominio variable de la cadena pesada de una proteína descrita en el presente documento, y/o

la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena ligera comprende una, dos o tres (por ejemplo, tres) regiones CDR del dominio variable de la cadena ligera de una proteína descrita en el presente documento,

en la que la proteína se une a calicreína plasmática.

En ocasiones, la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena pesada comprende una, dos o tres (por ejemplo, tres) regiones CDR del dominio variable de la cadena pesada de M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X115-G04, M29-D09, M145-D11, M06-D09 y M35-G04.

En ocasiones, la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena ligera comprende una, dos o tres (por ejemplo, tres) regiones CDR del dominio variable de la cadena ligera de M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X115-G04, M29-D09, M145-D11, M06-D09 y M35-G04 (respectivamente).

En algunas realizaciones, la proteína inhibe calicreína plasmática (por ejemplo, calicreína plasmática humana y/o calicreína plasmática de ratón).

5 En algunos ejemplos, la una, dos o tres (por ejemplo, tres) regiones CDR del dominio variable de la cadena pesada son de X81-B01 y/o la una, dos o tres (por ejemplo, tres) regiones CDR del dominio variable de la cadena ligera son de X81-B01.

En algunos ejemplos, la una, dos o tres (por ejemplo, tres) regiones CDR del dominio variable de la cadena pesada son de X67-D03 y/o la una, dos o tres (por ejemplo, tres) regiones CDR del dominio variable de la cadena ligera son de X67-D03.

10 En algunos ejemplos, la una, dos o tres (por ejemplo, tres) regiones CDR del dominio variable de la cadena pesada son de X63-G06 y/o la una, dos o tres (por ejemplo, tres) regiones CDR del dominio variable de la cadena ligera son de X63-G06.

En algunos ejemplos, la una, dos o tres (por ejemplo, tres) regiones CDR del dominio variable de la cadena pesada son de M162-A04 y/o la una, dos o tres (por ejemplo, tres) regiones CDR del dominio variable de la cadena ligera son de MJ162-A04.

15 En algunas realizaciones, la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena pesada comprende el dominio variable de la cadena pesada de una proteína descrita en el presente documento y/o la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena ligera comprende el dominio variable de la cadena ligera de una proteína descrita en el presente documento.

20 La secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena pesada comprende el dominio variable de la cadena pesada de M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X115-G04, M29-D09 y M145-D11, y la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena ligera comprende el dominio variable de la cadena ligera de M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X115-G04, M29-D09 y M145-D11 (respectivamente).

25 En algunas realizaciones, la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena pesada comprende el dominio variable de la cadena pesada de X81-B01 y/o la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena ligera comprende el dominio variable de la cadena ligera de X81-B01.

30 En algunas realizaciones, la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena pesada comprende el dominio variable de la cadena pesada de X67-D03 y/o la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena ligera comprende el dominio variable de la cadena ligera de X67-D03.

En algunas realizaciones, la proteína comprende la cadena pesada de una proteína descrita en el presente documento y/o la cadena ligera de una proteína descrita en el presente documento.

35 En algunas realizaciones, la proteína comprende la cadena pesada de M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X115-G04, M29-D09 y M145-D11.

y la cadena ligera de M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X115-G04, M29-D09 y M145-D11 (respectivamente).

En algunas realizaciones, la proteína comprende la cadena pesada de X81-B01 y/o la cadena ligera de X81-B01.

40 En algunas realizaciones, la proteína comprende la cadena pesada de X67-D03 y/o la cadena ligera de X67-D03.

La proteína de unión a calicreína plasmática no se une a precalicreína (por ejemplo, precalicreína humana y/o precalicreína de ratón), pero se une a la forma activa de calicreína plasmática (por ejemplo, calicreína plasmática humana y/o calicreína plasmática de ratón).

45 En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática disminuye la producción de factor XIIa y/o bradiquinina en más de aproximadamente 5 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 25 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 35 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 45 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 55 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 65 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, o aproximadamente 95 % en comparación con un patrón, por ejemplo, la producción de factor XIIa y/o bradiquinina en las mismas condiciones pero en ausencia de la proteína.

50 En ocasiones, la proteína incluye una o más de las siguientes características: (a) una CDR humana o región estructural humana; (b) la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de HC comprende una o más (por ejemplo, 1, 2 o 3) CDR que son al menos 85, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 % idénticas a una

CDR de un dominio variable de HC descrito en el presente documento; (c) la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de LC comprende una o más (por ejemplo, 1, 2 o 3) CDR que son al menos 85, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 % idénticas a una CDR de un dominio variable de LC descrito en el presente documento; (d) la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de LC es al menos 85, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 % idéntica a un dominio variable de LC descrito en el presente documento (por ejemplo, en general o en regiones estructurales o CDR); (e) la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de HC es al menos 85, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 % idéntica a un dominio variable de HC descrito en el presente documento (por ejemplo, en general o en regiones estructurales o CDR); (f) la proteína se une a un epítipo unido por una proteína descrita en el presente documento, o compite por la unión con una proteína descrita en el presente documento; (g) una CDR de primate o región estructural de primate; (h) la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de HC comprende una CDR1 que se diferencia en al menos un aminoácido pero en no más de 2 o 3 aminoácidos de la CDR1 de un dominio variable de HC descrito en el presente documento; (i) la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de HC comprende una CDR2 que se diferencia en al menos un aminoácido pero en no más de 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 aminoácidos de la CDR2 de un dominio variable de HC descrito en el presente documento; (j) la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de HC comprende una CDR3 que se diferencia en al menos un aminoácido pero en no más de 2, 3, 4, 5 o 6 aminoácidos de la CDR3 de un dominio variable de HC descrito en el presente documento; (k) la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de LC comprende una CDR1 que se diferencia en al menos un aminoácido pero en no más de 2, 3, 4 o 5 aminoácidos de la CDR1 de un dominio variable de LC descrito en el presente documento; (l) la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de LC comprende una CDR2 que se diferencia en al menos un aminoácido pero en no más de 2, 3 o 4 aminoácidos de la CDR2 de un dominio variable de LC descrito en el presente documento; (m) la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de LC comprende una CDR3 que se diferencia en al menos un aminoácido pero en no más de 2, 3, 4 o 5 aminoácidos de la CDR3 de un dominio variable de LC descrito en el presente documento; (n) la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de LC se diferencia en al menos un aminoácido pero en no más de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos de un dominio variable de LC descrito en el presente documento (por ejemplo, en general o en regiones estructurales o CDR); y (o) la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de HC se diferencia en al menos un aminoácido pero en no más de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos de un dominio variable de HC descrito en el presente documento (por ejemplo, en general o en regiones estructurales o CDR).

En algunas realizaciones, la proteína tiene una constante de inhibición aparente ($K_{i,ap}$) inferior a 1000, 500, 100, 10, 1, 0,5 o 0,2 nM.

El anticuerpo no se une a precalicreína (por ejemplo, precalicreína humana y/o precalicreína de ratón), pero se une a la forma activa de calicreína plasmática (por ejemplo, calicreína plasmática humana y/o calicreína plasmática de ratón).

En una realización preferida, la proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene las cadenas ligeras y pesadas de anticuerpos seleccionados del grupo que consiste en M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X115-G04, M29-D09 y M145-D11.

En una realización preferida, la proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene la cadena pesada de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en: M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X115-G04, M29-D09 y M145-D11.

En una realización preferida, la proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene la cadena ligera de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en: M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X115-G04, M29-D09 y M145-D11.

La proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene las regiones variables de anticuerpos de las cadenas ligeras y pesadas de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X115-G04, M29-D09 y M145-D11.

La proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene una región variable de anticuerpo de la cadena pesada de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en: M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X115-G04, M29-D09 y M145-D11.

La proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene una región variable de anticuerpo de la cadena ligera de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en: M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X115-G04, M29-D09 y M145-D11.

- 5 En ocasiones, la proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2 o 3) CDR de la cadena pesada seleccionadas de las CDR correspondientes del grupo de cadenas pesadas que consiste en M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X115-G04, M29-D09, M145-D11, M06-D09 y M35-G04.
- 10 En ocasiones, la proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2 o 3) CDR de la cadena ligera seleccionadas de las CDR correspondientes del grupo de cadenas ligeras que consiste en M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X115-G04, M29-D09, M145-D11, M06-D09 y M35-G04.
- 15 En ocasiones, la proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2 o 3) CDR de la cadena pesada seleccionadas de las CDR correspondientes del grupo de cadenas pesadas que consiste en M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X115-G04, M29-D09, M145-D11, M06-D09 y M35-G04.
- 20 y una o más (por ejemplo, 1, 2 o 3) CDR de la cadena ligera seleccionadas de las CDR correspondientes del grupo de cadenas ligeras que consiste en M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X115-G04, M29-D09, M145-D11, M06-D09 y M35-G04 (respectivamente).
- En una realización preferida, la proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene las cadenas ligeras y pesadas de X81-B01.
- En una realización preferida, la proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene la cadena pesada de X81-B01.
- 25 En una realización preferida, la proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene la cadena ligera de X81-B01.
- En una realización preferida, la proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene las regiones variables de anticuerpos de las cadenas ligeras y pesadas de un anticuerpo seleccionado de X81-B01.
- En una realización preferida, la proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene una región variable de anticuerpo de la cadena pesada de X81-B01.
- 30 En una realización preferida, la proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene una región variable de anticuerpo de la cadena ligera de X81-B01.
- En ocasiones, la proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2 o 3) CDR de la cadena pesada de las CDR correspondientes de la cadena pesada de X81-B01.
- 35 En ocasiones, la proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2 o 3) CDR de la cadena ligera de las CDR correspondientes de la cadena ligera de X81-B01.
- En ocasiones, la proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2 o 3) CDR de la cadena pesada de la cadena pesada de X81-B01 y una o más (por ejemplo, 1, 2 o 3) CDR de la cadena ligera de las CDR correspondientes de la cadena ligera de X81-B01.
- 40 En una realización preferida, la proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene las cadenas ligeras y pesadas de X67-D03.
- En una realización preferida, la proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene la cadena pesada de X67-D03.
- En una realización preferida, la proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene la cadena ligera de X67-D03.
- 45 En una realización preferida, la proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene las regiones variables de anticuerpos de las cadenas ligeras y pesadas de un anticuerpo seleccionado de X67-D03.
- En una realización preferida, la proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene una región variable de anticuerpo de la cadena pesada de X67-D03.
- 50 En una realización preferida, la proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene una región variable de anticuerpo de la cadena ligera de X67-D03.

En un ejemplo preferido, la proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2 o 3) CDR de la cadena pesada de las CDR correspondientes de la cadena pesada de X67-D03.

En un ejemplo preferido, la proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2 o 3) CDR de la cadena ligera de las CDR correspondientes de la cadena ligera de X67-D03.

- 5 En un ejemplo preferido, la proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2 o 3) CDR de la cadena pesada de la cadena pesada de X67-D03 y una o más (por ejemplo, 1, 2 o 3) CDR de la cadena ligera de las CDR correspondientes de la cadena ligera de X67-D03.

En una realización, las secuencias del dominio variable de HC y LC son componentes de la misma cadena de polipéptidos.

- 10 En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática tiene un tiempo de residencia en suero de 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas o más, *in vivo*, por ejemplo, en seres humanos. En una realización, la proteína de unión a calicreína plasmática es una IgG, por ejemplo, una IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, que tiene un tiempo de residencia en suero de 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas o más *in vivo*, por ejemplo, en seres humanos.

- 15 En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática se asocia físicamente con un resto que mejora el tiempo de residencia en suero, por ejemplo, un resto descrito en el presente documento.

En otra realización, las secuencias del dominio variable de HC y LC son componentes de diferentes cadenas de polipéptidos. Por ejemplo, la proteína es una IgG, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. La proteína puede ser un Fab soluble (sFab).

- 20 En otras realizaciones, la proteína incluye un Fab2', scFv, minicuerpo, fusión scFv::Fc, fusión Fab::HSA, fusión HSA::Fab, fusión Fab::HSA::Fab, u otra molécula que comprende el sitio de combinación del antígeno de una de las proteínas de unión en el presente documento. Las regiones VH y VL de estos Fab se pueden proporcionar como IgG, Fab, Fab2, Fab2', scFv, Fab PEGilado, scFv PEGilado, Fab2 PEGilado, VH::CH1::HSA+LC, HSA::VH::CH1+LC, LC::HSA + VH::CH1, HSA::LC + VH::CH1, u otra construcción apropiada.

- 25 En una realización, la proteína es un anticuerpo humano o humanizado o es no inmunogénica en un humano. Por ejemplo, la proteína incluye una o más regiones estructurales de anticuerpo humano, por ejemplo, todas las regiones estructurales humanas.

En una realización, la proteína incluye un dominio Fc humano, o un dominio Fc que es al menos 95, 96, 97, 98 o 99 % idéntico a un dominio Fc humano.

- 30 En una realización, la proteína es un anticuerpo de primate o primatizado o es no inmunogénica en un humano. Por ejemplo, la proteína incluye una o más regiones estructurales de anticuerpo de primate, por ejemplo, todas las regiones estructurales de primate.

En una realización, la proteína incluye un dominio Fc de primate, o un dominio Fc que es al menos 95, 96, 97, 98 o 99 % idéntico a un dominio Fc de primate. "Primate" incluye seres humanos (*Homo sapiens*), chimpancés (*Pan troglodytes* y *Pan paniscus* (bonobos)), gorilas (*Gorilla gorilla*), gibones, monos, lemures, aye-ayes (*Daubentonia madagascariensis*) y tarseros.

- 35 En una realización, la proteína incluye regiones estructurales humanas, o regiones estructurales que son al menos 95, 96, 97, 98 o 99 % idénticas a regiones estructurales humanas.

En una realización, la proteína incluye regiones estructurales humanas, o regiones estructurales que son al menos 95, 96, 97, 98 o 99 % idénticas a regiones estructurales humanas.

- 40 En ciertas realizaciones, la proteína no incluye secuencias de ratones o conejos (por ejemplo, no es un anticuerpo murino o de conejo).

En ciertas realizaciones, la proteína es capaz de unirse a una célula o tejido, por ejemplo, que expresa calicreína plasmática.

En una realización, la proteína se asocia físicamente con una nanopartícula, y se puede usar para guiar una nanopartícula a una célula o tejido que expresa calicreína plasmática.

- 45 En algunos aspectos, la divulgación caracteriza una composición farmacéutica que comprende una proteína de unión a calicreína descrita en el presente documento, por ejemplo, que incluye un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la composición puede estar al menos 10, 20, 30, 50, 75, 85, 90, 95, 98, 99 o 99,9 % libre de otra especie de proteína. En una realización, la composición farmacéutica puede estar al menos 10, 20, 30, 50, 75, 85, 90, 95, 98, 99 o 99,9 % libre de fragmentos de la proteína de unión que no se unen a calicreína plasmática (por ejemplo, calicreína plasmática humana) o se unen a calicreína plasmática (por ejemplo, calicreína plasmática humana con una $K_{i,ap}$ de 5000 nM o mayor).
- 50

En algunos aspectos, la divulgación permite el uso de proteínas codificadas por ácidos nucleicos de la invención, en un método de tratamiento o prevención de un trastorno asociado a calicreína plasmática en un sujeto, comprendiendo el método:

- 5 administrar la proteína (por ejemplo, anticuerpo, por ejemplo, anticuerpo humano) que se une a calicreína plasmática (por ejemplo, calicreína plasmática humana y/o calicreína plasmática de ratón) y, por ejemplo, no se une a precalicreína (por ejemplo, precalicreína humana y/o precalicreína de ratón) al sujeto.

En algunas realizaciones, la proteína se une al mismo epítipo o compite por la unión con una proteína (por ejemplo, epi-Kal2) y/o una molécula pequeña (por ejemplo, AEBSF) descrita en el presente documento.

- 10 En algunas realizaciones, la proteína se une al mismo epítipo o compite por la unión con una proteína de unión a calicreína descrita en el presente documento.

- 15 En algunas realizaciones, el trastorno asociado a calicreína plasmática se selecciona del grupo que consiste en artritis reumatoide, gota, enfermedad intestinal, mucositis oral, dolor neuropático, dolor inflamatorio, enfermedad espinal degenerativa con estenosis del conducto vertebral, trombosis arterial o venosa, íleo posoperatorio, aneurisma aórtica, osteoartritis, vasculitis, edema, angioedema hereditario, edema cerebral, embolia pulmonar, accidente cerebrovascular, coagulación en dispositivos de asistencia ventricular o prótesis endovasculares, traumatismo craneoencefálico o edema cerebral peritumoral, septicemia, evento isquémico agudo de la arteria cerebral media (ACM) (accidente cerebrovascular), reestenosis (por ejemplo, después de angioplastia), nefritis por lupus eritematoso sistémico y lesión por quemadura. En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática reduce la coagulación aberrante asociada con el sistema de activación de contacto (es decir, sistema de activación intrínseca) en al menos 10 % como se mide por, por ejemplo, un ensayo de coagulación de APTT. En otras realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática reduce la coagulación aberrante asociada con el sistema de activación de contacto en al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 99 %, o incluso 100 % (es decir, sin coagulación aberrante detectable).

- 25 En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática se administra en combinación con otro tratamiento para el trastorno.

En algunas realizaciones, la proteína descrita en el presente documento se selecciona del grupo que consiste en M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X115-G04, M29-D09 y M145-D11.

- 30 En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática compite con o se une al mismo epítipo que X81-B01.

En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática compite con o se une al mismo epítipo que X67-D03.

- 35 En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática no se une a precalicreína (por ejemplo, precalicreína humana y/o precalicreína de ratón), pero se une a la forma activa de calicreína plasmática (por ejemplo, calicreína plasmática humana y/o calicreína plasmática de ratón).

En ciertas realizaciones, la proteína se une en o cerca del sitio activo del dominio catalítico de calicreína plasmática, o un fragmento de la misma, o se une al epítipo que solapa con el sitio activo de calicreína plasmática.

- 40 En algunas realizaciones, la proteína se une a uno o más aminoácidos que forman la triada catalítica de calicreína plasmática: His434, Asp483 y/o Ser578 (numeración basada en la secuencia humana).

En algunas realizaciones, la proteína se une a uno o más aminoácidos de Ser479, Tyr563 y/o Asp585 (numeración basada en la secuencia humana).

- 45 En otras realizaciones, la proteína se une a uno o más aminoácidos de Arg551, Gln553, Tyr555, Thr558 y/o Arg560 (numeración basada en la secuencia humana). En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática se une a uno o más aminoácidos de: S478, N481, S525 y K526 (numeración basada en la secuencia de calicreína humana).

- 50 En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática disminuye la producción de factor XIIa y/o bradiquinina en más de aproximadamente 5 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 25 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 35 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 45 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 55 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 65 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, o aproximadamente 95 % en comparación con un patrón, por ejemplo, la producción de factor XIIa y/o bradiquinina en las mismas condiciones pero en ausencia de la proteína.

En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática tiene una constante de inhibición aparente ($K_{i,ap}$) inferior a 1000, 500, 100, 10, 5, 1, 0,5 o 0,2 nM.

En una realización, las secuencias del dominio variable de HC y LC son componentes de la misma cadena de polipéptidos.

5 En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática tiene un tiempo de residencia en suero de 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas o más, *in vivo*, por ejemplo, en seres humanos. En una realización, la proteína de unión a calicreína plasmática es una IgG, por ejemplo, una IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, que tiene un tiempo de residencia en suero de 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas o más *in vivo*, por ejemplo, en seres humanos.

10 En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática se asocia físicamente con un resto que mejora el tiempo de residencia en suero, por ejemplo, un resto descrito en el presente documento.

En otra realización, las secuencias del dominio variable de HC y LC son componentes de diferentes cadenas de polipéptidos. Por ejemplo, la proteína de unión a calicreína plasmática es una IgG, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. La proteína de unión a calicreína plasmática puede ser un Fab soluble (sFab).

15 En otras implementaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática incluye un Fab2', scFv, minicuerpo, fusión scFv::Fc, fusión Fab::HSA, fusión HSA::Fab, fusión Fab::HSA::Fab, u otra molécula que comprende el sitio de combinación del antígeno de una de las proteínas de unión en el presente documento. Las regiones VH y VL de estos Fab se pueden proporcionar como IgG, Fab, Fab2, Fab2', scFv, Fab PEGilado, scFv PEGilado, Fab2 PEGilado, VH::CH1::HSA+LC, HSA::VH::CH1+LC, LC::HSA+VH::CH1, HSA::LC+VH::CH1, u otra construcción apropiada.

20 En una realización, la proteína de unión a calicreína plasmática es un anticuerpo humano o humanizado o es no inmunogénica en un humano. Por ejemplo, la proteína incluye una o más regiones estructurales de anticuerpo humano, por ejemplo, todas las regiones estructurales humanas.

25 En una realización, la proteína de unión a calicreína plasmática incluye un dominio Fc humano, o un dominio Fc que es al menos 95, 96, 97, 98 o 99 % idéntico a un dominio Fc humano.

En una realización, la proteína de unión a calicreína plasmática es un anticuerpo de primate o primatizado o es no inmunogénica en un humano. Por ejemplo, la proteína incluye una o más regiones estructurales de anticuerpo de primate, por ejemplo, todas las regiones estructurales de primate.

30 En una realización, la proteína de unión a calicreína plasmática incluye un dominio Fc de primate, o un dominio Fc que es al menos 95, 96, 97, 98 o 99 % idéntico a un dominio Fc de primate. "Primate" incluye seres humanos (*Homo sapiens*), chimpancés (*Pan troglodytes* y *Pan paniscus* (bonobos)), gorilas (*Gorilla gorilla*), gibones, monos, lemures, aye-ayes (*Daubentonia madagascariensis*) y tarseros.

En una realización, la proteína de unión a calicreína plasmática incluye regiones estructurales humanas, o regiones estructurales que son al menos 95, 96, 97, 98 o 99 % idénticas a regiones estructurales humanas.

35 En ciertas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática no incluye secuencias de ratones o conejos (por ejemplo, no es un anticuerpo murino o de conejo).

En ciertas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática es capaz de unirse a una célula o tejido, por ejemplo, que expresa calicreína plasmática.

40 En una realización, la proteína de unión a calicreína plasmática se asocia físicamente con una nanopartícula, y se puede usar para guiar una nanopartícula a una célula o tejido que expresa calicreína plasmática.

La invención permite el uso de proteínas codificadas por los ácidos nucleicos de la invención, en un método de tratamiento o prevención de un trastorno asociado a calicreína plasmática en un sujeto, comprendiendo el método:

45 administrar la proteína (por ejemplo, anticuerpo, por ejemplo, anticuerpo humano) que comprende una secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena pesada y una secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena ligera como se define en las reivindicaciones al sujeto,

en el que la proteína se une a calicreína plasmática (por ejemplo, calicreína plasmática humana y/o calicreína plasmática de ratón).

50 En algunas realizaciones, el trastorno asociado a calicreína plasmática se selecciona del grupo que consiste en artritis reumatoide, gota, enfermedad intestinal, mucositis oral, dolor neuropático, dolor inflamatorio, enfermedad espinal degenerativa con estenosis del conducto vertebral, trombosis arterial o venosa, íleo posoperatorio, aneurisma aórtico, osteoartritis, vasculitis, edema, angioedema hereditario, edema cerebral, embolia pulmonar, accidente cerebrovascular, coagulación de dispositivos de asistencia ventricular o prótesis endovasculares,

traumatismo craneoencefálico o edema cerebral peritumoral, septicemia, evento isquémico agudo de la arteria cerebral media (ACM) (accidente cerebrovascular), reestenosis (por ejemplo, después de angioplastia), nefritis por lupus eritematoso sistémico y lesión por quemadura. En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática reduce la coagulación aberrante asociada con el sistema de activación de contacto (es decir, sistema de activación intrínseca) en al menos 10 % como se mide por, por ejemplo, un ensayo de coagulación de APTT (por ejemplo, en al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %), al menos 99 %, o incluso 100 % (es decir, sin coagulación aberrante detectable).

En algunas realizaciones, la proteína se administra en combinación con otro tratamiento para el trastorno.

- 10 En algunas realizaciones, la proteína se administra en combinación con un segundo agente seleccionado del grupo que consiste en ecaltantide, un inhibidor de C1 esterasa, aprotinina, un inhibidor del receptor de bradiquinina B2 (por ejemplo, icatibant).

- 15 En algunos ejemplos, la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena pesada comprende una, dos o tres (por ejemplo, tres) regiones CDR del dominio variable de la cadena pesada de M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X115-G04, M29-D09, M145-D11, M06-D09 y M35-G04, y/o

- 20 la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena ligera comprende una, dos o tres (por ejemplo, tres) regiones CDR del dominio variable de la cadena ligera de M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X115-G04, M29-D09, M145-D11, M06-D09 y M35-G04 (respectivamente).

En algunas realizaciones, la proteína inhibe calicreína plasmática.

En algunos ejemplos, la una, dos o tres (por ejemplo, tres) regiones CDR del dominio variable de la cadena pesada son de X81-B01 y/o la una, dos o tres (por ejemplo, tres) regiones CDR del dominio variable de la cadena ligera son de X81-B01.

- 25 En algunos ejemplos, la una, dos o tres (por ejemplo, tres) regiones CDR del dominio variable de la cadena pesada son de X67-D03 y/o la una, dos o tres (por ejemplo, tres) regiones CDR del dominio variable de la cadena ligera son de X67-D03.

- 30 En algunos ejemplos, la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena pesada comprende el dominio variable de la cadena pesada de una proteína descrita en el presente documento y/o la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena ligera comprende el dominio variable de la cadena ligera de una proteína descrita en el presente documento.

- 35 La secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena pesada comprende el dominio variable de la cadena pesada de M162-A04, M160-G12, M142-H08 X63-G06, X101-A01, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X115-G04, M29-D09 y M145-D11 y la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena ligera comprende el dominio variable de la cadena ligera de M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X115-G04, M29-D09 y M145-D11.

- 40 En algunas realizaciones, la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena pesada comprende el dominio variable de la cadena pesada de X81-B01 y/o la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena ligera comprende el dominio variable de la cadena ligera de X81-B01.

En algunas realizaciones, la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena pesada comprende el dominio variable de la cadena pesada de X67-D03 y/o la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena ligera comprende el dominio variable de la cadena ligera de X67-D03.

- 45 En algunas realizaciones, la proteína comprende la cadena pesada de una proteína descrita en el presente documento y/o la cadena ligera de una proteína descrita en el presente documento.

- 50 En algunas realizaciones, la proteína comprende la cadena pesada de M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X115-G04, M29-D09 y M145-D11 y/o la cadena ligera de M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X115-G04, M29-D09 y M145-D11 (respectivamente).

En algunas realizaciones, la proteína comprende la cadena pesada de X81-B01 y/o la cadena ligera de X81-B01.

En algunas realizaciones, la proteína comprende la cadena pesada de X67-D03 y/o la cadena ligera de X67-D03.

En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática no se une a precalicreína (por ejemplo, precalicreína humana y/o precalicreína murina), pero se une a la forma activa de calicreína plasmática (por ejemplo, calicreína plasmática humana y/o calicreína plasmática murina).

En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática disminuye la producción de factor XIIa y/o bradiquinina en más de aproximadamente 5 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 25 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 35 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 45 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 55 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 65 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, o aproximadamente 95 % en comparación con un patrón, por ejemplo, la producción de factor XIIa y/o bradiquinina en las mismas condiciones pero en ausencia de la proteína.

En ocasiones, la proteína incluye una o más de las siguientes características: (a) una CDR humana o región estructural humana; (b) la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de HC comprende una o más (por ejemplo, 1, 2 o 3) CDR que son al menos 85, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 % idénticas a una CDR de un dominio variable de HC descrito en el presente documento; (c) la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de LC comprende una o más (por ejemplo, 1, 2 o 3) CDR que son al menos 85, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 % idénticas a una CDR de un dominio variable de LC descrito en el presente documento; (d) la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de LC es al menos 85, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 % idéntica a un dominio variable de LC descrito en el presente documento (por ejemplo, en general o en regiones estructurales o CDR); (e) la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de HC es al menos 85, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 % idéntica a un dominio variable de HC descrito en el presente documento (por ejemplo, en general o en regiones estructurales o CDR); (f) la proteína se une a un epítipo unido por una proteína descrita en el presente documento, o compite por la unión con una proteína descrita en el presente documento; y (g) una CDR de primate o región estructural de primate.

En algunas realizaciones, la proteína tiene una constante de inhibición aparente ($K_{i,ap}$) inferior a 1000, 500, 100, 10, 5, 1, 0,5 o 0,2 nM.

En algunas realizaciones, el anticuerpo no se une a precalicreína (por ejemplo, precalicreína humana), pero se une a la forma activa de calicreína plasmática (por ejemplo, calicreína plasmática humana).

En una realización preferida, la proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene las cadenas ligeras y pesadas de anticuerpos seleccionados del grupo que consiste en M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X115-G04, M29-D09 y M145-D11.

En una realización preferida, la proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene la cadena pesada de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en: M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X115-G04, M29-D09 y M145-D11.

En una realización preferida, la proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene la cadena ligera de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en: M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X115-G04, M29-D09 y M145-D11.

La proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene las regiones variables de anticuerpos de las cadenas ligeras y pesadas de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X115-G04, M29-D09 y M145-D11.

En una realización preferida, la proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene una región variable de anticuerpo de la cadena pesada de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en: M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X115-G04, M29-D09 y M145-D11.

La proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene una región variable de anticuerpo de la cadena ligera de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en: M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X115-G04, M29-D09 y M145-D11.

La proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2 o 3) CDR de la cadena pesada seleccionadas de las CDR correspondientes del grupo de cadenas pesadas que consiste en M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X115-G04, M29-D09 y M145-D11.

La proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2 o 3) CDR de la cadena ligera seleccionadas de las CDR correspondientes del grupo de cadenas ligeras que consiste en M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X115-G04, M29-D09 y M145-D11.

- 5 En ocasiones, la proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2 o 3) CDR de la cadena pesada seleccionadas de las CDR correspondientes del grupo de cadenas pesadas que consiste en M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X115-G04, M29-D09, M145-D11, M06-D09 y M35-G04 y una o más (por ejemplo, 1, 2 o 3) CDR de la cadena ligera seleccionadas de las CDR correspondientes del grupo de cadenas ligeras que consiste en M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X115-G04, M29-D09, M145-D11, M06-D09 y M35-G04 (respectivamente).

En una realización preferida, la proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene las cadenas ligeras y pesadas de X81-B01.

- 15 En una realización preferida, la proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene la cadena pesada de X81-B01.

En una realización preferida, la proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene la cadena ligera de X81-B01.

- 20 En una realización preferida, la proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene las regiones variables de anticuerpos de las cadenas ligeras y pesadas de un anticuerpo seleccionado de X81-B01.

En una realización preferida, la proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene una región variable de anticuerpo de la cadena pesada de X81-B01.

En una realización preferida, la proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene una región variable de anticuerpo de la cadena ligera de X81-B01.

- 25 En ocasiones, la proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2 o 3) CDR de la cadena pesada de las CDR correspondientes de la cadena pesada de X81-B01.

En ocasiones, la proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2 o 3) CDR de la cadena ligera de las CDR correspondientes de la cadena ligera de X81-B01.

- 30 En ocasiones, la proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2 o 3) CDR de la cadena pesada de la cadena pesada de X81-B01 y una o más (por ejemplo, 1, 2 o 3) CDR de la cadena ligera de las CDR correspondientes de la cadena ligera de X81-B01.

En una realización preferida, la proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene las cadenas ligeras y pesadas de X67-D03.

- 35 En una realización preferida, la proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene la cadena pesada de X67-D03.

En una realización preferida, la proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene la cadena ligera de X67-D03.

En una realización preferida, la proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene las regiones variables de anticuerpos de las cadenas ligeras y pesadas de un anticuerpo seleccionado de X67-D03.

- 40 En una realización preferida, la proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene una región variable de anticuerpo de la cadena pesada de X67-D03.

En una realización preferida, la proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene una región variable de anticuerpo de la cadena ligera de X67-D03.

- 45 En ocasiones, la proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2 o 3) CDR de la cadena pesada de las CDR correspondientes de la cadena pesada de X67-D03.

En ocasiones, la proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2 o 3) CDR de la cadena ligera de las CDR correspondientes de la cadena ligera de X67-D03.

- 50 En ocasiones, la proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2 o 3) CDR de la cadena pesada de la cadena pesada de X67-D03 y una o más (por ejemplo, 1, 2 o 3) CDR de la cadena ligera de las CDR correspondientes de la cadena ligera de X67-D03.

En una realización, las secuencias del dominio variable de HC y LC son componentes de la misma cadena de polipéptidos.

5 En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática tiene un tiempo de residencia en suero de 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas o más, *in vivo*, por ejemplo, en seres humanos. En una realización, la proteína de unión a calicreína plasmática es una IgG, por ejemplo, una IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, que tiene un tiempo de residencia en suero de 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas o más *in vivo*, por ejemplo, en seres humanos.

En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática se asocia físicamente con un resto que mejora el tiempo de residencia en suero, por ejemplo, un resto descrito en el presente documento.

10 En otra realización, las secuencias del dominio variable de HC y LC son componentes de diferentes cadenas de polipéptidos. Por ejemplo, la proteína es una IgG, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. La proteína puede ser un Fab soluble (sFab).

15 En otras implementaciones, la proteína incluye un Fab2', scFv, minicuerpo, fusión scFv::Fc, fusión Fab::HSA, fusión HSA::Fab, fusión Fab::HSA::Fab, u otra molécula que comprende el sitio de combinación del antígeno de una de las proteínas de unión en el presente documento. Las regiones VH y VL de estos Fab se pueden proporcionar como IgG, Fab, Fab2, Fab2', scFv, Fab PEGilado, scFv PEGilado, Fab2 PEGilado, VH::CH1::HSA+LC, HSA::VH::CH1+LC, LC::HSA + VH::CH1, HSA::LC + VH::CH1, u otra construcción apropiada.

20 En una realización, la proteína es un anticuerpo humano o humanizado o es no inmunogénica en un humano. Por ejemplo, la proteína incluye una o más regiones estructurales de anticuerpo humano, por ejemplo, todas las regiones estructurales humanas.

En una realización, la proteína incluye un dominio Fc humano, o un dominio Fc que es al menos 95, 96, 97, 98 o 99 % idéntico a un dominio Fc humano.

25 En una realización, la proteína es un anticuerpo de primate o primatizado o es no inmunogénica en un humano. Por ejemplo, la proteína incluye una o más regiones estructurales de anticuerpo de primate, por ejemplo, todas las regiones estructurales de primate.

En una realización, la proteína incluye un dominio Fc de primate, o un dominio Fc que es al menos 95, 96, 97, 98 o 99 % idéntico a un dominio Fc de primate. "Primate" incluye seres humanos (*Homo sapiens*), chimpancés (*Pan troglodytes* y *Pan paniscus* (bonobos)), gorilas (*Gorilla gorilla*), gibones, monos, lemures, aye-ayes (*Daubentonia madagascariensis*) y tarseros.

30 En una realización, la proteína incluye regiones estructurales humanas, o regiones estructurales que son al menos 95, 96, 97, 98 o 99 % idénticas a regiones estructurales humanas.

En ciertas realizaciones, la proteína no incluye secuencias de ratones o conejos (por ejemplo, no es un anticuerpo murino o de conejo).

35 En ciertas realizaciones, la proteína es capaz de unirse a una célula o tejido, por ejemplo, que expresa calicreína plasmática.

En una realización, la proteína se asocia físicamente con una nanopartícula, y se puede usar para guiar una nanopartícula a una célula o tejido que expresa calicreína plasmática.

En algunos aspectos, la invención permite el uso de proteínas codificadas por ácidos nucleicos de la invención, en un método de promoción de la cicatrización en un sujeto, comprendiendo el método:

40 administrar la proteína (por ejemplo, anticuerpo, por ejemplo, anticuerpo humano) que se une a calicreína plasmática (por ejemplo, calicreína plasmática humana y/o calicreína plasmática de ratón) y, por ejemplo, no se une a precalicreína (por ejemplo, precalicreína humana y/o precalicreína de ratón) al sujeto.

45 En algunas realizaciones, la proteína se une al mismo epítipo o compite por la unión con una proteína de unión a calicreína descrita en el presente documento. En algunas realizaciones, la proteína se une al mismo epítipo o compite por la unión con una proteína (por ejemplo, epi-Kal2) y/o una molécula pequeña (por ejemplo, AEBSF) descrita en el presente documento.

En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática se administra en combinación con otro tratamiento para la cicatrización.

50 En algunas realizaciones, la proteína descrita en el presente documento se selecciona del grupo que consiste en M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X115-G04, M29-D09, M145-D11, M06-D09 y M35-G04.

En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática compite con o se une al mismo epítoto que X81-B01.

En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática compite con o se une al mismo epítoto que X67-D03.

- 5 En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática no se une a precalicreína (por ejemplo, precalicreína humana), pero se une a la forma activa de calicreína plasmática (por ejemplo, calicreína plasmática humana).

En ciertas realizaciones, la proteína se une en o cerca del sitio activo del dominio catalítico de calicreína plasmática, o un fragmento de la misma, o se une al epítoto que solapa con el sitio activo de calicreína plasmática.

- 10 En algunas realizaciones, la proteína se une a uno o más aminoácidos que forman la triada catalítica de calicreína plasmática: His434, Asp483 y/o Ser578 (numeración basada en la secuencia humana). En otras realizaciones, la proteína se une a uno o más aminoácidos que forman una región para el reconocimiento de sustrato: Arg551, Gln553, Tyr555, Thr558 y/o Arg560 (numeración basada en la secuencia humana). En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática se une a uno o más aminoácidos de: S478, N481, S525 y K526 (numeración basada en la secuencia de calicreína humana).

En algunas realizaciones, la proteína se une a uno o más aminoácidos de Ser479, Tyr563 y/o Asp585 (numeración basada en la secuencia humana).

- 20 En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática disminuye la producción de factor XIIa y/o bradiquinina en más de aproximadamente 5 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 25 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 35 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 45 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 55 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 65 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, o aproximadamente 95 % en comparación con un patrón, por ejemplo, la producción de factor XIIa y/o bradiquinina en las mismas condiciones pero en ausencia de la proteína.

- 25 En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática tiene una constante de inhibición aparente ($K_{i,ap}$) inferior a 1000, 500, 100, 10, 5, 1, 0,5 o 0,2 nM.

En una realización, las secuencias del dominio variable de HC y LC son componentes de la misma cadena de polipéptidos.

- 30 En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática tiene un tiempo de residencia en suero de 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas o más, *in vivo*, por ejemplo, en seres humanos. En una realización, la proteína de unión a calicreína plasmática es una IgG, por ejemplo, una IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, que tiene un tiempo de residencia en suero de 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas o más *in vivo*, por ejemplo, en seres humanos.

- 35 En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática se asocia físicamente con un resto que mejora el tiempo de residencia en suero, por ejemplo, un resto descrito en el presente documento.

En otra realización, las secuencias del dominio variable de HC y LC son componentes de diferentes cadenas de polipéptidos. Por ejemplo, la proteína de unión a calicreína plasmática es una IgG, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. La proteína de unión a calicreína plasmática puede ser un Fab soluble (sFab).

- 40 En otras implementaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática incluye un Fab2', scFv, minicuerpo, fusión scFv::Fc, fusión Fab::HSA, fusión HSA::Fab, fusión Fab::HSA::Fab, u otra molécula que comprende el sitio de combinación del antígeno de una de las proteínas de unión en el presente documento. Las regiones VH y VL de estos Fab se pueden proporcionar como IgG, Fab, Fab2, Fab2', scFv, Fab PEGilado, scFv PEGilado, Fab2 PEGilado, VH::CH1::HSA+LC, HSA::VH::CH1+LC, LC::HSA+VH::CH1, HSA::LC+VH::CH1, u otra construcción apropiada.

- 45 En una realización, la proteína de unión a calicreína plasmática es un anticuerpo humano o humanizado o es no inmunogénica en un humano. Por ejemplo, la proteína incluye una o más regiones estructurales de anticuerpo humano, por ejemplo, todas las regiones estructurales humanas.

En una realización, la proteína de unión a calicreína plasmática incluye un dominio Fc humano, o un dominio Fc que es al menos 95, 96, 97, 98 o 99 % idéntico a un dominio Fc humano.

- 50 En una realización, la proteína de unión a calicreína plasmática es un anticuerpo de primate o primatizado o es no inmunogénica en un humano. Por ejemplo, la proteína incluye una o más regiones estructurales de anticuerpo de primate, por ejemplo, todas las regiones estructurales de primate.

En una realización, la proteína de unión a calicreína plasmática incluye un dominio Fc de primate, o un dominio Fc que es al menos 95, 96, 97, 98 o 99 % idéntico a un dominio Fc de primate. "Primate" incluye seres humanos (*Homo sapiens*), chimpancés (*Pan troglodytes* y *Pan paniscus* (bonobos)), gorilas (*Gorilla gorilla*), gibones, monos, lemures, aye-ayes (*Daubentonia madagascariensis*) y tarseros.

- 5 En una realización, la proteína de unión a calicreína plasmática incluye regiones estructurales humanas, o regiones estructurales que son al menos 95, 96, 97, 98 o 99 % idénticas a regiones estructurales humanas.

En ciertas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática no incluye secuencias de ratones o conejos (por ejemplo, no es un anticuerpo murino o de conejo).

- 10 En ciertas realizaciones, la proteína es capaz de unirse a una célula o tejido, por ejemplo, que expresa calicreína plasmática.

En una realización, la proteína de unión a calicreína plasmática se asocia físicamente con una nanopartícula, y se puede usar para guiar una nanopartícula a una célula o tejido que expresa calicreína plasmática.

En algunos aspectos, la invención permite el uso de proteínas codificadas por los ácidos nucleicos de la invención, en un método de promoción de la cicatrización en un sujeto, comprendiendo el método:

- 15 administrar la proteína (por ejemplo, anticuerpo, por ejemplo, anticuerpo humano) que comprende una secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena pesada y una secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena ligera como se define en las reivindicaciones al sujeto, en el que en el que la proteína se une a calicreína plasmática.

En algunas realizaciones, la proteína se administra en combinación con otro tratamiento para la cicatrización.

- 20 En algunas realizaciones, la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena pesada comprende una, dos o tres (por ejemplo, tres) regiones CDR del dominio variable de la cadena pesada de M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X115-G04, M29-D09, M145-D11, M06-D09 y M35-G04, y/o

- 25 la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena ligera comprende una, dos o tres (por ejemplo, tres) regiones CDR del dominio variable de la cadena ligera de M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X115-G04, M29-D09, M145-D11, M06-D09 y M35-G04 (respectivamente).

La proteína inhibe calicreína plasmática.

- 30 En algunas realizaciones, la una, dos o tres (por ejemplo, tres) regiones CDR del dominio variable de la cadena pesada son de X81-B01 y/o la una, dos o tres (por ejemplo, tres) regiones CDR del dominio variable de la cadena ligera son de X81-B01.

En algunas realizaciones, la una, dos o tres (por ejemplo, tres) regiones CDR del dominio variable de la cadena pesada son de X67-D03 y/o la una, dos o tres (por ejemplo, tres) regiones CDR del dominio variable de la cadena ligera son de X67-D03.

- 35 La secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena pesada comprende el dominio variable de la cadena pesada de una proteína descrita en el presente documento y/o la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena ligera comprende el dominio variable de la cadena ligera de una proteína descrita en el presente documento.

- 40 La secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena pesada comprende el dominio variable de la cadena pesada de M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X115-G04, M29-D09 y M145-D11 y/o la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena ligera comprende el dominio variable de la cadena ligera de M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X115-G04, M29-D09 y M145-D11 (respectivamente).

- 45 En algunas realizaciones, la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena pesada comprende el dominio variable de la cadena pesada de X81-B01 y/o la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena ligera comprende el dominio variable de la cadena ligera de X81-B01.

- 50 En algunas realizaciones, la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena pesada comprende el dominio variable de la cadena pesada de X67-D03 y/o la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena ligera comprende el dominio variable de la cadena ligera de X67-D03.

En algunas realizaciones, la proteína comprende la cadena pesada de una proteína descrita en el presente documento y/o la cadena ligera de una proteína descrita en el presente documento.

En algunas realizaciones, la proteína comprende la cadena pesada de M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X115-G04, M29-D09 y M145-D11 y/o la cadena ligera de M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X115-G04, M29-D09 y M145-D11 (respectivamente).

En algunas realizaciones, la proteína comprende la cadena pesada de X81-B01 y/o la cadena ligera de X81-B01.

En algunas realizaciones, la proteína comprende la cadena pesada de X67-D03 y/o la cadena ligera de X67-D03.

En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática no se une a precalicreína (por ejemplo, precalicreína humana y/o precalicreína murina), pero se une a la forma activa de calicreína plasmática (por ejemplo, calicreína plasmática humana y/o calicreína plasmática murina).

En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática disminuye la producción de factor Xlla y/o bradiquinina en más de aproximadamente 5 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 25 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 35 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 45 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 55 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 65 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, o aproximadamente 95 % en comparación con un patrón, por ejemplo, la producción de factor Xlla y/o bradiquinina en las mismas condiciones pero en ausencia de la proteína.

En ocasiones, la proteína incluye una o más de las siguientes características: (a) una CDR humana o región estructural humana; (b) la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de HC comprende una o más (por ejemplo, 1, 2 o 3) CDR que son al menos 85, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 % idénticas a una CDR de un dominio variable de HC descrito en el presente documento; (c) la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de LC comprende una o más (por ejemplo, 1, 2 o 3) CDR que son al menos 85, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 % idénticas a una CDR de un dominio variable de LC descrito en el presente documento; (d) la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de LC es al menos 85, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 % idéntica a un dominio variable de LC descrito en el presente documento (por ejemplo, en general o en regiones estructurales o CDR); (e) la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de HC es al menos 85, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 % idéntica a un dominio variable de HC descrito en el presente documento (por ejemplo, en general o en regiones estructurales o CDR); (f) la proteína se une a un epítipo unido por una proteína descrita en el presente documento, o compite por la unión con una proteína descrita en el presente documento; y (g) una CDR de primate o región estructural de primate.

En algunas realizaciones, la proteína tiene una constante de inhibición aparente ($K_{i,ap}$) inferior a 1000, 500, 100, 10, 5, 1, 0,5 o 0,2 nM.

En algunas realizaciones, el anticuerpo no se une a precalicreína (por ejemplo, precalicreína humana y/o precalicreína murina), pero se une a la forma activa de calicreína plasmática (por ejemplo, calicreína plasmática humana y/o calicreína plasmática murina).

En una realización preferida, la proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene las cadenas ligeras y pesadas de anticuerpos seleccionados del grupo que consiste en M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X115-G04, M29-D09 y M145-D11.

En una realización preferida, la proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene la cadena pesada de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en: M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X115-G04, M29-D09 y M145-D11.

En una realización preferida, la proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene la cadena ligera de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en: M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X115-G04, M29-D09 y M145-D11.

La proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene las regiones variables de anticuerpos de las cadenas ligeras y pesadas de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X115-G04, M29-D09 y M145-D11.

La proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene una región variable de anticuerpo de la cadena pesada de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en: M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X115-G04, M29-D09 y M145-D11.

La proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene una región variable de anticuerpo de la cadena ligera de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en: M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X115-G04, M29-D09 y M145-D11.

- 5 En un ejemplo preferido, la proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2 o 3) CDR de la cadena pesada seleccionadas de las CDR correspondientes del grupo de cadenas pesadas que consiste en M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X115-G04, M29-D09, M145-D11, M06-D09 y M35-G04.
- 10 En un ejemplo preferido, la proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2 o 3) CDR de la cadena ligera seleccionadas de las CDR correspondientes del grupo de cadenas ligeras que consiste en M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X115-G04, M29-D09, M145-D11, M06-D09 y M35-G04.
- 15 En un ejemplo preferido, la proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2 o 3) CDR de la cadena pesada seleccionadas de las CDR correspondientes del grupo de cadenas pesadas que consiste en M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X115-G04, M29-D09, M145-D11, M06-D09 y M35-G04 y una o más (por ejemplo, 1, 2 o 3) CDR de la cadena ligera seleccionadas de las CDR correspondientes del grupo de cadenas ligeras que consiste en M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X115-G04, M29-D09, M145-D11, M06-D09 y M35-G04 (respectivamente).
- 20

En una realización preferida, la proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene las cadenas ligeras y pesadas de X81-B01.

- 25 En una realización preferida, la proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene la cadena pesada de X81-B01.

En una realización preferida, la proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene la cadena ligera de X81-B01.

- 30 En una realización preferida, la proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene las regiones variables de anticuerpos de las cadenas ligeras y pesadas de un anticuerpo seleccionado de X81-B01.

En una realización preferida, la proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene una región variable de anticuerpo de la cadena pesada de X81-B01.

En una realización preferida, la proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene una región variable de anticuerpo de la cadena ligera de X81-B01.

- 35 En un ejemplo preferido, la proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2 o 3) CDR de la cadena pesada de las CDR correspondientes de la cadena pesada de X81-B01.

En un ejemplo preferido, la proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2 o 3) CDR de la cadena ligera de las CDR correspondientes de la cadena ligera de X81-B01.

- 40 En un ejemplo preferido, la proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2 o 3) CDR de la cadena pesada de la cadena pesada de X81-B01 y una o más (por ejemplo, 1, 2 o 3) CDR de la cadena ligera de las CDR correspondientes de la cadena ligera de X81-B01.

En un ejemplo preferido, la proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene las cadenas ligeras y pesadas de X67-D03.

- 45 En una realización preferida, la proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene la cadena pesada de X67-D03.

En una realización preferida, la proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene la cadena ligera de X67-D03.

En una realización preferida, la proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene las regiones variables de anticuerpos de las cadenas ligeras y pesadas de un anticuerpo seleccionado de X67-D03.

- 50 En una realización preferida, la proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene una región variable de anticuerpo de la cadena pesada de X67-D03.

En una realización preferida, la proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene una región variable de anticuerpo de la cadena ligera de X67-D03.

En un ejemplo preferido, la proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2 o 3) CDR de la cadena pesada de las CDR correspondientes de la cadena pesada de X67-D03.

- 5 En un ejemplo preferido, la proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2 o 3) CDR de la cadena ligera de las CDR correspondientes de la cadena ligera de X67-D03.

En un ejemplo preferido, la proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2 o 3) CDR de la cadena pesada de la cadena pesada de X67-D03 y una o más (por ejemplo, 1, 2 o 3) CDR de la cadena ligera de las CDR correspondientes de la cadena ligera de X67-D03.

- 10 En una realización, las secuencias del dominio variable de HC y LC son componentes de la misma cadena de polipéptidos.

En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática tiene un tiempo de residencia en suero de 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas o más, *in vivo*, por ejemplo, en seres humanos. En una realización, la proteína de unión a calicreína plasmática es una IgG, por ejemplo, una IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, que

- 15 tiene un tiempo de residencia en suero de 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas o más *in vivo*, por ejemplo, en seres humanos.

En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática se asocia físicamente con un resto que mejora el tiempo de residencia en suero, por ejemplo, un resto descrito en el presente documento.

- 20 En otra realización, las secuencias del dominio variable de HC y LC son componentes de diferentes cadenas de polipéptidos. Por ejemplo, la proteína es una IgG, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. La proteína puede ser un Fab soluble (sFab).

En otras implementaciones, la proteína incluye un Fab2', scFv, minicuerpo, fusión scFv::Fc, fusión Fab::HSA, fusión HSA::Fab, fusión Fab::HSA::Fab, u otra molécula que comprende el sitio de combinación del antígeno de una de las proteínas de unión en el presente documento. Las regiones VH y VL de estos Fab se pueden proporcionar como

- 25 IgG, Fab, Fab2', scFv, Fab PEGilado, scFv PEGilado, Fab2 PEGilado, VH::CH1::HSA+LC, HSA::VH::CH1+LC, LC::HSA + VH::CH1, HSA::LC + VH::CH1, u otra construcción apropiada.

En una realización, la proteína es un anticuerpo humano o humanizado o es no inmunogénica en un humano. Por ejemplo, la proteína incluye una o más regiones estructurales de anticuerpo humano, por ejemplo, todas las regiones estructurales humanas.

- 30 En una realización, la proteína incluye un dominio Fc humano, o un dominio Fc que es al menos 95, 96, 97, 98 o 99 % idéntico a un dominio Fc humano.

En una realización, la proteína es un anticuerpo de primate o primatizado o es no inmunogénica en un humano. Por ejemplo, la proteína incluye una o más regiones estructurales de anticuerpo de primate, por ejemplo, todas las regiones estructurales de primate.

- 35 En una realización, la proteína incluye un dominio Fc de primate, o un dominio Fc que es al menos 95, 96, 97, 98 o 99 % idéntico a un dominio Fc de primate. "Primate" incluye seres humanos (*Homo sapiens*), chimpancés (*Pan troglodytes* y *Pan paniscus* (bonobos)), gorilas (*Gorilla gorilla*), gibones, monos, lemures, aye-ayes (*Daubentonia madagascariensis*) y tarseros.

- 40 En una realización, la proteína incluye regiones estructurales humanas, o regiones estructurales que son al menos 95, 96, 97, 98 o 99 % idénticas a regiones estructurales humanas.

En ciertas realizaciones, la proteína no incluye secuencias de ratones o conejos (por ejemplo, no es un anticuerpo murino o de conejo).

En ciertas realizaciones, la proteína es capaz de unirse a una célula o tejido, por ejemplo, que expresa calicreína plasmática.

- 45 En una realización, la proteína se asocia físicamente con una nanopartícula, y se puede usar para guiar una nanopartícula a una célula o tejido que expresa calicreína plasmática.

En algunos aspectos, la invención permite el uso de proteínas codificadas por ácidos nucleicos de la invención, en un método de tratamiento o prevención de artritis reumatoide en un sujeto, comprendiendo el método:

- 50 administrar la proteína (por ejemplo, anticuerpo, por ejemplo, anticuerpo humano) que comprende una secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena pesada y una secuencia del dominio variable de inmunoglobulina

de la cadena ligera como se define en las reivindicaciones al sujeto, en el que en la que la proteína se une a calicreína plasmática.

5 En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática no se une a precalicreína (por ejemplo, precalicreína humana y/o precalicreína murina), pero se une a la forma activa de calicreína plasmática (por ejemplo, calicreína plasmática humana y/o calicreína plasmática murina).

En algunas realizaciones, la proteína se administra en combinación con otro tratamiento para artritis reumatoide.

En algunas realizaciones, la proteína inhibe calicreína plasmática (por ejemplo, calicreína plasmática humana y/o calicreína plasmática murina).

10 La secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena pesada comprende el dominio variable de la cadena pesada de una proteína descrita en el presente documento y/o la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena ligera comprende el dominio variable de la cadena ligera de una proteína descrita en el presente documento.

En algunas realizaciones, la proteína comprende la cadena pesada de una proteína descrita en el presente documento y/o la cadena ligera de una proteína descrita en el presente documento.

15 En algunos aspectos, la invención permite el uso de proteínas codificadas por ácidos nucleicos de la invención, en un método de tratamiento o prevención de gota en un sujeto, comprendiendo el método:

20 administrar la proteína (por ejemplo, anticuerpo, por ejemplo, anticuerpo humano) que comprende una secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena pesada y una secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena ligera como se define en las reivindicaciones al sujeto, en el que la proteína se une a calicreína plasmática.

En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática no se une a precalicreína (por ejemplo, precalicreína humana y/o precalicreína murina), pero se une a la forma activa de calicreína plasmática (por ejemplo, calicreína plasmática humana y/o calicreína plasmática murina).

En algunas realizaciones, la proteína se administra en combinación con otro tratamiento para gota.

25 En algunas realizaciones, la proteína inhibe calicreína plasmática (por ejemplo, calicreína plasmática humana y/o calicreína plasmática murina).

30 La secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena pesada comprende el dominio variable de la cadena pesada de una proteína descrita en el presente documento y la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena ligera comprende el dominio variable de la cadena ligera de una proteína descrita en el presente documento.

En algunas realizaciones, la proteína comprende la cadena pesada de una proteína descrita en el presente documento y/o la cadena ligera de una proteína descrita en el presente documento.

En algunos aspectos, la invención permite el uso de proteínas codificadas por ácidos nucleicos de la invención, en un método de tratamiento o prevención de enfermedad intestinal en un sujeto, comprendiendo el método:

35 administrar la proteína (por ejemplo, anticuerpo, por ejemplo, anticuerpo humano) que comprende una secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena pesada y una secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena ligera como se define en las reivindicaciones al sujeto, en el que la proteína se une a calicreína plasmática.

40 En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática no se une a precalicreína (por ejemplo, precalicreína humana y/o precalicreína murina), pero se une a la forma activa de calicreína plasmática (por ejemplo, calicreína plasmática humana y/o calicreína plasmática murina).

En algunas realizaciones, la proteína se administra en combinación con otro tratamiento para enfermedad intestinal.

En algunas realizaciones, la proteína inhibe calicreína plasmática (por ejemplo, calicreína plasmática humana y/o calicreína plasmática murina).

45 La secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena pesada comprende el dominio variable de la cadena pesada de una proteína descrita en el presente documento y/o la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena ligera comprende el dominio variable de la cadena ligera de una proteína descrita en el presente documento.

50 En algunas realizaciones, la proteína comprende la cadena pesada de una proteína descrita en el presente documento y/o la cadena ligera de una proteína descrita en el presente documento.

En algunos aspectos, la invención permite el uso de los ácidos nucleicos de la invención y/o proteínas asociadas en un método de tratamiento o prevención de mucositis oral en un sujeto, comprendiendo el método:

- 5 administrar la proteína (por ejemplo, anticuerpo, por ejemplo, anticuerpo humano) que comprende una secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena pesada y una secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena ligera como se define en las reivindicaciones al sujeto, en el que la proteína se une a calicreína plasmática.

En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática no se une a precalicreína (por ejemplo, precalicreína humana y/o precalicreína murina), pero se une a la forma activa de calicreína plasmática (por ejemplo, calicreína plasmática humana y/o calicreína plasmática murina).

- 10 En algunas realizaciones, la proteína se administra en combinación con otro tratamiento para mucositis oral.

En algunas realizaciones, la proteína inhibe calicreína plasmática (por ejemplo, calicreína plasmática humana y/o calicreína plasmática murina).

- 15 La secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena pesada comprende el dominio variable de la cadena pesada de una proteína descrita en el presente documento y/o la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena ligera comprende el dominio variable de la cadena ligera de una proteína descrita en el presente documento.

En algunas realizaciones, la proteína comprende la cadena pesada de una proteína descrita en el presente documento y/o la cadena ligera de una proteína descrita en el presente documento.

- 20 En algunos aspectos, la invención permite el uso de proteínas codificadas por ácidos nucleicos de la invención en un método de tratamiento o prevención de dolor neuropático en un sujeto, comprendiendo el método:

administrar la proteína (por ejemplo, anticuerpo, por ejemplo, anticuerpo humano) que comprende una secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena pesada y una secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena ligera como se define en las reivindicaciones al sujeto, en el que la proteína se une a calicreína plasmática.

- 25 En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática no se une a precalicreína (por ejemplo, precalicreína humana y/o precalicreína murina), pero se une a la forma activa de calicreína plasmática (por ejemplo, calicreína plasmática humana y/o calicreína plasmática murina).

En algunas realizaciones, la proteína se administra en combinación con otro tratamiento para dolor neuropático.

- 30 En algunas realizaciones, la proteína inhibe calicreína plasmática (por ejemplo, calicreína plasmática humana y/o calicreína plasmática murina).

La secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena pesada comprende el dominio variable de la cadena pesada de una proteína descrita en el presente documento y/o la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena ligera comprende el dominio variable de la cadena ligera de una proteína descrita en el presente documento.

- 35 En algunas realizaciones, la proteína comprende la cadena pesada de una proteína descrita en el presente documento y/o la cadena ligera de una proteína descrita en el presente documento.

En algunos aspectos, la invención permite el uso de proteínas codificadas por ácidos nucleicos de la invención en un método de tratamiento o prevención de dolor inflamatorio en un sujeto, comprendiendo el método:

- 40 administrar la proteína (por ejemplo, anticuerpo, por ejemplo, anticuerpo humano) que comprende una secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena pesada y una secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena ligera como se define en las reivindicaciones al sujeto, en el que la proteína se une a calicreína plasmática.

- 45 En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática no se une a precalicreína (por ejemplo, precalicreína humana y/o precalicreína murina), pero se une a la forma activa de calicreína plasmática (por ejemplo, calicreína plasmática humana y/o calicreína plasmática murina).

En algunas realizaciones, la proteína se administra en combinación con otro tratamiento para dolor inflamatorio.

En algunas realizaciones, la proteína inhibe calicreína plasmática (por ejemplo, calicreína plasmática humana y/o calicreína plasmática murina).

- 50 La secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena pesada comprende el dominio variable de la cadena pesada de una proteína descrita en el presente documento y/o la secuencia del dominio variable de

inmunoglobulina de la cadena ligera comprende el dominio variable de la cadena ligera de una proteína descrita en el presente documento.

En algunas realizaciones, la proteína comprende la cadena pesada de una proteína descrita en el presente documento y/o la cadena ligera de una proteína descrita en el presente documento.

- 5 En algunos aspectos, la invención permite el uso de proteínas codificadas por ácidos nucleicos de la invención en un método de tratamiento o prevención de enfermedad espinal degenerativa con estenosis del conducto vertebral en un sujeto, comprendiendo el método:

administrar la proteína aislada (por ejemplo, anticuerpo, por ejemplo, anticuerpo humano) que comprende una secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena pesada y una secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena ligera como se define en las reivindicaciones al sujeto, en el que la proteína se une a calicreína plasmática.

- 10

En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática no se une a precalicreína (por ejemplo, precalicreína humana y/o precalicreína murina), pero se une a la forma activa de calicreína plasmática (por ejemplo, calicreína plasmática humana y/o calicreína plasmática murina).

- 15 En algunas realizaciones, la proteína se administra en combinación con otro tratamiento para enfermedad espinal degenerativa con estenosis del conducto vertebral.

En algunas realizaciones, la proteína inhibe calicreína plasmática (por ejemplo, calicreína plasmática humana y/o calicreína plasmática murina).

- 20 La secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena pesada comprende el dominio variable de la cadena pesada de una proteína descrita en el presente documento y/o la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena ligera comprende el dominio variable de la cadena ligera de una proteína descrita en el presente documento.

En algunas realizaciones, la proteína comprende la cadena pesada de una proteína descrita en el presente documento y/o la cadena ligera de una proteína descrita en el presente documento.

- 25 En algunos aspectos, la invención permite el uso de proteínas codificadas por ácidos nucleicos de la invención en un método de tratamiento o prevención de trombosis arterial o venosa en un sujeto, comprendiendo el método:

administrar la proteína (por ejemplo, anticuerpo, por ejemplo, anticuerpo humano) que comprende una secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena pesada y una secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena ligera como se define en las reivindicaciones al sujeto, en el que la proteína se une a calicreína plasmática.

- 30

En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática no se une a precalicreína (por ejemplo, precalicreína humana y/o precalicreína murina), pero se une a la forma activa de calicreína plasmática (por ejemplo, calicreína plasmática humana y/o calicreína plasmática murina).

- 35 En algunas realizaciones, la proteína se administra en combinación con otro tratamiento para trombosis arterial o venosa.

En algunas realizaciones, la proteína inhibe calicreína plasmática (por ejemplo, calicreína plasmática humana y/o calicreína plasmática murina).

- 40 La secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena pesada comprende el dominio variable de la cadena pesada de una proteína descrita en el presente documento y/o la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena ligera comprende el dominio variable de la cadena ligera de una proteína descrita en el presente documento.

En algunas realizaciones, la proteína comprende la cadena pesada de una proteína descrita en el presente documento y/o la cadena ligera de una proteína descrita en el presente documento.

- 45 En algunos aspectos, la invención permite el uso de proteínas codificadas por ácidos nucleicos de la invención en un método de tratamiento o prevención de íleo posoperatorio en un sujeto, comprendiendo el método:

administrar la proteína (por ejemplo, anticuerpo, por ejemplo, anticuerpo humano) que comprende una secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena pesada y una secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena ligera como se define en las reivindicaciones al sujeto, en el que la proteína se une a calicreína plasmática.

En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática no se une a precalicreína (por ejemplo, precalicreína humana y/o precalicreína murina), pero se une a la forma activa de calicreína plasmática (por ejemplo, calicreína plasmática humana y/o calicreína plasmática murina).

En algunas realizaciones, la proteína se administra en combinación con otro tratamiento para íleo posoperatorio.

- 5 En algunas realizaciones, la proteína inhibe calicreína plasmática (por ejemplo, calicreína plasmática humana y/o calicreína plasmática murina).

La secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena pesada comprende el dominio variable de la cadena pesada de una proteína descrita en el presente documento y/o la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena ligera comprende el dominio variable de la cadena ligera de una proteína descrita en el presente documento.

10 En algunas realizaciones, la proteína comprende la cadena pesada de una proteína descrita en el presente documento y/o la cadena ligera de una proteína descrita en el presente documento.

En algunas realizaciones, la proteína comprende la cadena pesada de una proteína descrita en el presente documento y/o la cadena ligera de una proteína descrita en el presente documento.

En algunos aspectos, la invención permite el uso de proteínas codificadas por ácidos nucleicos de la invención en un método de tratamiento o prevención de aneurisma aórtica en un sujeto, comprendiendo el método:

- 15 administrar la proteína (por ejemplo, anticuerpo, por ejemplo, anticuerpo humano) que comprende una secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena pesada y una secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena ligera como se define en las reivindicaciones al sujeto, en el que la proteína se une a calicreína plasmática.

20 En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática no se une a precalicreína (por ejemplo, precalicreína humana y/o precalicreína murina), pero se une a la forma activa de calicreína plasmática (por ejemplo, calicreína plasmática humana y/o calicreína plasmática murina).

En algunas realizaciones, la proteína se administra en combinación con otro tratamiento para aneurisma aórtica.

En algunas realizaciones, la proteína inhibe calicreína plasmática (por ejemplo, calicreína plasmática humana y/o calicreína plasmática murina).

25 La secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena pesada comprende el dominio variable de la cadena pesada de una proteína descrita en el presente documento y/o la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena ligera comprende el dominio variable de la cadena ligera de una proteína descrita en el presente documento.

30 En algunas realizaciones, la proteína comprende la cadena pesada de una proteína descrita en el presente documento y/o la cadena ligera de una proteína descrita en el presente documento.

En algunos aspectos, la invención permite el uso de proteínas codificadas por ácidos nucleicos de la invención en un método de tratamiento o prevención de osteoartritis en un sujeto, comprendiendo el método:

35 administrar la proteína (por ejemplo, anticuerpo, por ejemplo, anticuerpo humano) que comprende una secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena pesada y una secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena ligera como se define en las reivindicaciones al sujeto, en el que la proteína se une a calicreína plasmática.

En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática no se une a precalicreína (por ejemplo, precalicreína humana y/o precalicreína murina), pero se une a la forma activa de calicreína plasmática (por ejemplo, calicreína plasmática humana y/o calicreína plasmática murina).

40 En algunas realizaciones, la proteína se administra en combinación con otro tratamiento para osteoartritis.

En algunas realizaciones, la proteína inhibe calicreína plasmática (por ejemplo, calicreína plasmática humana y/o calicreína plasmática murina).

45 La secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena pesada comprende el dominio variable de la cadena pesada de una proteína descrita en el presente documento y/o la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena ligera comprende el dominio variable de la cadena ligera de una proteína descrita en el presente documento.

En algunas realizaciones, la proteína comprende la cadena pesada de una proteína descrita en el presente documento y/o la cadena ligera de una proteína descrita en el presente documento.

50 En algunos aspectos, la invención permite el uso de proteínas codificadas por ácidos nucleicos de la invención en un método de tratamiento o prevención de vasculitis en un sujeto, comprendiendo el método:

administrar la proteína (por ejemplo, anticuerpo, por ejemplo, anticuerpo humano) que comprende una secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena pesada y una secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena ligera como se define en las reivindicaciones al sujeto, en el que la proteína se une a calicreína plasmática.

- 5 En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática no se une a precalicreína (por ejemplo, precalicreína humana y/o precalicreína murina), pero se une a la forma activa de calicreína plasmática (por ejemplo, calicreína plasmática humana y/o calicreína plasmática murina).

En algunas realizaciones, la proteína se administra en combinación con otro tratamiento para vasculitis.

- 10 En algunas realizaciones, la proteína inhibe calicreína plasmática (por ejemplo, calicreína plasmática humana y/o calicreína plasmática murina).

La secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena pesada comprende el dominio variable de la cadena pesada de una proteína descrita en el presente documento y/o la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena ligera comprende el dominio variable de la cadena ligera de una proteína descrita en el presente documento.

- 15 En algunas realizaciones, la proteína comprende la cadena pesada de una proteína descrita en el presente documento y/o la cadena ligera de una proteína descrita en el presente documento.

En algunos aspectos, la invención permite el uso de proteínas codificadas por ácidos nucleicos de la invención en un método de tratamiento o prevención de traumatismo craneoencefálico o edema cerebral peritumoral en un sujeto, comprendiendo el método:

- 20 administrar la proteína (por ejemplo, anticuerpo, por ejemplo, anticuerpo humano) que comprende una secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena pesada y una secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena ligera como se define en las reivindicaciones al sujeto, en el que la proteína se une a calicreína plasmática.

- 25 En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática no se une a precalicreína (por ejemplo, precalicreína humana y/o precalicreína murina), pero se une a la forma activa de calicreína plasmática (por ejemplo, calicreína plasmática humana y/o calicreína plasmática murina).

En algunas realizaciones, la proteína se administra en combinación con otro tratamiento para traumatismo craneoencefálico o edema cerebral peritumoral.

- 30 En algunas realizaciones, la proteína inhibe calicreína plasmática (por ejemplo, calicreína plasmática humana y/o calicreína plasmática murina).

La secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena pesada comprende el dominio variable de la cadena pesada de una proteína descrita en el presente documento y/o la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena ligera comprende el dominio variable de la cadena ligera de una proteína descrita en el presente documento.

- 35 En algunas realizaciones, la proteína comprende la cadena pesada de una proteína descrita en el presente documento y/o la cadena ligera de una proteína descrita en el presente documento.

En algunos aspectos, la invención permite el uso de proteínas codificadas por ácidos nucleicos de la invención en un método de tratamiento o prevención de septicemia en un sujeto, comprendiendo el método:

- 40 administrar la proteína (por ejemplo, anticuerpo, por ejemplo, anticuerpo humano) que comprende una secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena pesada y una secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena ligera como se define en las reivindicaciones al sujeto, en el que la proteína se une a calicreína plasmática.

- 45 En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática no se une a precalicreína (por ejemplo, precalicreína humana y/o precalicreína murina), pero se une a la forma activa de calicreína plasmática (por ejemplo, calicreína plasmática humana y/o calicreína plasmática murina).

En algunas realizaciones, la proteína se administra en combinación con otro tratamiento para septicemia.

En algunas realizaciones, la proteína inhibe calicreína plasmática (por ejemplo, calicreína plasmática humana y/o calicreína plasmática murina).

- 50 La secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena pesada comprende el dominio variable de la cadena pesada de una proteína descrita en el presente documento y/o la secuencia del dominio variable de

inmunoglobulina de la cadena ligera comprende el dominio variable de la cadena ligera de una proteína descrita en el presente documento.

En algunas realizaciones, la proteína comprende la cadena pesada de una proteína descrita en el presente documento y/o la cadena ligera de una proteína descrita en el presente documento.

- 5 En algunos aspectos, la invención permite el uso de proteínas codificadas por ácidos nucleicos de la invención en un método de tratamiento o prevención de evento isquémico agudo de la arteria cerebral media (ACM) (accidente cerebrovascular) en un sujeto, comprendiendo el método:

10 administrar la proteína (por ejemplo, anticuerpo, por ejemplo, anticuerpo humano) que comprende una secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena pesada y una secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena ligera como se define en las reivindicaciones al sujeto, en el que la proteína se une a calicreína plasmática.

En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática no se une a precalicreína (por ejemplo, precalicreína humana y/o precalicreína murina), pero se une a la forma activa de calicreína plasmática (por ejemplo, calicreína plasmática humana y/o calicreína plasmática murina).

- 15 En algunas realizaciones, la proteína se administra en combinación con otro tratamiento para evento isquémico agudo de la arteria cerebral media (ACM) (accidente cerebrovascular).

En algunas realizaciones, la proteína inhibe calicreína plasmática (por ejemplo, calicreína plasmática humana y/o calicreína plasmática murina).

20 La secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena pesada comprende el dominio variable de la cadena pesada de una proteína descrita en el presente documento y/o la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena ligera comprende el dominio variable de la cadena ligera de una proteína descrita en el presente documento.

En algunas realizaciones, la proteína comprende la cadena pesada de una proteína descrita en el presente documento y/o la cadena ligera de una proteína descrita en el presente documento.

- 25 En algunos aspectos, la invención permite el uso de proteínas codificadas por ácidos nucleicos de la invención en un método de tratamiento o prevención de reestenosis (por ejemplo, después de angioplastia) en un sujeto, comprendiendo el método:

30 administrar la proteína (por ejemplo, anticuerpo, por ejemplo, anticuerpo humano) que comprende una secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena pesada y una secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena ligera como se define en las reivindicaciones al sujeto, en el que la proteína se une a calicreína plasmática.

En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática no se une a precalicreína (por ejemplo, precalicreína humana y/o precalicreína murina), pero se une a la forma activa de calicreína plasmática (por ejemplo, calicreína plasmática humana y/o calicreína plasmática murina).

- 35 En algunas realizaciones, la proteína se administra en combinación con otro tratamiento para reestenosis (por ejemplo, después de angioplastia).

En algunas realizaciones, la proteína inhibe calicreína plasmática (por ejemplo, calicreína plasmática humana y/o calicreína plasmática murina).

40 La secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena pesada comprende el dominio variable de la cadena pesada de una proteína descrita en el presente documento y/o la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena ligera comprende el dominio variable de la cadena ligera de una proteína descrita en el presente documento.

En algunas realizaciones, la proteína comprende la cadena pesada de una proteína descrita en el presente documento y/o la cadena ligera de una proteína descrita en el presente documento.

- 45 En algunos aspectos, la invención permite el uso de proteínas codificadas por ácidos nucleicos de la invención en un método de tratamiento o prevención de nefritis por lupus eritematoso sistémico en un sujeto, comprendiendo el método:

50 administrar la proteína (por ejemplo, anticuerpo, por ejemplo, anticuerpo humano) que comprende una secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena pesada y una secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena ligera como se define en las reivindicaciones al sujeto, en el que la proteína se une a calicreína plasmática.

En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática no se une a precalicreína (por ejemplo, precalicreína humana y/o precalicreína murina), pero se une a la forma activa de calicreína plasmática (por ejemplo, calicreína plasmática humana y/o calicreína plasmática murina).

5 En algunas realizaciones, la proteína se administra en combinación con otro tratamiento para nefritis por lupus eritematoso sistémico.

En algunas realizaciones, la proteína inhibe calicreína plasmática (por ejemplo, calicreína plasmática humana y/o calicreína plasmática murina).

10 La secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena pesada comprende el dominio variable de la cadena pesada de una proteína descrita en el presente documento y/o la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena ligera comprende el dominio variable de la cadena ligera de una proteína descrita en el presente documento.

En algunas realizaciones, la proteína comprende la cadena pesada de una proteína descrita en el presente documento y/o la cadena ligera de una proteína descrita en el presente documento.

15 En algunos aspectos, la invención permite el uso de proteínas codificadas por ácidos nucleicos de la invención en un método de tratamiento o prevención de lesión por quemadura en un sujeto, comprendiendo el método:

administrar la proteína (por ejemplo, anticuerpo, por ejemplo, anticuerpo humano) que comprende una secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena pesada y una secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena ligera como se define en las reivindicaciones al sujeto, en el que la proteína se une a calicreína plasmática.

20 En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática no se une a precalicreína (por ejemplo, precalicreína humana y/o precalicreína murina), pero se une a la forma activa de calicreína plasmática (por ejemplo, calicreína plasmática humana y/o calicreína plasmática murina).

En algunas realizaciones, la proteína se administra en combinación con otro tratamiento para lesión por quemadura.

25 En algunas realizaciones, la proteína inhibe calicreína plasmática (por ejemplo, calicreína plasmática humana y/o calicreína plasmática murina).

La secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena pesada comprende el dominio variable de la cadena pesada de una proteína descrita en el presente documento y/o la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena ligera comprende el dominio variable de la cadena ligera de una proteína descrita en el presente documento.

30 En algunas realizaciones, la proteína comprende la cadena pesada de una proteína descrita en el presente documento y/o la cadena ligera de una proteína descrita en el presente documento.

35 En algunos aspectos, la invención permite el uso de proteínas codificadas por ácidos nucleicos de la invención en un método de detección de calicreína plasmática en una muestra, comprendiendo el método: poner en contacto la muestra con una proteína de unión a calicreína plasmática (por ejemplo, una proteína de unión a calicreína plasmática descrita en el presente documento); y detectar una interacción entre la proteína y la calicreína plasmática, si está presente.

En algunas realizaciones, la proteína incluye una marca detectable.

40 En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática no se une a precalicreína (por ejemplo, precalicreína humana y/o precalicreína murina), pero se une a la forma activa de calicreína plasmática (por ejemplo, calicreína plasmática humana y/o calicreína plasmática murina). En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática se une a precalicreína (por ejemplo, precalicreína humana y/o precalicreína murina) y la forma activa de calicreína plasmática (por ejemplo, calicreína plasmática humana y/o calicreína plasmática murina).

45 En algunos aspectos, la invención permite el uso de proteínas codificadas por ácidos nucleicos de la invención, en un método para detectar calicreína plasmática en un sujeto, comprendiendo el método: administrar la proteína descrita en el presente documento a un sujeto; y detectar una interacción entre la proteína y la calicreína plasmática en el sujeto, si está presente. Por ejemplo, la detección comprende obtener imágenes del sujeto.

En algunas realizaciones, la proteína incluye además una marca detectable.

50 En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática no se une a precalicreína (por ejemplo, precalicreína humana y/o precalicreína murina), pero se une a la forma activa de calicreína plasmática (por ejemplo, calicreína plasmática humana y/o calicreína plasmática murina). En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática se une a precalicreína (por ejemplo, precalicreína humana y/o precalicreína murina) y la forma activa de calicreína plasmática (por ejemplo, calicreína plasmática humana y/o calicreína plasmática murina).

En algunos aspectos, la invención permite el uso de proteínas codificadas por ácidos nucleicos de la invención, en un método para modular la actividad de calicreína plasmática, por ejemplo, en un método para tratar o prevenir un trastorno asociado con calicreína plasmática. El método incluye: poner en contacto calicreína plasmática con la proteína (por ejemplo, en un sujeto humano), para modular de esa manera la actividad de calicreína plasmática.

- 5 En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática no se une a precalicreína (por ejemplo, precalicreína humana y/o precalicreína murina) pero se une a la forma activa de calicreína plasmática (por ejemplo, calicreína plasmática humana y/o calicreína plasmática murina).

- 10 En algunas realizaciones, el trastorno asociado a calicreína plasmática se selecciona del grupo que consiste en artritis reumatoide, gota, enfermedad intestinal, mucositis oral, dolor neuropático, dolor inflamatorio, enfermedad espinal degenerativa con estenosis del conducto vertebral, trombosis arterial o venosa, íleo posoperatorio, aneurisma aórtica, osteoartritis, vasculitis, edema, angioedema hereditario, edema cerebral, embolia pulmonar, accidente cerebrovascular, coagulación inducida por dispositivos de asistencia ventricular o prótesis endovasculares, traumatismo craneoencefálico o edema cerebral peritumoral, septicemia, evento isquémico agudo de la arteria cerebral media (ACM) (accidente cerebrovascular), reestenosis (por ejemplo, después de angioplastia), nefritis por
15 lupus eritematoso sistémico/vasculitis y lesión por quemadura.

- En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática reduce la coagulación aberrante asociada con el sistema de activación de contacto (es decir, sistema de activación intrínseca) en al menos 10 % como se mide por, por ejemplo, un ensayo de coagulación de APTT. En otras realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática reduce la coagulación aberrante asociada con el sistema de activación de contacto en al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 99 %, o incluso 100 % (es decir, sin coagulación aberrante detectable).
20

- En algunos aspectos, la invención permite el uso de proteínas codificadas por ácidos nucleicos de la invención en un método de tratamiento de un trastorno asociado a calicreína plasmática, comprendiendo el método administrar, a un sujeto, la proteína en una cantidad suficiente para tratar un trastorno asociado a calicreína plasmática en el sujeto. El método puede incluir además proporcionar al sujeto una segunda terapia que es terapia para el trastorno asociado a calicreína plasmática, por ejemplo, como se describe en el presente documento.
25

- En algunas realizaciones, el trastorno asociado a calicreína plasmática se selecciona del grupo que consiste en artritis reumatoide, gota, enfermedad intestinal, mucositis oral, dolor neuropático, dolor inflamatorio, enfermedad espinal degenerativa con estenosis del conducto vertebral, trombosis arterial o venosa, íleo posoperatorio, aneurisma aórtica, osteoartritis, vasculitis, edema, angioedema hereditario, edema cerebral, embolia pulmonar, accidente cerebrovascular, coagulación inducida por dispositivos de asistencia ventricular o prótesis endovasculares, traumatismo craneoencefálico o edema cerebral peritumoral, septicemia, evento isquémico agudo de la arteria cerebral media (ACM) (accidente cerebrovascular), reestenosis (por ejemplo, después de angioplastia), nefritis por lupus eritematoso sistémico/vasculitis y lesión por quemadura.
30

- 35 En algunos aspectos, la invención permite el uso de proteínas codificadas por ácidos nucleicos de la invención en un método de obtención de imágenes de un sujeto. El método incluye administrar la proteína al sujeto y, por ejemplo, detectar una interacción entre la proteína y la calicreína plasmática en el sujeto, si está presente.

- En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática no se une a precalicreína (por ejemplo, precalicreína humana y/o precalicreína murina), pero se une a la forma activa de calicreína plasmática (por ejemplo, calicreína plasmática humana y/o calicreína plasmática murina). En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática se une a precalicreína (por ejemplo, precalicreína humana y/o precalicreína murina) y la forma activa de calicreína plasmática (por ejemplo, calicreína plasmática humana y/o calicreína plasmática murina).
40

En algunas realizaciones, la proteína no inhibe la actividad de calicreína plasmática.

- 45 En algunas realizaciones, la proteína inhibe la actividad de calicreína plasmática (por ejemplo, calicreína plasmática humana y/o calicreína plasmática murina).

En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática puede incluir una marca detectable (por ejemplo, un radionúclido o una marca detectable por IRM).

En algunas realizaciones, el sujeto tiene o se sospecha que tiene un trastorno asociado a calicreína plasmática. El método es útil, por ejemplo, para el diagnóstico de un trastorno asociado a calicreína plasmática.

- 50 En algunas realizaciones, el trastorno asociado a calicreína plasmática se selecciona del grupo que consiste en artritis reumatoide, gota, enfermedad intestinal, mucositis oral, dolor neuropático, dolor inflamatorio, enfermedad espinal degenerativa con estenosis del conducto vertebral, trombosis arterial o venosa, íleo posoperatorio, aneurisma aórtica, osteoartritis, vasculitis, edema, angioedema hereditario, edema cerebral, embolia pulmonar, accidente cerebrovascular, coagulación inducida por dispositivos de asistencia ventricular o prótesis endovasculares, traumatismo craneoencefálico o edema cerebral peritumoral, septicemia, evento isquémico agudo de la arteria
55

cerebral media (ACM) (accidente cerebrovascular), reestenosis (por ejemplo, después de angioplastia), nefritis por lupus eritematoso sistémico y lesión por quemadura.

5 En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática reduce la coagulación aberrante asociada con el sistema de activación de contacto (es decir, sistema de activación intrínseca) en al menos 10 % como se mide por, por ejemplo, un ensayo de coagulación de APTT (por ejemplo, en al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 99 %, o incluso 100 % (es decir, sin coagulación aberrante detectable)).

10 En algunos aspectos, la invención permite el uso de proteínas codificadas por ácidos nucleicos de la invención en un método de obtención de imágenes de calicreína plasmática, por ejemplo, en un sujeto o muestra (por ejemplo, muestra de biopsia). El método incluye administrar la proteína, por ejemplo, al sujeto o la muestra, y detectar una interacción entre la proteína y la calicreína plasmática, si está presente.

15 En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática no se une a precalicreína (por ejemplo, precalicreína humana y/o precalicreína murina), pero se une a la forma activa de calicreína plasmática (por ejemplo, calicreína plasmática humana y/o calicreína plasmática murina). En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática se une a precalicreína (por ejemplo, precalicreína humana y/o precalicreína murina) y la forma activa de calicreína plasmática (por ejemplo, calicreína plasmática humana y/o calicreína plasmática murina).

En algunas realizaciones, la proteína no inhibe la actividad de calicreína plasmática.

En algunas realizaciones, la proteína inhibe la actividad de calicreína plasmática (por ejemplo, calicreína plasmática humana y/o calicreína plasmática murina).

20 En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática puede incluir una marca detectable (por ejemplo, un radionúclido o una marca detectable por IRM).

En algunas realizaciones, el sujeto tiene o se sospecha que tiene un trastorno asociado a calicreína plasmática. El método es útil, por ejemplo, para el diagnóstico de un trastorno asociado a calicreína plasmática.

25 En algunas realizaciones, el trastorno asociado a calicreína plasmática se selecciona del grupo que consiste en artritis reumatoide, gota, enfermedad intestinal, mucositis oral, dolor neuropático, dolor inflamatorio, enfermedad espinal degenerativa con estenosis del conducto vertebral, trombosis arterial o venosa, íleo posoperatorio, aneurisma aórtica, osteoartritis, vasculitis, edema, angioedema hereditario, edema cerebral, embolia pulmonar, accidente cerebrovascular, coagulación inducida por dispositivos de asistencia ventricular o prótesis endovasculares, traumatismo craneoencefálico o edema cerebral peritumoral, septicemia, evento isquémico agudo de la arteria cerebral media (ACM) (accidente cerebrovascular), reestenosis (por ejemplo, después de angioplastia), nefritis por lupus eritematoso sistémico y lesión por quemadura.

35 En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática reduce la coagulación aberrante asociada con el sistema de activación de contacto (es decir, sistema de activación intrínseca) en al menos 10 % como se mide por, por ejemplo, un ensayo de coagulación de APTT (por ejemplo, en al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 99 %, o incluso 100 % (es decir, sin coagulación aberrante detectable)).

40 En algunos aspectos, la invención permite el uso de proteínas codificadas por ácidos nucleicos de la invención para el tratamiento de un trastorno descrito en el presente documento, por ejemplo, artritis reumatoide, gota, enfermedad intestinal, mucositis oral, dolor neuropático, dolor inflamatorio, enfermedad espinal degenerativa con estenosis del conducto vertebral, trombosis arterial o venosa, íleo posoperatorio, aneurisma aórtica, osteoartritis, vasculitis, edema, angioedema hereditario, edema cerebral, embolia pulmonar, accidente cerebrovascular, coagulación inducida por dispositivos de asistencia ventricular o prótesis endovasculares, traumatismo craneoencefálico o edema cerebral peritumoral, septicemia, evento isquémico agudo de la arteria cerebral media (ACM) (accidente cerebrovascular), reestenosis (por ejemplo, después de angioplastia), nefritis por lupus eritematoso sistémico, o lesión por quemadura; o para promover la cicatrización.

45 En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática no se une a precalicreína (por ejemplo, precalicreína humana y/o precalicreína murina), pero se une a la forma activa de calicreína plasmática (por ejemplo, calicreína plasmática humana y/o calicreína plasmática murina). En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática se une a precalicreína (por ejemplo, precalicreína humana y/o precalicreína murina) y la forma activa de calicreína plasmática (por ejemplo, calicreína plasmática humana y/o calicreína plasmática murina).

50 En algunos aspectos, la invención permite el uso de proteínas codificadas por ácidos nucleicos de la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno descrito en el presente documento, por ejemplo, artritis reumatoide, gota, enfermedad intestinal, mucositis oral, dolor neuropático, dolor inflamatorio, enfermedad espinal degenerativa con estenosis del conducto vertebral, trombosis arterial o venosa, íleo posoperatorio, aneurisma aórtica, osteoartritis, vasculitis, edema, angioedema hereditario, edema cerebral, embolia pulmonar, accidente cerebrovascular, coagulación inducida por dispositivos de asistencia ventricular o prótesis

endovasculares, traumatismo craneoencefálico o edema cerebral peritumoral, septicemia, evento isquémico agudo de la arteria cerebral media (ACM) (accidente cerebrovascular), reestenosis (por ejemplo, después de angioplastia), nefritis por lupus eritematoso sistémico o lesión por quemadura; o para la fabricación de un medicamento para la cicatrización.

5 En algunas realizaciones, la proteína de unión a caliceína plasmática reduce la coagulación aberrante asociada con el sistema de activación de contacto (es decir, sistema de activación intrínseca) en al menos 10 % como se mide por, por ejemplo, un ensayo de coagulación de APTT (por ejemplo, en al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 99 %, o incluso 100 % (es decir, sin coagulación aberrante detectable)).

10 En algunas realizaciones, la proteína de unión a caliceína plasmática no se une a precaliceína (por ejemplo, precaliceína humana y/o precaliceína murina), pero se une a la forma activa de caliceína plasmática (por ejemplo, caliceína plasmática humana y/o caliceína plasmática murina).

Los detalles de una o más realizaciones de la invención se exponen en los dibujos adjuntos y la descripción que sigue. Otras características, objetos y ventajas de la invención serán aparentes en la descripción y dibujos y en las reivindicaciones.

15

Breve descripción de dibujos

La FIGURA 1 es una representación esquemática de la función de la caliceína plasmática (pCal) en la vía de coagulación intrínseca e inflamación.

20 La FIGURA 2 representa el efecto de M162-A04 sobre el edema en pata de rata inducido por carragenina. Se midió la inflamación de la pata por desplazamiento de agua.

La FIGURA 3 representa el efecto de M162-A04 sobre la hiperalgesia térmica inducida por carragenina. Se midió la latencia del dolor por el método de Hargreaves después de la inyección de carragenina.

25 La FIGURA 4 representa el alineamiento de la secuencia de ADN de la cadena ligera de versiones no retromutadas a la línea germinal (X63-G06) y optimizadas en codones (X81-B01) retromutadas a la línea germinal del mismo anticuerpo descubierto usando maduración por afinidad ROLIC. Se conservan las posiciones indicadas con un asterisco (*), mientras que los espacios en blanco corresponden a bases cambiadas en X81-B01 debido a cualquier optimización de codones o retromutación a la línea germinal.

30 La FIGURA 5 representa el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de versiones no retromutadas a la línea germinal (X63-G06) y optimizadas en codones (X81-B01) retromutadas a la línea germinal del mismo anticuerpo descubierto usando maduración por afinidad ROLIC. Se conservan las posiciones indicadas con un asterisco (*), mientras que los espacios en blanco corresponden a bases cambiadas en X81-B01 debido a retromutación a la línea germinal. Se diferencian un total de 11 entre el anticuerpo no retromutado a la línea germinal (X63-G06) y optimizado en codones (X81-B01) retromutado a la línea germinal.

35 La FIGURA 6 representa el alineamiento de la secuencia de ADN de la cadena pesada de versiones no retromutadas a la línea germinal (X63-G06) y optimizadas en codones (X81-B01) retromutadas a la línea germinal del mismo anticuerpo usando maduración por afinidad ROLIC. Se conservan las posiciones indicadas con un asterisco (*), mientras que los espacios en blanco corresponden a bases cambiadas en X81-B01 debido a la optimización de codones.

40 La FIGURA 7 representa el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de versiones no retromutadas a la línea germinal (X63-G06) y optimizadas en codones (X81-B01) retromutadas a la línea germinal del mismo anticuerpo usando maduración por afinidad ROLIC. Se conservan las posiciones indicadas con un asterisco (*). Los dos anticuerpos tienen la misma secuencia de aminoácidos en la cadena pesada.

45 La FIGURA 8A representa la competición de EPI-KAL2 por pCal de unión a X81-B01. Se capturó X81-B01 (IgG) en una superficie específica de fragmento anti-Fc humano de un chip CM5 BIACORE®. Se hizo circular pCal (100 nM) sobre la superficie en presencia (sensograma inferior en la figura) o ausencia de EPI-KAL2 1 µM (sensograma superior en la figura).

50 La FIGURA 8B representa la competición de EPI-KAL2 por pCal de unión a X67-D03. Se capturó X67-D03 (IgG) en una superficie específica de fragmento anti-Fc humano de un chip CM5 Biacore. Se hizo circular pCal (100 nM) sobre la superficie en presencia (sensograma inferior en la figura) o ausencia de EPI-KAL2 1 µM (sensograma superior en la figura).

La FIGURA 9 representa los resultados del mapeo de epítopes CLIPS para los anticuerpos indicados en la Tabla 12.

Las FIGURAS 10A-10C representan el alineamiento ClustalW de secuencias de pCal de diferentes especies. Las posiciones indicadas por a "" son posiciones conservadas entre, mientras que las posiciones indicadas ":" indican sustituciones conservativas entre especies. Las posiciones indicadas por a "." tienen sustituciones no conservativas

en algunas especies. Se mostró que las extensiones de aminoácidos indicadas por el símbolo "@" estaban altamente expuestas a disolvente por cálculo del área superficial accesible al disolvente. Las extensiones de los aminoácidos indicadas por un "+" se identificaron como posibles epítopes de los anticuerpos enumerados en la Tabla 12. Se encontró por cálculo del área superficial accesible al disolvente que los aminoácidos resaltados en gris estaban enterrados cuando se complejaron con un inhibidor de sitio activo de dominio de Kunitz. Las posiciones subrayadas son los aminoácidos que forman la triada catalítica (His434, Asp483 y Ser578, numeración basada en la secuencia humana).

Las FIGURAS 11a y 11B representan un análisis de competición Biacore con epi-kal2, como se describe en el presente documento en el Ejemplo 12, para los anticuerpos (i) DX-2922 y (ii) M6-D09.

La FIGURA 12 representa un análisis de competición Biacore con AEBSF, como se describe en el presente documento en el Ejemplo 12, para los anticuerpos (i) DX-2911 y (ii) M6-D09.

La FIGURA 13 representa un análisis Biocore que muestra que DX-2922 se une a calicreína plasmática que se une a **cininógeno de alto peso molecular (HMWK)**.

La FIGURA 14 representa un gráfico que muestra la inhibición de edema dependiente de la dosis por X101-A01 en el edema en la pata de rata inducido por carragenina (CPE) en ratas.

Descripción detallada

Definiciones

Por comodidad, antes de la descripción adicional de la presente invención, se definen a continuación ciertos términos empleados en la memoria descriptiva, ejemplos y reivindicaciones adjuntas. Otros términos se definen como aparecen en la memoria descriptiva.

Las formas en singular "un", "una", "el" y "la" incluyen referencias al plural, a menos que el contexto dicte claramente de otro modo.

El término "agonista," como se usa en el presente documento, se entiende que se refiere a un agente que imita o regula por incremento (por ejemplo, potencia o complementa) la bioactividad de una proteína. Un agonista puede ser una proteína natural o derivado de la misma que tiene al menos una bioactividad de la proteína natural. Un agonista también puede ser un compuesto que aumenta al menos una bioactividad de una proteína. Un agonista también puede ser un compuesto que aumenta la interacción de un polipéptido con otra molécula, por ejemplo, un péptido o ácido nucleico diana.

"Antagonista", como se usa en el presente documento, se entiende que se refiere a un agente que regula por disminución (por ejemplo, suprime o inhibe) al menos una bioactividad de una proteína. Un antagonista puede ser un compuesto que inhibe o disminuye la interacción entre una proteína y otra molécula, por ejemplo, un péptido o sustrato enzimático diana. Un antagonista también puede ser un compuesto que reduce la cantidad de proteína expresada presente.

El término "anticuerpo" se refiere a una proteína que incluye al menos un dominio variable de inmunoglobulina (región variable) o secuencia de dominio variable de inmunoglobulina (región variable). Por ejemplo, un anticuerpo puede incluir una región variable de la cadena pesada (H) (abreviada en el presente documento VH o HV), y una región variable de la cadena ligera (L) (abreviada en el presente documento VL o LV). En otro ejemplo, un anticuerpo incluye dos regiones variables de la cadena pesada (H) y dos regiones variables de la cadena ligera (L). El término "anticuerpo" engloba fragmentos de unión al antígeno de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monocatenarios, Fab y fragmentos sFab, F(ab')₂, fragmentos Fd, fragmentos Fv, scFv y fragmentos de anticuerpos de dominio (dAb) (de Wildt et al., Eur J Immunol. 1996; 26(3):629-39)), así como anticuerpos completos. Un anticuerpo puede tener las características estructurales de IgA, IgG, IgE, IgD, IgM (así como subtipos de las mismas). Los anticuerpos pueden ser de cualquier fuente, pero se prefieren de primate (primate humano y no humano) y primatizados.

Las regiones VH y VL se pueden subdividir además en regiones de hipervariabilidad, denominadas "regiones determinantes de la complementariedad" ("CDR"), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas "regiones estructurales" ("FR"). Se ha definido el grado de la región estructural y CDR (véanse, Kabat, E.A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, Publicación NIH Nº 91-3242, y Chothia, C. et al. (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917). Las definiciones de Kabat se usan en el presente documento. Cada VH y VL normalmente está compuesto de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino hasta el extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

Como se usa en el presente documento, una "secuencia de dominio variable de inmunoglobulina" se refiere a una secuencia de aminoácidos que puede formar la estructura de un dominio variable de inmunoglobulina de forma que una o más regiones CDR estén situadas en una conformación adecuada para un sitio de unión al antígeno. Por

ejemplo, la secuencia puede incluir toda o parte de la secuencia de aminoácidos de un dominio variable que existe de forma natural. Por ejemplo, la secuencia puede omitir uno, dos o más aminoácidos del extremo N o C, aminoácidos internos, puede incluir una o más inserciones o aminoácidos terminales adicionales, o puede incluir otras alteraciones. En una realización, un polipéptido que incluye la secuencia de dominio variable de inmunoglobulina se puede asociar con otra secuencia de dominio variable de inmunoglobulina para formar un sitio de unión al antígeno, por ejemplo, una estructura que interacciona preferencialmente con calicreína plasmática.

La cadena VH o VL del anticuerpo puede incluir además toda o parte de una región constante de la cadena pesada o ligera, para así formar una cadena de inmunoglobulina pesada o ligera, respectivamente. En una realización, el anticuerpo es un tetrámero de dos cadenas de inmunoglobulina pesadas y dos cadenas de inmunoglobulina ligeras, en el que las cadenas de inmunoglobulina pesadas y ligeras están interconectadas por, por ejemplo, enlaces disulfuro. En las IgG, la región constante de la cadena pesada incluye tres dominios de inmunoglobulina, CH1, CH2 y CH3. La región constante de la cadena ligera incluye un dominio CL. La región variable de las cadenas pesadas y ligeras contiene un dominio de unión que interacciona con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos normalmente median en la unión del anticuerpo a tejidos o factores del hospedador, que incluyen diversas células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema del complemento clásico. Las cadenas ligeras de la inmunoglobulina pueden ser de tipos kappa o lambda. En una realización, el anticuerpo está glucosilado. Un anticuerpo puede ser funcional para la citotoxicidad dependiente de anticuerpo y/o citotoxicidad mediada por el complemento.

Una o más regiones de un anticuerpo pueden ser humanas o efectivamente humanas. Por ejemplo, una o más de las regiones variables pueden ser humanas o efectivamente humanas. Por ejemplo, una o más de las CDR pueden ser humanas, por ejemplo, HC-CDR1, HC-CDR2, HC-CDR3, LC-CDR1, LC-CDR2 y/o LC-CDR3. Cada una de las CDR de la cadena ligera (LC) y/o cadena pesada (HC) puede ser humana. HC-CDR3 puede ser humana. Una o más de las regiones estructurales pueden ser humanas, por ejemplo, FR1, FR2, FR3 y/o FR4 de HC y/o LC. Por ejemplo, la región Fc puede ser humana. En una realización, todas las regiones estructurales son humanas, por ejemplo, derivadas de una célula somática humana, por ejemplo, una célula hematopoyética que produce inmunoglobulinas o una célula no hematopoyética. En una realización, las secuencias humanas son secuencias de la línea germinal, por ejemplo, codificadas por un ácido nucleico de la línea germinal. En una realización, los restos de la región estructural (FR) de un Fab seleccionado se pueden convertir en el tipo de aminoácido del resto correspondiente en el gen de la línea germinal de primate más similar, especialmente el gen de la línea germinal humana. Una o más de las regiones constantes pueden ser humanas o efectivamente humanas. Por ejemplo, al menos 70, 75, 80, 85, 90, 92, 95, 98 o 100 % de un dominio variable de inmunoglobulina, la región constante, los dominios constantes (CH1, CH2, CH3 y/o CL1), o el anticuerpo entero, pueden ser humanos o efectivamente humanos.

Todo o parte de un anticuerpo se puede codificar por un gen de inmunoglobulina o un segmento del mismo. Genes de inmunoglobulina humana a modo de ejemplo incluyen los genes de la región constante kappa, lambda, alfa (IgA1 e IgA2), gamma (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), delta, épsilon y mu, así como los muchos genes de la región variable de inmunoglobulina. Las "cadenas ligeras" de la inmunoglobulina de longitud completa (aproximadamente 25 KDa o aproximadamente 214 aminoácidos) están codificadas por un gen de la región variable en el extremo NH2 (aproximadamente 110 aminoácidos) y un gen de la región constante kappa o lambda en el extremo COOH. Las "cadenas pesadas" de inmunoglobulina de longitud completa (aproximadamente 50 KDa o aproximadamente 446 aminoácidos) están similarmente codificadas por un gen de la región variable (aproximadamente 116 aminoácidos) y uno de los otros genes de la región constante anteriormente mencionados, por ejemplo, gamma (que codifica aproximadamente 330 aminoácidos). La longitud de HC humana varía considerablemente debido a que HC-CDR3 varía desde aproximadamente 3 restos de aminoácido hasta más de 35 restos de aminoácido.

El término "fragmento de unión al antígeno" de un anticuerpo de longitud completa se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo de longitud completa que retienen la capacidad para unirse específicamente a una diana de interés. Los ejemplos de fragmentos de unión englobados dentro del término "fragmento de unión al antígeno" de un anticuerpo de longitud completa y que retienen la funcionalidad incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que incluye dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de brazo único de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), que consiste en un dominio VH; y (vi) una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, se pueden unir, usando métodos recombinantes, por un conector sintético que les permite separarse como una única cadena de proteína en la que las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes conocidas como Fv monocatenario (scFv). Véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. Nº 5.260.203, 4.946.778 y 4.881.175; Bird et al. (1988) Science 242:423-426; y Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883.

Se pueden obtener fragmentos de anticuerpos usando cualquier técnica apropiada que incluye técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica. El término "anticuerpo monoespecífico" se refiere a un anticuerpo que muestra una única especificidad de unión y afinidad por una diana particular, por ejemplo, epítope. Este término incluye un "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal" que, como se usa en el

presente documento, se refiere a una preparación de anticuerpos o fragmentos de los mismos de composición molecular única, independientemente de cómo se generó el anticuerpo.

Los anticuerpos "se retromutan a la línea germinal" invirtiendo uno o más aminoácidos no de la línea germinal en regiones estructurales a aminoácidos de la línea germinal correspondientes del anticuerpo, en tanto que retengan sustancialmente las propiedades de unión.

La constante de inhibición (K_i) proporciona una medida de la potencia del inhibidor; es la concentración de inhibidor requerida para reducir la actividad enzimática a la mitad y no depende de las concentraciones de enzima o sustrato. La K_i aparente ($K_{i,ap}$) se obtiene a diferentes concentraciones de sustrato midiendo el efecto inhibitorio de diferentes concentraciones de inhibidor (por ejemplo, proteína de unión inhibitoria) sobre el grado de la reacción (por ejemplo, actividad enzimática); el ajuste del cambio en la constante de velocidad de pseudo-primer orden en función de la concentración de inhibidor a la ecuación de Morrison (Ecuación 1) da una estimación del valor de K_i aparente. K_i se obtiene a partir de la ordenada en el origen extraída de un análisis de regresión lineal de una representación de $K_{i,ap}$ frente a la concentración de sustrato.

$$v = v_o - v_o \left(\frac{(K_{i,ap} + I + E) - \sqrt{(K_{i,ap} + I + E)^2 - 4 \cdot I \cdot E}}{2 \cdot E} \right)$$

Ecuación 1

Donde v = velocidad medida; v_o = velocidad en ausencia de inhibidor; $K_{i,ap}$ = constante de inhibición aparente; I = concentración de inhibidor total; y E = concentración enzimática total.

Como se usa en el presente documento, "afinidad de unión" se refiere a la constante de asociación aparente o K_A . K_A es el recíproco de la constante de disociación (K_D). Una proteína de unión puede tener, por ejemplo, una afinidad de unión de al menos 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} y 10^{11} M^{-1} por una molécula diana particular, por ejemplo, calicreína plasmática. La unión de mayor afinidad de una proteína de unión a una primera diana con respecto a una segunda diana se puede indicar por una mayor K_A (o un valor numérico de K_D más pequeño) para la unión de la primera diana que la K_A (o valor numérico K_D) para la unión de la segunda diana. En tales casos, la proteína de unión tiene especificidad por la primera diana (por ejemplo, una proteína en una primera conformación o imitán de la misma) con respecto a la segunda diana (por ejemplo, la misma proteína en una segunda conformación o mimético de la misma; o una segunda proteína). Las diferencias en la afinidad de unión (por ejemplo, para especificidad u otras comparaciones) puede ser al menos 1,5, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 37,5, 50, 70, 80, 91, 100, 500, 1000, 10.000 o 10^5 veces.

La afinidad de unión se puede determinar por una variedad de métodos que incluyen diálisis en equilibrio, unión en equilibrio, filtración en gel, ELISA, resonancia de plasmones superficiales o espectroscopía (por ejemplo, usando un ensayo de fluorescencia). Las condiciones a modo de ejemplo para evaluar la afinidad de unión son en tampón HBS-P (HEPES 10 mM a pH 7,4, NaCl 150 mM, 0,005 % (v/v) de tensioactivo P20). Estas técnicas se pueden usar para medir la concentración de proteína de unión unida y libre en función de la concentración de proteína de unión (o diana). La concentración de proteína de unión unida ($[Unida]$) se relaciona con la concentración de proteína de unión libre ($[Libre]$) y la concentración de sitios de unión para la proteína de unión en la diana donde (N) es el número de sitios de unión por molécula diana por la siguiente ecuación:

$$[Unida] = N \cdot [Libre] / ((1/K_A) + [Libre]).$$

No siempre es necesario hacer una determinación exacta de K_A , aunque, puesto que algunas veces es suficiente obtener una medición de afinidad cuantitativa, por ejemplo, determinada usando un método tal como análisis de ELISA o FACS, es proporcional a K_A , y así se pueden usar para comparaciones, tales como determinar si una mayor afinidad es, por ejemplo, 2 veces mayor, para obtener una medición de afinidad cualitativa, o para obtener una inferencia de la afinidad, por ejemplo, por actividad en un ensayo funcional, por ejemplo, un ensayo *in vitro* o *in vivo*.

El término "proteína de unión" se refiere a una proteína que puede interaccionar con una molécula diana. Este término se usa indistintamente con "ligando". Una "proteína de unión a calicreína plasmática" se refiere a una proteína que puede interaccionar con (por ejemplo, se une a) calicreína plasmática, e incluye, en particular, proteínas que interaccionan preferencial o específicamente con y/o inhiben la calicreína plasmática. Una proteína inhibe la calicreína plasmática si causa una disminución en la actividad de calicreína plasmática en comparación con la actividad de calicreína plasmática en ausencia de la proteína y en las mismas condiciones. En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática es un anticuerpo.

Una "sustitución de aminoácidos conservativa" es una en la que el resto de aminoácido se sustituye por un resto de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Se han definido en la técnica las familias de restos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas

laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina).

Es posible que uno o más restos de aminoácidos de la región estructural y/o CDR de una proteína de unión incluyan una o más mutaciones (por ejemplo, sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservativas o sustituciones de aminoácidos no esenciales), inserciones, o delecciones) con respecto a una proteína de unión descrita en el presente documento. Una proteína de unión a calicreína plasmática puede tener mutaciones (por ejemplo, sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservativas o sustituciones de aminoácidos no esenciales), inserciones, o delecciones) (por ejemplo, al menos una, dos, tres, o cuatro y/o menos de 15, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 o 2 mutaciones) con respecto a una proteína de unión descrita en el presente documento, por ejemplo, mutaciones que no tienen un efecto funcional sobre la función de la proteína. Las mutaciones pueden estar presentes en regiones estructurales, CDR y/o regiones constantes. En ocasiones, las mutaciones están presentes en una región estructural. En ocasiones, las mutaciones están presentes en una CDR. En algunas realizaciones, las mutaciones están presentes en una región constante. Se puede predecir si una sustitución particular será o no tolerada, es decir, no afectará adversamente las propiedades biológicas, tales como la actividad de unión, por ejemplo, evaluando si la mutación es conservativa o por el método de Bowie, et al. (1990) Science 247:1306-1310.

Las secuencias de motivos para los biopolímeros pueden incluir posiciones que pueden ser aminoácidos variados. Por ejemplo, el símbolo "X" en dicho contexto se refiere generalmente a cualquier aminoácido (por ejemplo, cualquiera de los veinte aminoácidos naturales), a menos que se especifique de otro modo, por ejemplo, se refiere a cualquier aminoácido distinto de cisteína. También se puede indicar otros aminoácidos permitidos, por ejemplo, usando paréntesis y barras. Por ejemplo, "(A/W/F/N/Q)" significa que se permiten alanina, triptófano, fenilalanina, asparagina y glutamina en esa posición particular.

Una región variable de inmunoglobulina "eficazmente humana" es una región variable de inmunoglobulina que incluye un número suficiente de posiciones de aminoácidos de la región estructural humana de forma que la región variable de inmunoglobulina no provoque una respuesta inmunogénica en un humano normal. Un anticuerpo "eficazmente humano" es un anticuerpo que incluye un número suficiente de posiciones de aminoácidos humanas de forma que el anticuerpo no provoque una respuesta inmunogénica en un humano normal.

Un "epítipo" se refiere al sitio en un compuesto diana que es unido por una proteína de unión (por ejemplo, un anticuerpo tal como un Fab o anticuerpo de longitud completa). En el caso en el que el compuesto diana sea una proteína, el sitio puede estar completamente compuesto de componentes de aminoácido, completamente compuesto de modificaciones químicas de aminoácidos de la proteína (por ejemplo, restos de glucosilo), o compuesto de combinaciones de los mismos. Los epítopos de solapamiento incluyen al menos un resto de aminoácido común, grupo glucosilo, grupo fosfato, grupo sulfato, u otra molecular característica.

Una primera proteína de unión (por ejemplo, anticuerpo) "se une al mismo epítipo" que una segunda proteína de unión (por ejemplo, anticuerpo) si la primera proteína de unión se une al mismo sitio en un compuesto diana al que se une la segunda proteína de unión, o se une a un sitio que solapa (por ejemplo, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, o 100 % de solapamiento, por ejemplo, en términos de la secuencia de aminoácidos u otra característica molecular (por ejemplo, grupo glucosilo, grupo fosfato o grupo sulfato)) con el sitio al que se une la segunda proteína de unión.

Una primera proteína de unión (por ejemplo, anticuerpo) "compite por la unión" con una segunda proteína de unión (por ejemplo, anticuerpo) si la unión de la primera proteína de unión a su epítipo disminuye (por ejemplo, en 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, o más) la cantidad de la segunda proteína de unión que se une a su epítipo. La competición puede ser directa (por ejemplo, la primera proteína de unión se une a un epítipo que es el mismo que, o solapa con, el epítipo unido por la segunda proteína de unión), o indirecta (por ejemplo, la unión de la primera proteína de unión a su epítipo causa un cambio estérico en el compuesto diana que disminuye la capacidad de la segunda proteína de unión para unirse a su epítipo).

Los cálculos de "homología" o "identidad de secuencia" entre dos secuencias (los términos se usan indistintamente en el presente documento) se realizan del siguiente modo. Se alinean las secuencias para fines de comparación óptima (por ejemplo, se pueden introducir huecos en una o ambas de una primera y una segunda secuencia de aminoácidos o de ácidos nucleicos para el alineamiento óptimo y se pueden ignorar secuencias no homólogas para fines de comparación). El alineamiento óptimo se determina como la mejor puntuación usando el programa GAP en el paquete de software GCG con una matriz de puntuación Blossum 62 con una penalización por hueco de 12, una penalización por extensión de hueco de 4 y una penalización por hueco con desplazamiento de marco de 5. Entonces se comparan los restos de aminoácidos o nucleótidos en correspondientes posiciones de aminoácidos o posiciones de nucleótidos. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo resto de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición (como se usa en el presente documento, la "identidad" de aminoácidos o ácidos nucleicos es equivalente a la "homología" de aminoácidos o ácidos nucleicos). El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias.

En una realización preferida, la longitud de una secuencia de referencia alineada para fines de comparación es al menos 30 %, preferentemente al menos 40 %, más preferentemente al menos 50 %, incluso más preferentemente al menos 60 %, e incluso más preferentemente al menos 70 %, 80 %, 90 %, 92 %, 95 %, 97 %, 98 % o 100 % de la longitud de la secuencia de referencia. Por ejemplo, la secuencia de referencia puede ser la longitud de la secuencia de dominio variable de inmunoglobulina.

Una región variable de inmunoglobulina "humanizada" es una región variable de inmunoglobulina que se modifica para incluir un número suficiente de posiciones de aminoácidos de la región estructural humana de forma que la región variable de inmunoglobulina no provoque una respuesta inmunogénica en un humano normal. Las descripciones de inmunoglobulinas "humanizadas" incluyen, por ejemplo, los documentos U.S. 6.407.213 y U.S. 5.693.762.

Como se usa en el presente documento, el término "se hibrida en condiciones de baja rigurosidad, media rigurosidad, alta rigurosidad, o condiciones de muy alta rigurosidad" describe condiciones para la hibridación y el lavado. La orientación para realizar reacciones de hibridación se puede encontrar en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Se describen métodos acuosos y no acuosos en esa referencia y se puede usar cualquiera. Las condiciones de hibridación específicas referidas en el presente documento son las siguientes: (1) condiciones de hibridación de baja rigurosidad en 6X cloruro sódico/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45 °C, seguido por dos lavados en 0,2X SSC, 0,1 % de SDS al menos a 50 °C (la temperatura de los lavados se pueden aumentar hasta 55 °C para las condiciones de baja rigurosidad); (2) condiciones de hibridación de media rigurosidad en 6X SSC a aproximadamente 45 °C, seguido por uno o más lavados en 0,2X SSC, 0,1 % de SDS a 60 °C; (3) condiciones de hibridación de alta rigurosidad en 6X SSC a aproximadamente 45 °C, seguido por uno o más lavados en 0,2X SSC, 0,1 % de SDS a 65 °C; y (4) condiciones de hibridación de muy alta rigurosidad son fosfato de sodio 0,5 M, 7 % de SDS a 65 °C, seguido por uno o más lavados a 0,2X SSC, 1 % de SDS a 65 °C. Las condiciones de muy alta rigurosidad (4) son las condiciones preferidas y las que se deben usar, a menos que se especifique de otro modo. La divulgación incluye ácidos nucleicos que se hibridan con baja, media, alta o muy alta rigurosidad con un ácido nucleico descrito en el presente documento o con un complemento del mismo, por ejemplo, ácidos nucleicos que codifican una proteína de unión descrita en el presente documento. Los ácidos nucleicos pueden tener la misma longitud o estar dentro de 30, 20 o 10 % de la longitud del ácido nucleico de referencia. El ácido nucleico puede corresponder a una región que codifica una secuencia de dominio variable de inmunoglobulina descrita en el presente documento.

Una "composición aislada" se refiere a una composición que se retira de al menos 90 % de al menos un componente de una muestra natural de la que se puede obtener la composición aislada. Las composiciones producidas artificial o naturalmente pueden ser "composiciones de al menos" un cierto grado de pureza si la especie o población de especies de interés es al menos 5, 10, 25, 50, 75, 80, 90, 92, 95, 98 o 99 % pura en una base en peso-peso.

Una proteína "aislada" se refiere a una proteína que se retira de al menos 90 % de al menos un componente de una muestra natural de la que se puede obtener la proteína aislada. Las proteínas pueden ser "de al menos" un cierto grado de pureza si la especie o población de especies de interés es al menos 5, 10, 25, 50, 75, 80, 90, 92, 95, 98 o 99 % pura en una base en peso-peso.

El término "modulador" se refiere a un polipéptido, ácido nucleico, macromolécula, complejo, molécula, molécula pequeña, compuesto, especie o similares (que existen de forma natural o que no existen de forma natural), o un extracto preparado a partir de materiales biológicos tales como bacterias, plantas, hongos, o células de animales o tejidos, que puede ser capaz de causar modulación. Los moduladores se pueden evaluar para su posible actividad como inhibidores o activadores (directa o indirectamente) de una propiedad funcional, actividad biológica o proceso, o combinación de ellos (por ejemplo, agonista, antagonista parcial, agonista parcial, agonista inverso, antagonista, agentes antimicrobianos, inhibidores de la infección o proliferación microbiana, y similares) por inclusión en ensayos. En dichos ensayos, se pueden cribar de una vez muchos moduladores. La actividad de un modulador puede ser conocida, desconocida o parcialmente conocida.

Un resto de aminoácido "no esencial" es un resto que se puede alterar de la secuencia no mutante del agente de unión, por ejemplo, el anticuerpo, sin suprimir o, más preferentemente, sin alterar sustancialmente una actividad biológica, mientras que el cambio de un resto de aminoácido "esencial" da como resultado una sustancial pérdida de actividad.

Un "paciente", "sujeto" u "hospedador" (estos términos se usan indistintamente) que se va a ser tratar por el método objeto puede significar cualquiera de un animal humano o no humano.

Los términos "precalicreína" y "precalicreína plasmática" se usan indistintamente en el presente documento y se refieren a la forma de zimógeno de la calicreína plasmática activa, que también se conoce como precalicreína.

El término "previniendo" o "prevenir" una enfermedad en un sujeto se refiere a someter el sujeto a un tratamiento farmacéutico, por ejemplo, la administración de un fármaco, de forma que se prevenga al menos un síntoma de la enfermedad, es decir, se administra antes de la manifestación clínica de la afección no deseada (por ejemplo, enfermedad u otro estado no deseado del animal hospedador) de manera que proteja al hospedador contra el

desarrollo de la afección no deseada. "Prevenir" una enfermedad también se puede denominar "profilaxis" o "tratamiento profiláctico".

Como se usa en el presente documento, el término "sustancialmente idéntica" (o "sustancialmente homóloga") se usa en el presente documento para referirse a una primera secuencia de aminoácidos o de ácidos nucleicos que contiene un número suficiente de restos de aminoácidos o nucleótidos idénticos o equivalentes (por ejemplo, con una cadena lateral similar, por ejemplo, sustituciones de aminoácidos conservadas) a una segunda secuencia de aminoácidos o de ácidos nucleicos de forma que la primera y segunda secuencias de aminoácidos o de ácidos nucleicos tengan (o codifiquen proteínas que tienen) actividades similares, por ejemplo, una actividad de unión, una preferencia de unión, o una actividad biológica. En el caso de anticuerpos, el segundo anticuerpo tiene la misma especificidad y tiene al menos 50 %, al menos 25 %, o al menos 10 % de la afinidad con respecto al mismo antígeno.

Las secuencias similares u homólogas (por ejemplo, al menos aproximadamente 85 % de identidad de secuencia) a las secuencias desveladas en el presente documento también son parte de la presente solicitud. En algunas realizaciones, la identidad de secuencia puede ser aproximadamente 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o mayor. En algunas realizaciones, una proteína de unión a calicreína plasmática puede tener aproximadamente 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o mayor identidad de secuencia con una proteína de unión descrita en el presente documento. En algunas realizaciones, una proteína de unión a calicreína plasmática puede tener aproximadamente 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o mayor identidad de secuencia en las regiones estructurales HC y/o LC (por ejemplo, FR 1, 2, 3 y/o 4 HC y/o LC) con una proteína de unión descrita en el presente documento. En algunas realizaciones, una proteína de unión a calicreína plasmática puede tener aproximadamente 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o mayor identidad de secuencia en las CDR HC y/o LC (por ejemplo, CDR1, 2 y/o 3 HC y/o LC) con una proteína de unión descrita en el presente documento. En algunas realizaciones, una proteína de unión a calicreína plasmática puede tener aproximadamente 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o mayor identidad de secuencia en la región constante (por ejemplo, CH1, CH2, CH3 y/o CL1) con una proteína de unión descrita en el presente documento.

Además, existe identidad sustancial cuando los segmentos de ácidos nucleicos se hibridan en condiciones de hibridación selectivas (por ejemplo, condiciones de hibridación altamente rigurosas), con el complemento de la hebra. Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células completas, en un lisado celular, o en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura.

La significación estadística se puede determinar por cualquier método conocido en la técnica. Las pruebas estadísticas a modo de ejemplo incluyen: la prueba de la t de Student, la prueba no paramétrica de la U de Mann Whitney y la prueba estadística no paramétrica de Wilcoxon. Algunas relaciones estadísticamente significativas tienen un valor de P inferior a 0,05 o 0,02. Las proteínas de unión particulares pueden mostrar una diferencia, por ejemplo, en la especificidad o unión que es estadísticamente significativa (por ejemplo, valor de $P < 0,05$ o $0,02$). Los términos "inducir", "inhibir", "potenciar", "elevar", "aumentar", "disminuir" o similares, por ejemplo, que indican diferencias cualitativas o cuantitativas distinguibles entre dos estados, pueden referirse a una diferencia, por ejemplo, una diferencia estadísticamente significativa, entre los dos estados.

Una "dosificación terapéuticamente eficaz" modula preferentemente un parámetro medible, por ejemplo, actividad de calicreína plasmática, en un grado estadísticamente significativo o al menos aproximadamente 20 %, más preferentemente en al menos aproximadamente 40 %, incluso más preferentemente en al menos aproximadamente 60 %, y todavía más preferentemente en al menos aproximadamente 80 % con respecto a los sujetos no tratados. La capacidad de un compuesto para modular un parámetro medible, por ejemplo, un parámetro asociado a enfermedad, se puede evaluar en un sistema de modelo animal predictivo de la eficacia en trastornos y afecciones humanas, por ejemplo, artritis reumatoide u mucositis oral. Alternativamente, esta propiedad de una composición se puede evaluar examinando la capacidad del compuesto para modular un parámetro *in vitro*.

"Tratar" una enfermedad (o afección) en un sujeto o "tratar" un sujeto que tiene una enfermedad se refiere a someter el sujeto a un tratamiento farmacéutico, por ejemplo, la administración de un fármaco, de forma que se cure, alivie o disminuya al menos un síntoma de la enfermedad.

El término "prevenir" una enfermedad en un sujeto se refiere a someter el sujeto a un tratamiento farmacéutico, por ejemplo, la administración de un fármaco, de forma que al menos un síntoma de la enfermedad se prevenga, es decir, se administra antes de la manifestación clínica de la afección no deseada (por ejemplo, enfermedad u otro estado no deseado del animal hospedador) de manera que proteja al hospedador contra el desarrollo de la afección no deseada. "Prevenir" una enfermedad también se puede denominar "profilaxis" o "tratamiento profiláctico".

Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado profiláctico deseado. Normalmente, debido a que una dosis profiláctica se usa en sujetos antes de o en una fase más temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será inferior a la cantidad terapéuticamente eficaz.

Como se usa en el presente documento, el término "DX-2922" se usa incambiabilmente con el término "X101-A01". Otras variantes de este anticuerpo se describen a continuación.

Identificación de anticuerpo	Descripción
X63-G06	Fab no retromutado a la línea germinal descubierto usando ROLIC, misma HC pero diferente LC que M160-G12
X81-B01	IgG retromutada a la línea germinal producida en células HEK 293T
X101-A01	IgG retromutada a la línea germinal producida en células CHO, misma secuencia de HC y LC que X81-B01
DX-2922	Nomenclatura alternativa para X101-A01

Proteínas de unión a caliceína plasmática

Las proteínas de unión a caliceína plasmática pueden ser de longitud completa (por ejemplo, una IgG (por ejemplo, una IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, IgA (por ejemplo, IgA1, IgA2), IgD, y IgE) o pueden incluir solo un fragmento de unión al antígeno (por ejemplo, un fragmento Fab, F(ab')₂ o scFv. La proteína de unión puede incluir dos inmunoglobulinas de la cadena pesada y dos inmunoglobulinas de la cadena ligera, o puede ser un anticuerpo monocatenario. Las proteínas de unión a caliceína plasmática pueden ser proteínas recombinantes tales como anticuerpos humanizados, injertados en CDR, quiméricos, desinmunizados, o generados *in vitro*, y pueden incluir opcionalmente regiones constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. En una realización, la proteína de unión a caliceína plasmática es un anticuerpo monoclonal.

En un aspecto, la divulgación caracteriza una proteína (por ejemplo, una proteína aislada) que se une a caliceína plasmática (por ejemplo, caliceína plasmática humana y/o caliceína murina) e incluye al menos una región variable de inmunoglobulina. Por ejemplo, la proteína incluye una secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena pesada (HC) y/o una secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de la cadena ligera (LC). En una realización, la proteína se une a e inhibe caliceína plasmática, por ejemplo, caliceína plasmática humana y/o caliceína murina.

La proteína puede incluir una o más de las siguientes características: (a) una CDR humana o región estructural humana; (b) la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de HC comprende una o más (por ejemplo, 1, 2 o 3) CDR que son al menos 85, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 % idénticas a una CDR de un dominio variable de HC descrito en el presente documento; (c) la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de LC comprende una o más (por ejemplo, 1, 2 o 3) CDR que son al menos 85, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 % idénticas a una CDR de un dominio variable de LC descrito en el presente documento; (d) la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de LC es al menos 85, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 % idéntica a un dominio variable de LC descrito en el presente documento (por ejemplo, en general o en regiones estructurales o CDR); (e) la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de HC es al menos 85, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 % idéntica a un dominio variable de HC descrito en el presente documento (por ejemplo, en general o en regiones estructurales o CDR); (f) la proteína se une a un epítipo unido por una proteína descrita en el presente documento, o compite por la unión con una proteína descrita en el presente documento; (g) una CDR de primate o región estructural de primate; (h) la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de HC comprende una CDR1 que se diferencia en al menos un aminoácido pero en no más de 2 o 3 aminoácidos de la CDR1 de un dominio variable de HC descrito en el presente documento; (i) la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de HC comprende una CDR2 que se diferencia en al menos un aminoácido pero en no más de 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 aminoácidos de la CDR2 de un dominio variable de HC descrito en el presente documento; (j) la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de HC comprende una CDR3 que se diferencia en al menos un aminoácido pero en no más de 2, 3, 4, 5 o 6 aminoácidos de la CDR3 de un dominio variable de HC descrito en el presente documento; (k) la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de LC comprende una CDR1 que se diferencia en al menos un aminoácido pero en no más de 2, 3, 4 o 5 aminoácidos de la CDR1 de un dominio variable de LC descrito en el presente documento; (l) la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de LC comprende una CDR2 que se diferencia en al menos un aminoácido pero en no más de 2, 3 o 4 aminoácidos de la CDR2 de un dominio variable de LC descrito en el presente documento; (m) la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de LC comprende una CDR3 que se diferencia en al menos un aminoácido pero en no más de 2, 3, 4 o 5 aminoácidos de la CDR3 de un dominio variable de LC descrito en el presente documento; (n) la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de LC se diferencia en al menos un aminoácido pero en no más de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos de un dominio variable de LC descrito en el presente documento (por ejemplo, en general o en regiones estructurales o CDR); y (o) la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de HC se diferencia en al menos un aminoácido pero en no más de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos de un dominio variable de HC descrito en el presente documento (por ejemplo, en general o en regiones estructurales o CDR).

- La proteína de unión a calicreína plasmática puede ser una proteína aislada (por ejemplo, al menos 70, 80, 90, 95, o 99 % libre de otras proteínas). En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática, o composición de la misma, se aísla de fragmentos de escisión de anticuerpos (por ejemplo, DX-2922 escindido) que son inactivos o parcialmente activos (por ejemplo, se unen a calicreína plasmática con una $K_{i,ap}$ de 5000 nM o mayor) en comparación con la proteína de unión a calicreína plasmática. Por ejemplo, la proteína de unión a calicreína plasmática está al menos 70 % libre de dichos fragmentos de escisión de anticuerpos; en otras realizaciones, la proteína de unión está al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 99 % o incluso 100 % libre de fragmentos de escisión de anticuerpos que son inactivos o parcialmente activos.
- La proteína que se une a calicreína plasmática puede además inhibir la calicreína plasmática, por ejemplo, calicreína plasmática humana.
- En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática no se une a precalicreína (por ejemplo, precalicreína humana y/o precalicreína murina), pero se une a la forma activa de calicreína plasmática (por ejemplo, calicreína plasmática humana y/o calicreína murina).
- En ciertas realizaciones, la proteína se une en o cerca del sitio activo del dominio catalítico de calicreína plasmática, o un fragmento de la misma, o se une al epítipo que solapa con el sitio activo de calicreína plasmática.
- En algunos aspectos, la proteína se une al mismo epítipo o compite por la unión con una proteína descrita en el presente documento.
- En ocasiones, la proteína compite con o se une al mismo epítipo que M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X115-G04, M29-D09, M145-D11, M06-D09 y M35-G04.
- En algunas realizaciones, la proteína se une a (por ejemplo, posiciones en la calicreína plasmática correspondientes a) péptido CLIPS C1, C2, C3, C4, C5, C6, o C7, o más de uno de estos péptidos, por ejemplo, la proteína se une a C5 y C6. Los péptidos CLIPS C1-C7 son péptidos en la calicreína plasmática identificados por el mapeo de epítopos de CLIPS (véanse las FIGURAS 9 y 10A-10C). C1 corresponde a las posiciones 55-67 del dominio catalítico, C2 a las posiciones 81-94, C3 a las posiciones 101-108, C4 a las posiciones 137-151, C5 a las posiciones 162-178, C6 a las posiciones 186-197 y C7 a las posiciones 214-217 de calicreína plasmática.
- En algunas realizaciones, la proteína se une a un epítipo mostrado en la Figura 9.
- En algunas realizaciones, la proteína se une a uno o más aminoácidos que forman la triada catalítica de calicreína plasmática: His434, Asp483 y/o Ser578 (numeración basada en la secuencia humana).
- En algunas realizaciones, la proteína se une a uno o más aminoácidos de: Arg551, Gln553, Tyr555, Thr558 y/o Arg560 (numeración basada en la secuencia humana). En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática se une a uno o más aminoácidos de: S478, N481, S525 y K526 (numeración basada en la secuencia de calicreína humana).
- En algunas realizaciones, la proteína se une a uno o más aminoácidos de Ser479, Tyr563 y/o Asp585 (numeración basada en la secuencia humana).
- La hendidura de sitio activo de la calicreína plasmática contiene tres aminoácidos que forman la triada catalítica (His434, Asp483 y Ser578) y dan como resultado la hidrólisis enzimática de sustrato unido (los restos de la triada catalítica están subrayados en la Figura 10). Se determinó que los péptidos seleccionados para el análisis por mapeo de epítopos de CLIPS estaban accesibles en la superficie y o bien forman o rodean la proximidad del sitio activo. El péptido C1 contiene el sitio activo histidina 434. El péptido C3 contiene el sitio activo aspartato 483. El péptido C6 contiene el sitio activo serina 578. Es posible que un anticuerpo se una a múltiples aminoácidos expuestos en la superficie que son discontinuos en la secuencia de aminoácidos. Por ejemplo, por análisis de CLIP, aparece que X81-B01 se une a los péptidos C2, C3, C5 y C6.
- En algunas realizaciones, la proteína se une a un epítipo que incluye uno o más aminoácidos del péptido C1, péptido C2, péptido C3, péptido C4, péptido C5, péptido C6 o péptido C7 de CLIPS.
- En algunas realizaciones, la proteína se une a un epítipo que incluye aminoácidos de al menos 2 péptidos CLIPS diferentes, por ejemplo, de al menos dos de péptido C1, péptido C2, péptido C3, péptido C4, péptido C5, péptido C6, o péptido C7.
- La proteína puede unirse a calicreína plasmática, por ejemplo, calicreína plasmática humana, con una afinidad de unión de al menos 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} y 10^{11} M⁻¹. En una realización, la proteína se une a calicreína plasmática humana con una K_{dis} más lenta que 1×10^{-3} , 5×10^{-4} s⁻¹ o 1×10^{-4} s⁻¹. En una realización, la proteína se une a calicreína plasmática humana con una K_{as} más rápida que 1×10^2 , 1×10^3 o 5×10^3 M⁻¹s⁻¹. En una realización, la proteína se une a calicreína plasmática, pero no se une a calicreína de tejido y/o precalicreína plasmática (por ejemplo, la proteína se une a calicreína de tejido y/o precalicreína plasmática menos eficazmente (por ejemplo, 5,

10, 50, 100 o 1000 veces menos o en absoluto, por ejemplo, en comparación con un control negativo) que se une a calicreína plasmática.

En una realización, la proteína inhibe la actividad de calicreína plasmática humana, por ejemplo, con una K_i inferior a 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} y 10^{-10} M. La proteína puede tener, por ejemplo, una CI_{50} inferior a 100 nM, 10 nM, 1, 0,5 o 0,2 nM. Por ejemplo, la proteína puede modular la actividad de calicreína plasmática, así como la producción de factor XIIa (por ejemplo, de factor XII) y/o bradiquinina (por ejemplo, de cininógeno de alto peso molecular (HMWK)). La proteína puede inhibir la actividad de calicreína plasmática y/o la producción de factor XIIa (por ejemplo, de factor XII) y/o bradiquinina (por ejemplo, de cininógeno de alto peso molecular (HMWK)). La afinidad de la proteína por la calicreína plasmática humana se puede caracterizar por una K_D inferior a 100 nM, inferior a 10 nM, inferior a 5 nM, inferior a 1 nM, inferior a 0,5 nM. En una realización, la proteína inhibe la calicreína plasmática, pero no inhibe la calicreína de tejido (por ejemplo, la proteína inhibe la calicreína de tejido menos eficazmente (por ejemplo, 5, 10, 50, 100 o 1000 veces menos o en absoluto, por ejemplo, en comparación con un control negativo) que inhibe la calicreína plasmática.

En algunas realizaciones, la proteína tiene una constante de inhibición aparente ($K_{i,ap}$) inferior a 1000, 500, 100, 5, 1, 0,5 o 0,2 nM.

Las proteínas de unión a calicreína plasmática pueden ser anticuerpos. Los anticuerpos de unión a calicreína plasmática pueden tener sus secuencias del dominio variable de HC y LC incluidas en un único polipéptido (por ejemplo, scFv), o en diferentes polipéptidos (por ejemplo, IgG o Fab).

En una realización preferida, la proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene las cadenas ligeras y pesadas de anticuerpos seleccionados del grupo que consiste en M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01, X81-B01, X67-D03, X67-G04, DX-2922, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X115-G04, M29-D09 y M145-D11.

En una realización preferida, la proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene la cadena pesada de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en: M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X115-G04, M29-D09 y M145-D11.

En una realización preferida, la proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene la cadena ligera de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en: M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X115-G04, M29-D09 y M145-D11.

La proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene las regiones variables de anticuerpos de las cadenas ligeras y pesadas de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X115-G04, M29-D09 y M145-D11.

La proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene una región variable de anticuerpo de la cadena pesada de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en: M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X115-G04, M29-D09 y M145-D11.

La proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene una región variable de anticuerpo de la cadena ligera de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en: M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X115-G04, M29-D09 y M145-D11.

En ocasiones, la proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2 o 3) CDR de la cadena pesada seleccionadas de las CDR correspondientes del grupo de cadenas pesadas que consiste en M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X115-G04, M29-D09, M145-D11, M06-D09 y M35-G04.

En ocasiones, la proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2 o 3) CDR de la cadena ligera seleccionadas de las CDR correspondientes del grupo de cadenas ligeras que consiste en M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X115-G04, M29-D09, M145-D11, M06-D09 y M35-G04.

En ocasiones, la proteína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2 o 3) CDR de la cadena pesada y una o más (por ejemplo, 1, 2 o 3) CDR de la cadena ligera seleccionadas de las CDR correspondientes del grupo de cadenas ligeras que consiste en M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-

G06, X101-A01, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X115-G04, M29-D09, M145-D11, M06-D09 y M35-G04.

En una realización, las secuencias del dominio variable de HC y LC son componentes de la misma cadena de polipéptidos. En otro, las secuencias del dominio variable de HC y LC son componentes de diferentes cadenas de polipéptidos. Por ejemplo, la proteína es una IgG, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. La proteína puede ser Fab soluble. En otras implementaciones, la proteína incluye un Fab2', scFv, minicuerpo, fusión scFv::Fc, fusión Fab::HSA, fusión HSA::Fab, fusión Fab::HSA::Fab, u otra molécula que comprende el sitio de combinación del antígeno de una de las proteínas de unión en el presente documento. Las regiones VH y VL de estos Fab se pueden proporcionar como IgG, Fab, Fab2, Fab2', scFv, Fab PEGilado, scFv PEGilado, Fab2 PEGilado, VH::CH1::HSA+LC, HSA::VH::CH1+LC, LC::HSA + VH::CH1, HSA::LC + VH::CH1, u otra construcción apropiada.

En una realización, la proteína es un anticuerpo humano o humanizado o es no inmunogénica en un humano. Por ejemplo, la proteína incluye una o más regiones estructurales de anticuerpo humano, por ejemplo, todas las regiones estructurales humanas, o regiones estructurales al menos 85, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 % idénticas a regiones estructurales humanas. En una realización, la proteína incluye un dominio Fc humano, o un dominio Fc que es al menos 95, 96, 97, 98 o 99 % idéntico a un dominio Fc humano.

En una realización, la proteína es un anticuerpo de primate o primatizado o es no inmunogénica en un humano. Por ejemplo, la proteína incluye una o más regiones estructurales de anticuerpo de primate, por ejemplo, todas las regiones estructurales de primate, o regiones estructurales al menos 85, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 % idénticas a regiones estructurales de primate. En una realización, la proteína incluye un dominio Fc de primate, o un dominio Fc que es al menos 95, 96, 97, 98 o 99 % idéntico a un dominio Fc de primate. "Primate" incluye seres humanos (*Homo sapiens*), chimpancés (*Pan troglodytes* y *Pan paniscus* (bonobos)), gorilas (*Gorilla gorilla*), gibones, monos, lemures, aye-ayes (*Daubentonia madagascariensis*) y tarseros.

En algunas realizaciones, la afinidad del anticuerpo de primate por la calicreína plasmática humana se caracteriza por una KD inferior a 1000, 500, 100, 10, 5, 1, 0,5 nM, por ejemplo, inferior a 10 nM, inferior a 1 nM, o inferior a 0,5 nM.

En ciertas realizaciones, la proteína no incluye secuencias de ratones o conejos (por ejemplo, no es un anticuerpo murino o de conejo).

En algunos aspectos, la divulgación proporciona el uso de proteínas (por ejemplo, proteínas de unión, por ejemplo, anticuerpos) (por ejemplo, las proteínas descritas en el presente documento) que se unen a calicreína plasmática (por ejemplo, calicreína plasmática humana) e incluyen al menos una región variable de inmunoglobulina en métodos de tratamiento (o prevención) de un trastorno o afección asociado a calicreína plasmática. Por ejemplo, la proteína de unión a calicreína plasmática incluye una secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de cadena pesada (HC) y una secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de cadena ligera (LC). Se describen en el presente documento varias proteínas de unión a calicreína plasmática a modo de ejemplo.

La proteína de unión a calicreína plasmática puede ser una proteína aislada (por ejemplo, al menos 70, 80, 90, 95, o 99 % libre de otras proteínas).

La proteína de unión a calicreína plasmática puede inhibir además calicreína plasmática, por ejemplo, calicreína plasmática humana y/o calicreína plasmática murina. En algunas realizaciones, se puede preferir que una proteína de unión a calicreína plasmática se una a tanto calicreína plasmática humana como a murina, ya que estos anticuerpos se pueden probar para eficacia en un modelo de ratón.

Calicreína plasmática

Las secuencias de calicreína plasmática a modo de ejemplo contra las que se pueden desarrollar proteínas de unión a calicreína plasmática pueden incluir secuencias de aminoácidos de calicreína plasmática humana, de ratón o rata, una secuencia que es 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una de estas secuencias, o un fragmento de la misma, por ejemplo, de una secuencia proporcionada a continuación.

Se usó la secuencia de calicreína plasmática humana en selecciones y el cribado posterior se muestra a continuación (número de acceso NP_000883.2). La calicreína plasmática humana (86 kDa) que se usó se purificó de plasma humano y se activó con el factor XIIa por un proveedor comercial. El factor XIIa activa la precalicreína por escisión de la secuencia de polipéptidos en un único sitio (entre Arg371-Ile372, sitio de escisión marcado por "/" en la secuencia a continuación) para generar calicreína plasmática activa, que entonces consiste en dos polipéptidos unidos por disulfuro; una cadena pesada de aproximadamente 52 kDa y un dominio catalítico de aproximadamente 34 kDa [Colman and Schmaier, (1997) "Contact System: A Vascular Biology Modulator With Anticoagulant, Profibrinolytic, Antiadhesive, and Proinflammatory Attributes" Blood, 90, 3819-3843]

GCLTQLYENAFFRGGDVASMYTPNAQYQCMRCTFHPRCLLFSFLPASSINDMEKRFGCFLKDSVTGTLPKV
HRTGAVSGHSLKQCGHQISACHRDIYKGVDMRGVNFNVSKVSSVEECQKRCTSNIRCQFFSYATQTFHKA
YRNNCLLKYSPPGGTPTAIKVLNSVESGFSLKPCALSEIGCHMNIFQHLAFSDVDVARVLTPDAFVCRITCT
YHPNCLFFTFYTNVWKIESQRNVCLLKTSSEGTTPSSSTPQENTISGYSLLTCKRTLPEPCHSKIYPGVDFG
GEEELNVTFVKGVNVCQETCTKMIRCQFFTYSLLPEDCKEEKCKCFLRLSMDGSPTRIAAYGTQSSGYSRL
CNTGDNSVCTTKTSTR/IVGGTNSWGEWPQVSLQVKLTAQRHLGSLIGHQVWLTAHCFDGLPLQDV
WRIYSGILNLSGITKDTFSPQIKEIIHQNYKVSEGNHDIALIKLQAPLNYTEFQKPICLPSKGDSTSTIYT
NCWVTGWGFSKEKGEIQNILQKVNIPLVTNEECQKRYQDYKITQRMVCAGYKEGGKDACKGDSGGPLVCKH
NGMWRLVGITSWGEGCARREQPGVYTKVAEYMDWILEKTQSSDGKAQMSPA

Se ilustran a continuación las secuencias de aminoácidos de precalicreína humana, de ratón y rata, y las secuencias de ARNm que codifican las mismas. Las secuencias de precalicreína son las mismas que la calicreína plasmática, excepto que la calicreína plasmática activa (pCal) tiene la cadena de polipéptidos individual escindida en una única posición (indicada por "/") para generar dos cadenas. Las secuencias proporcionadas a continuación son las secuencias completas que incluyen las secuencias señal. Tras la secreción de la célula que la expresa, se espera que se retiren las secuencias señal.

Calicreína plasmática humana (ACCESO: NP_000883.2)

> gi|78191798|ref|NP_000883.2| precursor B1 de calicreína plasmática [Homo sapiens]

MILFKQATYFISLFATVSCGCLTQLYENAFFRGGDVASMYTPNAQYQCMRCTFHPRCLLFSFLPASSIND
MEKRFGCFLKDSVTGTLPKVHRTGAVSGHSLKQCGHQISACHRDIYKGVDMRGVNFNVSKVSSVEECQKR
CTSNIRCQFFSYATQTFHKAERYNNCLLKYSPPGGTPTAIKVLNSVESGFSLKPCALSEIGCHMNIFQHLA
FSDVDVARVLTPDAFVCRITCTYHPNCLFFTFYTNVWKIESQRNVCLLKTSSEGTTPSSSTPQENTISGYS
LLTCKRTLPEPCHSKIYPGVDFGGEELNVTFVKGVNVCQETCTKMIRCQFFTYSLLPEDCKEEKCKCFLR
LSMDGSPTRIAAYGTQSSGYSRLCNTGDNSVCTTKTSTRIVGGTNSWGEWPQVSLQVKLTAQRHLG
GSLIGHQVWLTAHCFDGLPLQDVWRIYSGILNLSGITKDTFSPQIKEIIHQNYKVSEGNHDIALIKLQ
APLNYTEFQKPICLPSKGDSTSTIYTNCWVTGWGFSKEKGEIQNILQKVNIPLVTNEECQKRYQDYKITQR
MVCAGYKEGGKDACKGDSGGPLVCKHNGMWRLVGITSWGEGCARREQPGVYTKVAEYMDWILEKTQSSDG
KAQMSPA

ARNm de calicreína plasmática humana (ACCESO: NM_000892)

> gi|78191797|ref|NM_000892.3| calicreína B de Homo sapiens, plasma (factor de Fletcher) 1 (KLKB1), ARNm

AGAACAGCTTGAAGACCGTTTCATTTTAAAGTGACAAGAGACTCACCTCCAAGCAATTGTGTTTTCAG
AATGATTTTATTCAAGCAAGCAACTATTTTCATTTCCCTTGTTGCTACAGTTTCCCTGTGGATGTCTGACT
CAACTCTATGAAAACGCTTCTTCAGAGGTGGGATGTAGCTTCCATGTACACCCCAATGCCCAATACT
GCCAGATGAGGTGCACATTCCACCAAGGTGTTTGCTATTTCAGTTTCTTCCAGCAAGTTCAATCAATGA
CATGGAGAAAAGGTTTGGTTGCTTCTGAAAGATAGTGTACAGGAACCCCTGCCAAAAGTACATCGAACA
GGTGACAGTTTCTGGACATTCCTTGAGCAATGTGGTCAATCAATAGTGCTTGCCATCGAGACATTTATA
AAGGAGTTGATATGAGAGGAGTCAATTTTAAAGTGCTAAGGTTAGCAGTGTTGAAGAATGCCAAAAAG
GTGCACAGTAACATTCCCTGCCAGTTTCTTCATATGCCACGCAAAACATTTCAACAAGGCAGAGTACCGG
AACAATTGCCTATTAAAGTACAGTCCCGGAGGAACACCTACCGCTATAAAGGTGCTGAGTAACGTGGAAT
CTGGATTCTCAGTGAAGCCCTGTGCCCTTTCAGAAATTGGTTGCCACATGAACATCTTCCAGCATCTTGC
GTTCTCAGATGTGGATGTTGCCAGGGTCTCACTCCAGATGCTTTTGTGTGTCGGACCATCTGCACCTAT
CACCCCAACTGCCTCTTCTTACATCTATACAAATGTATGGAATTCGAGTCACAAAGAAATGTTGTCT
TTCTTAAACATCTGAAAGTGGCACACCAAGTTCTCTACTCTCAAGAAAACACCATATCTGGATATAG
CCTTTTAACTGCAAAAGAACTTTACCTGAACCCCTGCCATTCTAAATTTACCCGGGAGTTGACTTTGGA
GGAGAAGAATTGAATGTGACTTTTGTAAAGGAGTGAATGTTTGCCAAGAGACTTGACAAAAGATGATTC
GCTGTGAGTTTTTCACTTATTCTTTACTCCAGAAGACTGTAAGGAAGAGAAGTGAAGTGTCTTCTTAAG
ATTATCTATGGATGGTTCTCAACTAGGATGCGTATGGGACACAAGGGAGCTCTGGTTACTCTTTGAGA
TTGTGTAACACTGGGGACAACCTCTGCTGCACAACAAAAACAAGCACACGCATTTGTTGGAGGAACAACT
CTTCTTGGGGAGAGTGGCCCTGGCAGGTGAGCCTGCAGGTGAAGCTGACAGCTCAGAGGCACCTGTGTGG
AGGGTCACTCATAGGACACAGTGGGTCTCACTGCTGCCACTGCTTTGATGGGCTTCCCCTGCAGGAT
GTTTGGCGCATCTATAGTGGCATTCTAAATCTGTGACACATTACAAAAGATACACCTTTCTCACAATAA
AAGAGATTATTATTACCAAAACTATAAGTCTCAGAAGGGAATCATGATATCGCCTTGATAAACTCCA
GGCTCCTTTGAAATCACATGAATTCCAAAAACCAATATGCTTACCTTCCAAAGGTGACACAAGCACAATT
TATACCAACTGTTGGGTAAACGGATGGGGCTTCTCGAAGGAGAAAGGTGAAATCCAAAATATTCTACAAA
AGGTAATATTCTTTGGTAAACAAATGAAGAAATGCCAGAAAAGATATCAAGATTATAAAATAACCCAACG
GATGGTCTGTGCTGGCTATAAAGAAGGGGAAAAGATGCTTGTAAAGGGAGATTACAGTGGTCCCCTAGTT
TGCAAAACAAATGGAATGTGGCGTTTGGTGGCATCACAGCTGGGGTGAAGGCTGTGCCCGCAGGGAGC
AACCTGGTGTCTACACCAAGTGCCTGAGTACATGGACTGGATTTTAGAGAAAACACAGAGCAGTGATGG
AAAAGCTCAGATGCAGTACCAGCATGAGAAGCAGTCCAGAGTCTAGGCAATTTTACAACCTGAGTTCA
AGTCAAAATCTGAGCCTGGGGGTCTCATGTGCAAGCATGGAGAGTGGCATCTTCTTTGCATCCTAAG
GACGAAAACACAGTGCATCAGAGCTGCTGAGGACAATGTCTGGCTGAAGCCCGCTTTCAGCACGCCGT
AACCAGGGGCTGACAATGCGAGGTGCAACTGAGATCTCCATGACTGTGTGTGTGAAATAAAATGGTGA
AAGATCAAAAAA

Caliceína plasmática de ratón (ACCESO: NP_032481.1)

> gi|6680584|ref|NP_032481.1| caliceína B, plasma 1 [Mus musculus]

MILFNRVGYFVSLFATVSCGCMQLYKNTFFRGGDLAAIYTPDAQYQCKMCTFHPRCLLFSFLAVTPPKE
 TNKRFGCFMKESITGTLPRIHRTGAISGHSLKQCGHQISACHRDIYKGLDMRGSNFNISKTDNIEECQKL
 CTNNFHCQFFTYATSAFYRPEYRKCLLKHSASGTPTSIKSADNLVSGFSLKSCALSEIGCPMDIFQHS
 FADLNVSVQVITPDAFVCRITCTFHPNCLFFTFYTNEWETESQRNVCFCLKTSKSGRPSPIIPQENASGYS
 LLTCRKTRPEPCHSKIYSGVDFEGEELNVTFVQGADVQETCTKTIRCQFFIYSLLPQDCKEEGCKCSLR
 LSTDGSPTRITYGMQSSGYSRLRLCKLVDPDCTTKINARIVGGTNASLGEWFPQVSLQVKLVSTHLCG
 GSIIGRQWVLTAACHFDGIPYPDVWRIYGGILSLSEITKETPSSRIKELIIHQEYKVSEGNIDIALIKLQ
 TPLNYTEFQKPICLPSKADTNTIYTNCWVTGWGYTKQGETQNILQKATIPLPVNEECQKKYRDYVINKQ
 MICAGYKEGGTDACKGDSGGPLVCKHSGRWQLVGITSWGEGCGRKDQPGVYTKVSEYMDWILEKTQSSDV
 RALETSSA

ARNm de caliceína plasmática de ratón (ACCESO: NM_008455.2)

> gi|236465804|ref|NM_008455.2| caliceína B de Mus musculus, plasma 1 (Kikbl), ARNm

AGACCGCCCTCGGTGCCATATTACAGAGGGCTTGAAGACCATCTTCATGTGAAGACTCCCTCTCCTCCAGA
 ACCACAACGTGACCATCCTTCCAGGATGATTTTATTCAACCGAGTGGGTTATTTTGTTCCTTGTGCT
 ACCGTCTCCTGTGGGTGTATGACTCAACTGTATAAAAAATACCTTCTTCAGAGGTGGGATCTAGCTGCCA
 TCTACACCCAGATGCCAGTACTGTGAGAGATGTGCACTTTTACCCAGGTGCCTGCTGTTTCAAGCTT
 TCTCGCCGTGACTCCACCCAAAGAGACAAATAAACGGTTTGGTTGCTTCATGAAAGAGAGCATTACAGGG
 ACTTTGCCAAGAATAACACCGGACAGGGGCCATTTCTGGTCATTCTTTAAAGCAGTGTGGCCATCAAATAA
 GTGCTTGCCACCGAGACATATACAAAGGACTTGATATGAGAGGGTCCAACTTTAATATCTCTAAGACCGA
 CAATATTGAAGATGCCAGAACTGTGCACAAATAATTTTCACTGCCAATTTTTCACATATGCTACAAGT
 GCATTTTACAGACAGAGTACCGGAAGAAGTGCCCTGCTGAAGCACAGTGAAGCGGAACACCCACAGCA
 TAAAGTCAGCGGACAACCTGGTGTCTGGATTCTCACTGAAGTCTGTGCGCTTTCGGAGATAGGTGCCCC
 CATGGATATTTTCCAGCACTCTGCCTTTGCGAGACCTGAATGTAAAGCCAGGTCAACCCCGATGCCTTT
 GTGTGTGCGACCATCTGCACCTTCCATCCCACTGCCTTTTCTTACGTTCTACACGAATGAATGGGAGA
 CAGAAATCACAGAGAAATGTTTGTCTTCTTAAGACGCTCTAAAAGTGGAAGACCAAGTCCCCCTATTCTCTCA
 AGAAAACGCTATATCTGGATATAGTCTCCTCACCTGCAGAAAACTCGCCCTGAACCTGCCATTCCAAA
 ATTTACTCTGGAGTTGACTTTGAAGGGGAAGAAGTGAATGTGACCTTCGTGCAAGGAGCAGATGTCTGCC
 AAGAGACTTGTACAAAGACAATCCGCTGCCAGTTTTTTATTACTCTTACTCCCCCAAGACTGCAAGGA
 GGAGGGGTGTAAATGTTCTTAAGGTTATCCACAGATGGCTCCCCAACTAGGATCACCTATGGCATGCAG
 GGGAGCTCCGGTTATTCTCTGAGATGTGTAAACTTGTGGACAGCCCTGACTGTACAAACAAAAATAAATG
 CACGTATTGTGGGAGGAACAAACGCTTCTTTAGGGGAGTGGCCATGGCAGGTCAGCTGCAAGTGAAGCT
 GGTATCTCAGACCCCATTTGTGTGGAGGGTCCATCATTGGTTCGCAATGGGTACTGACAGCTGCCATTGC
 TTTGATGGAATTCCTATCCAGATGTGTGGCGTATATATGGCGGAATTCTTAGTCTGTCCGAGATTACGA
 AAGAAACGCCTTCTCTGAGAATAAAGGAGCTTATTATTCATCAGGAATACAAAGTCTCAGAAGGAATTA
 TGATATTGCCTTAATAAAGCTTCAGACGCCCTGAATTATACTGAATTCAAAAACCAATATGCCTGCCT
 TCCAAAGCTGACACAAATACAATTTATACCAACTGTTGGGTGACTGGATGGGGCTACACGAAGGAACAAG
 GTGAAACGCAAAATATTCTACAAAAGGCTACTATTCTTTGGTACCAAAATGAAGAATGCCAGAAAAATA
 CAGAGATTATGTTATAACAAGCAGATGATCTGTGCTGGCTACAAAGAAGGCGGAACAGACGCTTGTAAG
 GGAGATTCCGGTGGCCCCCTTAGTCTGTAAACACAGTGGACGGTGGCAGTTGGTGGGTATCACCAGCTGGG
 GTGAAGGCTGCGCCCGCAAGGACCAACCAGGAGTCTACACCAAAGTTTCTGAGTACATGGACTGGATATT
 GGAGAGACACAGAGCAGTGTAGTAAAGCTCTGGAGACATCTTACGCTGAGGAGGCTGGGTACCAAG
 AGGAAGAACCAGCTGGCTTTACCACTGCCTCAAGGCAAACTAGAGCTCCAGGATTCTCGGCTGTAAA
 ATGTTGATAATGGTGTCTACCTCACATCCGTATCATTGGATTGAAAATCAAGTGTAGATATAGTTGCTG
 AAGACAGCGTTTGTCTCAAGTGTGTTTCTGCCTTGAGTCACAGGAGCTCCAATGGGAGCATTACAAAGA
 TCACCAAGCTTGTAGGAAAGAGAATGATCAAAGGGTTTATTAGGTAATGAAATGTCTAGATGTGATGC
 AATTGAAAAAAGACCCAGATTCTAGCACAGTCTTGGGACCATTTCTCATGTAAGTGTGACTCTGGAC
 CTCAGCAGATCTCAGAGTTACCTGTCCACTTCTGACATTGTTTATTAGAGCCTGATGCTATTCTTTCAA
 GTGGAGCAAAAAAAAAAAAAA

5

Caliceína plasmática de rata (ACCESO: NP_036857.2)

> gi|162138905|ref|NP_036857.2| caliceína B, plasma 1 [Rattus norvegicus]

MILFQVQGYFVSLFATVSCGCLSQLYANTFFRGGDLAAIYTPDAQHCQCKMCTFHPRCLLFSFLAVSPTKE
 TDKRFGCFMKESITGTLPRIHRTGAISGHSLKQCGHQLSACHQDIYEGGLDMRGSNFNISKTDNIEECQKL
 CTNNIHCQFFTYATKAFHRPEYRKSCLLKRSSSGTPTSIPKVDNLVSGFSLKSCALSEIGCPMDIFQHFA
 FADLNVSHVVTDAFVCRITCTFHPNCLFFTFYTNEWETESQRNVCFCLKTSKSGRPSPIIQENAVSGYS
 LFTCRKARPEPCHFKIYSGVAFEGEELNATFVQGADACQETCTKTIRCQFFTYSLLPQDCKAEKGCKCSLR
 LSTDGSPTRITYEAQSSGYSRLRLCKVVESSDCTTKINARIVGGTNSSLGEWFPQVSLQVKLVSNHMCQ
 GSIIGRQWILTAACHFDGIPYPDVWRIYGGILNLSEITNKTPFSSRIKELIIHQYKMSSEGSYDIALIKLQ
 TPLNYTEFQKPICLPSKADTNTIYTNCWVTGWGYTKERGETQNILQKATIPLPVNEECQKKYRDYVITKQ
 MICAGYKEGGIDACKGDSGGPLVCKHSGRWQLVGITSWGEGCARKEQPGVYTKVAEYIDWILEKIQSSKE
 RALETSPA

ARNm de calicreína plasmática de rata (ACCESO: NM_012725)

> gi|162138904|ref|NM_012725.2| calicreína B de Rattus norvegicus, plasma 1 (Kikbl), ARNm

```
TGAAGACTAGCTTCATGTGAAGACTCCTTCTCCTCCAGCAGCACAAAGCAACCATCCTTCCAGGATGATT
TTATTCAAACAAGTGGGTATTTTTGTTTCCTTGTTTCGTACAGTTTCCTGTGGGTGTCTGTACAACTGT
ATGCAAAATACCTTCTTCAGAGGTGGGGATCTGGCTGCCATCTACACCCCGGATGCCAGCACTGTCAGAA
GATGTGCACGTTTCACCCAGGTGCCTGCTCTTCAGCTTCCTTGCCGTGAGTCCAACCAAGGAGACAGAT
AAAAGGTTTTGGGTGCTTCATGAAAGAGAGCATTACAGGGACTTTGCCAAGAATACACCGGACAGGGGCCA
TTTCTGGTCATTCTTTAAACAGTGTGGCCATCAATTAAGTGCTTGCCACCAAGACATATACGAAGGACT
GGATATGAGAGGGTCCAACTTTAATATATCTAAGACCCAGCAGTATGAAGAATGCCAGAACTGTGCACA
AATAATATTCAGTCCCAATTTTTACATATGCTACAAAAGCATTTACAGACCAGAGTACAGGAAGAGTT
GCCTGCTGAAGCGCAGTTCAAGTGAACGCCACCAGTATAAAGCCAGTGGACAACCTGGTGTCTGGATT
CTCACTGAAGTCTGTGCTCTCTCAGAGATCGGTTGCCCATGGATATTTCCAGCACTTTGCCTTTGCA
GACCTGAATGTAAGCCATGTGCTCAGCCCGATGCCTTCGTGTGTCGACCGTTTGCACCTTCCATCCCA
ACTGCTCTTCTTCACATTTCTACAGCAATGAGTGGGAGACGGAATCACAGAGGAATGTTTGTCTTAA
GACATCTAAAAGTGAAGACCAAGTCCCCCTATTATTCAAGAAAATGCTGTATCTGGATACAGTCTCTTC
ACCTGCAGAAAAGCTCGCCCTGAACCTGCCATTTCAAGATTTACTCTGGAGTTGCCTTCGAAGGGGAAG
AACTGAACGCGACCTTCGTGCAGGGAGCAGATGCGTGCCAAGAGACTTGTACAAAGACCATCCGCTGTCA
GTTTTTTACTTACTCATTGCTTCCCAAGACTGCAAGGCAGAGGGGTGTAAATGTTCTTAAGGTATCC
ACGGATGGCTCTCCAAC TAGGATCACCTATGAGGCACAGGGGAGCTCTGGTTATTCTCTGAGACTGTGTA
AAGTTGTGGAGAGCTCTGACTGTACGACAAAAATAAATGCACGTATTGTGGGAGGAACAACTCTCTTT
AGGAGAGTGGCCATGGCAGGTACGCTGCAAGTAAAGTTGGTTTTCTCAGAAATCATATGTGTGGAGGGTCC
ATCATTGGACGCCAATGGATACTGACGGCTGCCATTTGCTTTGATGGGATTCCTATCCAGACGTGTGGC
GTATATATGGCGGGATTCTTAATCTGTACAGAGATTACAAACAAACGCCTTCTCAAGTATAAAGGAGCT
TATTATTATCAGAAATACAAATGTGAGAAGGCAGTTACGATATTGCCTTAATAAAGCTTCAGACACCG
TTGAATTATACCTGAATTTCCAAAACCAATATGCCTGCCTTCCAAAGCTGACACAAATACAATTTATACCA
ACTGTGGGTGACTGGATGGGGCTACACAAAGGAACGAGGTGAGACCCAAATATTCTACAAAAGGCAAC
TATTCCTTTGGTACCAATGAAGAATGCCAGAAAAAATATAGAGATTATGTTATAACCAAGCAGATGATC
TGTGCTGGCTACAAAGAAGGTGGAATAGATGCTTGTAAAGGAGATTCGGGTGGCCCCCTAGTTTGCAAAC
ATAGTGAAGGTGGCAGTTGGTGGGTATCACCAGCTGGGGCGAAGGCTGTGCCCGCAAGGAGCAACCAGG
AGTCTACACCAAGTTGCTGAGTACATTGACTGGATATTGGAGAAGATACAGAGCAGCAAGGAAAGAGCT
CTGGAGACATCTCCAGCATGAGGAGGCTGGGTACTGATGGGGAAGAGCCAGCTGGCACCAGCTTTACCA
CCTGCCTCAAGTCTACTAGAGCTCCAGAGTTCTCTCTGCAAAATGTCGATAGTGTGTCTACCTCGC
ATCCTTACCATAGGATTAAGAGTCCAAATGTAGACACAGTTGTAAAGACAGCGCCATGCTCAAGCGTGC
TTCTGCCTTGAGCAACAGGAACGCCAATGAGAACTATCCAAAGATTACCAAGCCTGTTTGGAAATAAAA
TGGTCAAAGGATTTTTATTAGGTAGTGAATAGGTAGTTGTCTTGGAACCATTTCTCATGTAACTGTTG
ACTCTGGACCTCAGCAGATCACAGTTACCTTCTGTCCACTTCTGACATTTGTGTACTGGAACCTGATGCT
GTTCTTCCACTTGGAGCAAGAAGTGAAGAACTGGTTCTATCCATTGGGAAAAGAGATCTTTGTAACA
TTTCTTTTACAATAAAAAGATGTTCTACTTGGACTTGAAAAAAGAGATCTTTGTAACA
```

Bibliotecas de presentación

Una biblioteca de presentación es un conjunto de entidades; cada entidad incluye un componente de polipéptido accesible y un componente recuperable que codifica o identifica el componente de polipéptido. El componente de polipéptido varía de manera que se representen diferentes secuencias de aminoácidos. El componente de polipéptido puede ser de cualquier longitud, por ejemplo, desde tres aminoácidos hasta más de 300 aminoácidos. Una entidad de biblioteca de presentación puede incluir más de un componente de polipéptido, por ejemplo, las dos cadenas de polipéptidos de un sFab. En una implementación a modo de ejemplo, se puede usar una biblioteca de presentación para identificar proteínas que se unen a calicreína plasmática. En una selección, el componente de polipéptido de cada miembro de la biblioteca se sonda con calicreína plasmática (o fragmento de la misma) y si el componente de polipéptido se une a la calicreína plasmática, se identifica el miembro de la biblioteca de presentación, normalmente por retención sobre un soporte.

Se recuperan del soporte los miembros retenidos de la biblioteca de presentación y se analizan. El análisis puede incluir la amplificación y una selección posterior en condiciones similares o diferentes. Por ejemplo, se pueden alternar selecciones positivas y negativas. El análisis también puede incluir determinar la secuencia de aminoácidos del componente de polipéptido y la purificación del componente de polipéptido para caracterización detallada.

Se pueden usar una variedad de formatos para las bibliotecas de presentación. Ejemplos incluyen los siguientes.

Presentación en fagos: El componente de proteína normalmente se une covalentemente a una proteína de la cubierta del bacteriófago. El enlace resulta de la traducción de un ácido nucleico que codifica el componente de proteína fusionado con la proteína de la cubierta. El enlace puede incluir un conector peptídico flexible, un sitio de proteasa, o un aminoácido incorporado como resultado de la supresión de un codón de terminación. La presentación en fagos se describe, por ejemplo, en la patente de EE. UU. Nº 5.223.409; Smith (1985) Science 228:1315-1317; documentos WO 92/18619; WO 91/17271; WO 92/20791; WO 92/15679; WO 93/01288; WO 92/01047; WO 92/09690; WO 90/02809; de Haard et al. (1999) J. Biol. Chem 274:18218-30; Hoogenboom et al. (1998) Immunotechnology 4:1-20; Hoogenboom et al. (2000) Immunol Today 2:371-8 y Hoet et al. (2005) Nat Biotechnol. 23(3):344-8. Se puede cultivar y recoger el bacteriófago que presente el componente de proteína usando métodos estándares de preparación de fagos, por ejemplo, precipitación con PEG de medios de crecimiento. Después de la selección de fagos de presentación individuales, el ácido nucleico que codifica los componentes de proteína seleccionados se puede aislar de células infectadas con los fagos seleccionados o de los propios fagos, después de la amplificación. Se pueden recoger colonias o placas individuales, aislar el ácido nucleico y secuenciar.

Otros formatos de presentación. Otros formatos de presentación incluyen presentación basada en células (véase, por ejemplo, el documento WO 03/029456), fusiones de proteína-ácido nucleico (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. Nº 6.207.446), presentación de ribosomas (véase, por ejemplo, Mattheakis et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:9022 y Hanes et al. (2000) Nat Biotechnol. 18:1287-92; Hanes et al. (2000) Methods Enzymol. 328:404-30; y Schaffitzel et al. (1999) J Immunol Methods. 231(1-2):119-35), y presentación periplásmica en *E. coli* (J Immunol Methods. 2005 Nov 22; PMID: 16337958).

Armazones. Los armazones útiles para la presentación incluyen: anticuerpos (por ejemplo, fragmentos Fab, moléculas Fv monocatenarias (scFv), anticuerpos de un solo dominio, anticuerpos de camélido y anticuerpos camelizados); receptores de linfocitos T; proteínas de MHC; dominios extracelulares (por ejemplo, repeticiones de fibronectina tipo III, repeticiones de EGF); inhibidores de la proteasa (por ejemplo, dominios de Kunitz, ecotina, BPTI, etc.); repeticiones de TPR; estructuras tri-lámina; dominios de dedos de cinc; proteínas de unión a ADN; particularmente proteínas de unión a ADN monomérico; proteínas de unión a ARN; enzimas, por ejemplo, proteasas (particularmente proteasas inactivadas), RNasa; chaperonas, por ejemplo, tioredoxina y proteínas de choque térmico; dominios de señalización intracelular (tales como dominios SH2 y SH3); péptidos lineales y restringidos; y sustratos peptídicos lineales. Las bibliotecas de presentación pueden incluir diversidad sintética y/o natural. Véase, por ejemplo, el documento US 2004-0005709.

También se puede usar tecnología de presentación para obtener proteínas de unión (por ejemplo, anticuerpos) que se unen a epítopes particulares de una diana. Esto se puede hacer, por ejemplo, usando moléculas no diana de competición que carecen del epítipo particular o se mutan dentro del epítipo, por ejemplo, con alanina. Dichas moléculas no diana se pueden usar en un procedimiento de selección negativa como se describe a continuación, como moléculas de competición cuando se unen a una biblioteca de presentación a la diana, o como un agente de pre-elución, por ejemplo, para capturar en una disolución de lavado miembros de biblioteca de presentación de disociación que no son específicos para la diana.

Selección iterativa. En una realización preferida, se usa tecnología de bibliotecas de presentación en un modo iterativo. Se usa una primera biblioteca de presentación para identificar una o más proteínas de unión para una diana. Estas proteínas de unión identificadas se varían entonces usando un método de mutagénesis para formar una segunda biblioteca de presentación. Las proteínas de unión de mayor afinidad se seleccionan entonces de la segunda biblioteca, por ejemplo, usando condiciones de mayor rigurosidad o de unión y de lavado más competitivas.

En algunas implementaciones, la mutagénesis se dirige a regiones en la interfase de unión. Si, por ejemplo, las proteínas de unión identificadas son anticuerpos, entonces la mutagénesis se puede dirigir a las regiones CDR de las cadenas pesadas o ligeras como se describe en el presente documento. Además, la mutagénesis se puede dirigir a regiones estructurales cerca de o adyacentes a las CDR. En el caso de anticuerpos, la mutagénesis también se puede limitar a una o algunas de las CDR, por ejemplo, para hacer mejoras escalonadas precisas. Las técnicas de mutagénesis a modo de ejemplo incluyen: PCR propensa a error, recombinación, barajado de ADN, mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis en casete.

En un ejemplo de selección iterativa, se usan los métodos descritos en el presente documento para identificar en primer lugar una proteína de una biblioteca de presentación que se une a calicreína plasmática, con al menos una especificidad de unión mínima por una diana o una actividad mínima, por ejemplo, una constante de disociación en equilibrio por la unión de menos de 0,5 nM, 1 nM, 10 nM o 100 nM. Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican las proteínas identificadas iniciales se usan como ácido nucleico molde para la introducción de variaciones, por ejemplo, para identificar una segunda proteína que tiene propiedades potenciadas (por ejemplo, afinidad de unión, cinética o estabilidad) con respecto a la proteína inicial.

Selección de disociación. Puesto que una velocidad de disociación lenta puede ser predictiva de alta afinidad, particularmente con respecto a interacciones entre polipéptidos y sus dianas, se pueden usar los métodos descritos en el presente documento para aislar proteínas de unión con una velocidad de disociación cinética deseada (por ejemplo, reducida) para una interacción de unión con una diana.

Para seleccionar proteínas de unión de disociación lenta de una biblioteca de presentación, la biblioteca se pone en contacto con una diana inmovilizada. La diana inmovilizada se lava entonces con una primera disolución que elimina las biomoléculas no específicamente o débilmente unidas. Entonces, las proteínas de unión unidas se eluyen con una segunda disolución que incluye una cantidad de saturación de diana libre o un anticuerpo monoclonal de competición de alta afinidad específico de diana, es decir, duplicados de la diana que no se unen a la partícula. La diana libre se une a biomoléculas que se disocian de la diana. La re-unión se previene eficazmente por la cantidad de saturación de diana libre con respecto a la concentración mucho más baja de diana inmovilizada.

La segunda disolución puede tener condiciones de disolución que son sustancialmente fisiológicas o que son rigurosas. Normalmente, las condiciones de disolución de la segunda disolución son idénticas a las condiciones de disolución de la primera disolución. Se recogen fracciones de la segunda disolución en orden temporal para distinguir fracciones tempranas de tardías. Las fracciones tardías incluyen biomoléculas que se disocian a una tasa más lenta de la diana que las biomoléculas en las fracciones tempranas.

Además, también es posible recuperar miembros de la biblioteca de presentación que siguen unidos a la diana, incluso después de la prolongada incubación. Éstos se pueden o bien disociar usando condiciones caotrópicas o bien se pueden amplificar mientras están unidos a la diana. Por ejemplo, se puede poner en contacto el fago unido a la diana con células bacterianas.

Selección o cribado de especificidad. Los métodos de cribado de bibliotecas de presentación descritos en el presente documento pueden incluir un proceso de selección o cribado que descarta miembros de bibliotecas de presentación que se unen a una molécula no diana. Ejemplos de molécula no diana incluyen estreptavidina en perlas magnéticas, agentes de bloqueo tales como albúmina de suero bovino, leche bovina no grasa, proteína de soja, cualquier anticuerpo monoclonal de captura o de inmovilización diana, o células no transfectadas que no expresan la diana.

En una implementación, se usa una denominada etapa de "selección negativa" para discriminar entre la diana y la molécula no diana relacionada y una molécula no diana relacionada, pero distinta. La biblioteca de presentación o un conjunto de la misma se pone en contacto con la molécula no diana. Se recogen los miembros de la muestra que no se unen a la no diana y se usan en selecciones posteriores para unirse a la molécula diana o incluso para selecciones negativas posteriores. La etapa de selección negativa puede ser antes o después de la selección de los miembros de biblioteca que se unen a la molécula diana.

En otra implementación, se usa una etapa de cribado. Después de que se aislen los miembros de la biblioteca de presentación para la unión a la molécula diana, se prueba cada miembro de la biblioteca aislado para su capacidad para unirse a una molécula no diana (por ejemplo, una no diana enumerada anteriormente). Por ejemplo, se puede usar un cribado de ELISA de alto rendimiento para obtener estos datos. El cribado de ELISA también se puede usar para obtener datos cuantitativos por la unión de cada miembro de la biblioteca a la diana, así como para la reactividad de especies cruzadas con dianas relacionadas o subunidades de la diana (por ejemplo, calicreína plasmática) y también en condiciones diferentes tales como pH 6 o pH 7,5. Se comparan los datos de unión de no diana y diana (por ejemplo, usando un ordenador y software) para identificar miembros de la biblioteca que se unen específicamente a la diana.

Otras bibliotecas de expresión a modo de ejemplo

Se pueden usar otros tipos de colecciones de proteínas (por ejemplo, bibliotecas de expresión) para identificar proteínas con una propiedad particular (por ejemplo, capacidad para unirse a calicreína plasmática), que incluyen, por ejemplo, matrices de anticuerpos de proteína (véase, por ejemplo, De Wildt et al. (2000) Nat. Biotechnol. 18:989-994), bibliotecas lambda gt11, bibliotecas de dos híbridos, etc.

Bibliotecas a modo de ejemplo

Es posible inmunizar un primate no humano y recuperar los genes de anticuerpo de primate que se pueden presentar en fago (véase más adelante). A partir de dicha biblioteca, se pueden seleccionar anticuerpos que se unen al antígeno usado en la inmunización. Véanse, por ejemplo, Vaccine. (2003) 22(2):257-67 o Immunogenetics. (2005) 57(10):730-8. Así, se podrían obtener anticuerpos de primate que se unen e inhiben la calicreína plasmática inmunizando un chimpancé o macaco y usando una variedad de medios para seleccionar o cribar los anticuerpos de primate que se unen e inhiben la calicreína plasmática. También se pueden preparar quimeras de Fab primatizados con regiones constantes humanas, véase Curr Opin Mol Ther. (2004) 6(6):675-83. "Los anticuerpos PRIMATIZADOS, genéticamente manipulados de mono macaco cinomolgo y componentes humanos son estructuralmente indistinguibles de los anticuerpos humanos. Por tanto, es menos probable que causen reacciones adversas en seres humanos, haciéndolos posiblemente aptos para el tratamiento crónico a largo plazo" Curr Opin Investig Drugs. (2001) 2(5):635-8.

Un tipo a modo de ejemplo de biblioteca presenta un conjunto diverso de polipéptidos, cada uno de los cuales incluye un dominio de inmunoglobulina, por ejemplo, un dominio variable de inmunoglobulina. Son de interés las bibliotecas de presentación donde los miembros de la biblioteca incluyen dominios de inmunoglobina de primate o "primatizados" (por ejemplo, tales como de humano, primate no humano o "humanizados") (por ejemplo, dominios variables de inmunoglobina) o Fabs primatizados quiméricos con regiones constantes humanas. Se pueden usar las bibliotecas de dominios de inmunoglobina humanos o humanizados para identificar anticuerpos humanos o "humanizados" que, por ejemplo, reconocen antígenos humanos. Debido a que las regiones constantes y las regiones estructurales del anticuerpo son humanas, estos anticuerpos pueden evitar ellos mismos ser reconocidos y dirigidos como antígenos cuando se administran a seres humanos. Las regiones constantes también se pueden optimizar para reclutar funciones efectoras del sistema inmunitario humano. El proceso de selección por presentación *in vitro* supera la incapacidad de un sistema inmunitario humano normal de generar anticuerpos contra antígenos propios.

Una biblioteca de presentación de anticuerpos típica muestra un polipéptido que incluye un dominio VH y un dominio VL. Un "dominio de inmunoglobulina" se refiere a un dominio del dominio variable o constante de moléculas de inmunoglobulina. Los dominios de inmunoglobulina normalmente contienen dos hojas β formadas de aproximadamente siete cadenas β y un enlace disulfuro conservado (véase, por ejemplo, A. F. Williams and A. N.

Barclay, 1988, Ann. Rev. Immunol. 6:381-405). La biblioteca de presentación puede presentar el anticuerpo como un fragmento Fab (por ejemplo, usando dos cadenas de polipéptidos) o un Fv monocatenario (por ejemplo, usando una única cadena de polipéptidos). También se pueden usar otros formatos.

5 Como en el caso de Fab y otros formatos, el anticuerpo presentado puede incluir una o más regiones constantes como parte de una cadena ligera y/o pesada. En una realización, cada cadena incluye una región constante, por ejemplo, como en el caso de un Fab. En otras realizaciones, se presentan regiones constantes adicionales.

10 Las bibliotecas de anticuerpos se pueden construir por varios procesos (véanse, por ejemplo, de Haard et al., 1999, J. Biol. Chem. 274:18218-30; Hoogenboom et al., 1998, Immunotechnology 4:1-20; Hoogenboom et al., 2000, Immunol. Today 21:371-378, y Hoet et al. (2005) Nat Biotechnol. 23(3):344-8. Además, los elementos de cada proceso se pueden combinar con los de otros procesos. Los procesos se pueden usar de forma que se introduzca variación en un único dominio de la inmunoglobulina (por ejemplo, VH o VL) o en múltiples dominios de la inmunoglobulina (por ejemplo, VH y VL). La variación se puede introducir en un dominio variable de inmunoglobulina, por ejemplo, en la región de una o más de CDR1, CDR2, CDR3, FR1, FR2, FR3 y/o FR4, con referencia a dichas regiones de cualquiera y ambos de los dominios pesados y variables de la cadena ligera. Por
15 ejemplo, la(s) variación (variaciones) se pueden introducir en las tres CDR de un dominio variable dado, o en CDR1 y CDR2, por ejemplo, de un dominio variable de la cadena pesada. Es factible cualquier combinación. En un proceso, se construyen bibliotecas de anticuerpos insertando diversos oligonucleótidos que codifican CDR en las regiones correspondientes del ácido nucleico. Los oligonucleótidos se pueden sintetizar usando nucleótidos o trinucleótidos monoméricos. Por ejemplo, Knappik et al., 2000, J. Mol. Biol. 296:57-86 describen un método de
20 construcción de CDR que codifican oligonucleótidos usando síntesis de trinucleótidos y un molde con sitios de restricción manipulados para aceptar los oligonucleótidos.

25 En otro proceso, se inmuniza un animal (por ejemplo, un roedor) con calicreína plasmática. El animal se refuerza opcionalmente con el antígeno para estimular adicionalmente la respuesta. Entonces se aíslan células del bazo del animal, y se amplifica ácido nucleico que codifica los dominios VH y/o VL y se clona para la expresión en la biblioteca de presentación.

30 En otro proceso más, se construyen bibliotecas de anticuerpo a partir de ácido nucleico amplificado de genes de inmunoglobulina intactos de la línea germinal. El ácido nucleico amplificado incluye ácido nucleico que codifica el dominio VH y/o dominio VL. Las fuentes de ácidos nucleicos que codifican inmunoglobulina se describen más adelante. La amplificación puede incluir PCR, por ejemplo, con cebadores que se hibridan con la región constante, u otro método de amplificación.

Se pueden obtener dominios de inmunoglobulina que codifican ácido nucleico de las células inmunitarias de, por ejemplo, un primate (por ejemplo, un humano), ratón, conejo, camello o roedor. En un ejemplo, las células se seleccionan para una propiedad particular. Se pueden seleccionar linfocitos B en diversas etapas de madurez. En otro ejemplo, los linfocitos B son intactos.

35 En una realización, se usa citometría activada por fluorescencia (FACS) para clasificar linfocitos B que expresan moléculas de IgM, IgD o IgG unidas a la superficie. Además, se pueden aislar linfocitos B que expresan diferentes isotipos de IgG. En otra realización preferida, los linfocitos B o T se cultivan *in vitro*. Las células se pueden estimular *in vitro*, por ejemplo, cultivando con células nodrizas o añadiendo mitógenos u otros reactivos inmunomoduladores, tales como anticuerpos contra CD40, ligando de CD40 o CD20, miristato-acetato de forbol, lipopolisacárido bacteriano, concanavalina A, fitohemaglutinina o mitógeno de fitolaca.
40

En otra realización, las células se aíslan de un sujeto que tiene una enfermedad o afección descrita en el presente documento, por ejemplo, una enfermedad o afección asociada a calicreína plasmática.

45 En una realización preferido, las células han activado un programa de hipermutación somática. Las células se pueden estimular para experimentar mutagénesis somática de genes de inmunoglobulina, por ejemplo, mediante tratamiento con anticuerpos anti-inmunoglobulina, anti-CD40 y anti-CD38 (véase, por ejemplo, Bergthorsdottir et al., 2001, J. Immunol. 166:2228). En otra realización, las células son intactas.

50 Se puede aislar el ácido nucleico que codifica un dominio variable de inmunoglobulina de un repertorio natural siguiendo un método a modo de ejemplo. En primer lugar, se aísla ARN de la célula inmunitaria. Se separan ARNm de longitud completa (es decir, tapados) (por ejemplo, degradando ARN sin tapar con fosfatasa intestinal bovina). Entonces se retira la tapa con pirofosfatasa ácida de tabaco y se usa transcripción inversa para producir el ADNc.

La transcripción inversa de la primera cadena (antisentido) se puede hacer en cualquier modo con cualquier cebador adecuado. Véase, por ejemplo, de Haard et al., 1999, J. Biol. Chem. 274:18218-30. La región de unión del cebador puede ser constante entre diferentes inmunoglobulinas, por ejemplo, con el fin de transcribir de forma inversa diferentes isotipos de inmunoglobulina. La región de unión del cebador también puede ser específica para un isotipo particular de inmunoglobulina. Normalmente, el cebador es específico para una región que está 3' con respecto a una secuencia que codifica al menos una CDR. En otra realización, se pueden usar cebadores de poli-dT (y se pueden preferir para los genes de la cadena pesada).
55

Se puede ligar una secuencia sintética al extremo 3' de la hebra transcrita de forma inversa. Se puede usar la secuencia sintética como sitio de unión a cebador para la unión del cebador directo durante la amplificación por PCR después de la transcripción inversa. El uso de la secuencia sintética puede obviar la necesidad de usar un conjunto de cebadores directos diferentes para capturar completamente la diversidad disponible.

- 5 Entonces se amplifica el gen que codifica el dominio variable, por ejemplo, usando una o más rondas. Si se usan múltiples rondas, se pueden usar cebadores anidados para la elevada fidelidad. Entonces se clona el ácido nucleico amplificado en un vector de biblioteca de presentación.

Métodos de cribado secundario

- 10 Después de seleccionar miembros de biblioteca candidatos que se unen a una diana, cada miembro de biblioteca candidato se puede analizar adicionalmente, por ejemplo, para caracterizar adicionalmente sus propiedades de unión para la diana, por ejemplo, calicreína plasmática. Cada miembro de biblioteca candidato se puede someter a uno o más ensayos de cribado secundarios. El ensayo puede ser para una propiedad de unión, una propiedad catalítica, una propiedad inhibidora, una propiedad fisiológica (por ejemplo, citotoxicidad, eliminación renal, inmunogenicidad), una propiedad estructural (por ejemplo, estabilidad, conformación, estado de oligomerización) u
- 15 otra propiedad funcional. Se puede usar repetidamente el mismo ensayo, pero con condiciones variables, por ejemplo, para determinar el pH, sensibilidades iónicas o térmicas.

- Según convenga, los ensayos pueden usar directamente un miembro de biblioteca de presentación, un polipéptido recombinante producido a partir del ácido nucleico que codifica el polipéptido seleccionado, o un péptido sintético sintetizado basándose en la secuencia del polipéptido seleccionado. En el caso de Fabs seleccionados, los Fab se
- 20 pueden evaluar o se puede modificar y producir como proteínas de IgG intactas. Los ensayos a modo de ejemplo para las propiedades de unión incluyen los siguientes.

- ELISA.** Se pueden evaluar proteínas de unión usando un ensayo de ELISA. Por ejemplo, cada proteína se pone en contacto con una placa de microtitulación cuya superficie inferior se ha recubierto con la diana, por ejemplo, una cantidad limitante de la diana. La placa se lava con tampón para retirar los polipéptidos no específicamente unidos.
- 25 Entonces, se determina la cantidad de la proteína de unión unida a la diana sobre la placa sonando la placa con un anticuerpo que puede reconocer la proteína de unión, por ejemplo, una marca o porción constante de la proteína de unión. El anticuerpo se asocia con un sistema de detección (por ejemplo, una enzima tal como fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano picante (HRP) que produce un producto colorimétrico cuando se proporcionan sustratos apropiados).

- 30 **Ensayos de unión homogénea.** Se puede analizar la capacidad de una proteína de unión descrita en el presente documento para unirse a una diana usando un ensayo homogéneo, es decir, después de que se añadan todos los componentes del ensayo, no se requieren manipulaciones adicionales de líquidos. Por ejemplo, se puede usar transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) como ensayo homogéneo (véase, por ejemplo, Lakowicz et al., patente de EE. UU. N° 5.631.169; Stavrianopoulos, et al., patente de EE. UU. N° 4.868.103). Se
- 35 selecciona una marca de fluoróforo sobre la primera molécula (por ejemplo, la molécula identificada en la fracción) de forma que su energía fluorescente emitida se pueda absorber por una marca fluorescente sobre una segunda molécula (por ejemplo, la diana) si la segunda molécula está en proximidad a la primera molécula. La marca fluorescente sobre la segunda molécula fluoresce cuando absorbe la energía transferida. Puesto que la eficiencia de transferencia de energía entre las marcas está relacionada con la distancia que separa las moléculas, se puede
- 40 evaluar la relación espacial entre las moléculas. En una situación en la que la unión ocurre entre las moléculas, la emisión fluorescente de la marca de molécula 'aceptora' en el ensayo debe ser máxima. Se puede medir convenientemente un evento de unión que está configurado para monitorizar por FRET mediante medios de detección fluorométricos estándares, por ejemplo, usando un fluorímetro. Por valoración de la cantidad de la primera o segunda molécula de unión, se puede generar una curva de unión para estimar la constante de unión en equilibrio.

- 45 Otro ejemplo de un ensayo homogéneo es ALFASCREEN™ (Packard Bioscience, Meriden CT). ALFASCREEN™ usa dos perlas marcadas. Una perla genera oxígeno singlete cuando se excita por un láser. La otra perla genera una señal de luz cuando el oxígeno singlete difunde desde la primera perla y colisiona con ella. La señal solo se genera cuando las dos perlas están en proximidad. Se puede unir una perla al miembro de la biblioteca de presentación, la otra a la diana. Se miden las señales para determinar el grado de unión.

- 50 **Resonancia de plasmones superficiales (SPR).** Se puede analizar la interacción de proteína de unión y una diana usando SPR. SPR o el análisis de interacción biomolecular (BIA) detecta interacciones bioespecíficas en tiempo real, sin marcar ninguno de los interactuantes. Los cambios en la masa en la superficie de unión (indicativos de un evento de unión) del chip de BIA dan como resultado alteraciones del índice de refracción de la luz cerca de la superficie (el fenómeno óptico de la resonancia de plasmones superficiales (SPR)). Los cambios en la refractividad generan una
- 55 señal detectable, que se mide como una indicación de las reacciones en tiempo real entre moléculas biológicas. Los métodos para usar SPR se describen, por ejemplo, en la patente de EE. UU. N° 5.641.640; Raether, 1988, Surface Plasmons Springer Verlag; Sjolander y Urbaniczky, 1991, Anal. Chem. 63:2338-2345; Szabo et al., 1995, Curr. Opin. Struct. Biol. 5:699-705 y los recursos en línea proporcionados por BIAcore International AB (Uppsala, Suecia).

Se puede usar la información de SPR para proporcionar una medida precisa y cuantitativa de la constante de disociación en equilibrio (K_D), y parámetros cinéticos, que incluyen K_{as} y K_{dis} , para la unión de una proteína de unión a una diana. Dichos datos se pueden usar para comparar diferentes biomoléculas. Por ejemplo, se pueden comparar proteínas seleccionadas de una biblioteca de expresión con proteínas identificadas que tienen alta afinidad por la diana o que tienen una K_{dis} lenta. Esta información también se puede usar para desarrollar relaciones estructura-actividad (SAR). Por ejemplo, se pueden comparar los parámetros cinéticos y de unión en equilibrio de versiones maduras de una proteína original con los parámetros de la proteína original. Se pueden identificar los aminoácidos de variante en posiciones dadas que se correlacionan con parámetros de unión particulares, por ejemplo, alta afinidad y lenta K_{dis} . Esta información se puede combinar con modelado estructural (por ejemplo, usando modelado de homología, minimización de energía, o determinación de la estructura por cristalografía de rayos X o RMN). Como resultado, se puede formular y usar un entendimiento de la interacción física entre la proteína y su diana para guiar otros procesos de diseño.

Ensayos celulares. Se pueden cribar las proteínas de unión para la capacidad para unirse a células que expresan transitoria o establemente y muestran la diana de interés sobre la superficie celular. Por ejemplo, se pueden marcar fluorescentemente las proteínas de unión a calicreína plasmática y se puede detectar la unión a calicreína plasmática en presencia de ausencia de anticuerpo antagonista por un cambio en la intensidad de fluorescencia usando citometría de flujo, por ejemplo, una máquina de FACS.

Otros métodos a modo de ejemplo para obtener proteínas de unión a calicreína plasmática

Además del uso de las bibliotecas de presentación, se pueden usar otros métodos para obtener una proteína de unión a calicreína plasmática (por ejemplo, anticuerpo). Por ejemplo, se puede usar la proteína de calicreína plasmática o un fragmento de la misma como un antígeno en un animal no humano, por ejemplo, un roedor.

En una realización, el animal no humano incluye al menos una parte de un gen de la inmunoglobulina humana. Por ejemplo, es posible manipular cepas de ratón deficientes en la producción de anticuerpos de ratón con grandes fragmentos de los loci de Ig humana. Usando la tecnología de hibridomas, se pueden producir y seleccionar anticuerpos monoclonales (mAb) específicos de antígeno derivados de los genes con la especificidad deseada. Véase, por ejemplo, XENOMOUSE™, Green et al., 1994, Nat. Gen. 7: 13-21; documentos US 2003-0070185, WO 96/34096, publicado el 31 de octubre de 1996, y la solicitud PCT N° PCT/US96/05928, presentada el 29 de abril de 1996.

En otra realización, se obtiene un anticuerpo monoclonal del animal no humano, y entonces se modifica, por ejemplo, se humaniza o desinmuniza. Winter describe un método de injerto en CDR que se puede usar para preparar los anticuerpos humanizados (solicitud de patente de R.U. GB 2188638A, presentada el 26 de marzo de 1987; la patente de EE. UU. N° 5.225.539. Todas las CDR de un anticuerpo humano particular se pueden sustituir con al menos una porción de una CDR no humana o solo algunas de las CDR se pueden sustituir con CDR no humanas. Solo es necesario sustituir el número de CDR requeridas para la unión del anticuerpo humanizado a un antígeno predeterminado.

Se pueden generar anticuerpos humanizados reemplazando secuencias de la región variable Fv que no están directamente implicadas en la unión al antígeno con secuencias equivalentes de regiones variables Fv humanas. Los métodos generales para generar anticuerpos humanizados se proporcionan por Morrison, S. L., 1985, Science 229:1202-1207, por Oi et al., 1986, BioTechniques 4:214, y por Queen et al., patentes de EE. UU. N° 5.585.089, 5.693.761 y 5.693.762. Los métodos incluyen aislar, manipular y expresar las secuencias de ácidos nucleicos que codifican todas o parte de las regiones variables Fv de inmunoglobulina de al menos una de una cadena pesada o ligera. Están disponibles numerosas fuentes de tal ácido nucleico. Por ejemplo, se pueden obtener ácidos nucleicos de un hibridoma que produce un anticuerpo contra una diana predeterminada, como se ha descrito anteriormente. El ADN recombinante que codifica el anticuerpo humanizado, o fragmento del mismo, se pueden clonar entonces en un vector de expresión apropiado.

Reducción de la inmunogenicidad de proteínas de unión a calicreína plasmática

Se pueden modificar las proteínas de unión a calicreína plasmática de inmunoglobulina (por ejemplo, proteínas de unión a calicreína plasmática de IgG o Fab) para reducir la inmunogenicidad. Se desea inmunogenicidad reducida en proteínas de unión a calicreína plasmática previstas para su uso como terapéuticos, ya que reduce la probabilidad de que el sujeto desarrolle una respuesta inmunitaria contra la molécula terapéutica. Las técnicas útiles para reducir la inmunogenicidad de proteínas de unión a calicreína plasmática incluyen delección/modificación de los posibles epítopes de linfocitos T humanos y "retromutación a la línea germinal" de secuencias fuera de las CDR (por ejemplo, región estructural y Fc).

Se puede modificar un anticuerpo de unión a calicreína plasmática por delección específica de epítopes de linfocitos T humanos o "desinmunización", por ejemplo, por los métodos desvelados en los documentos WO 98/52976 y WO 00/34317. Brevemente, se analizan las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de un anticuerpo para péptidos que se une a la clase II de MHC; estos péptidos representan los posibles epítopes de linfocitos T (como se define en los documentos WO 98/52976 y WO 00/34317). Para la detección de posibles epítopes de

linfocitos T, se puede aplicar un enfoque de modelado informático denominado "reconocimiento del plegamiento de péptidos", y además, se pueden buscar en una base de datos de péptidos de unión de la clase II de MHC humano motivos presentes en las secuencias VH y VL, como se describe en los documentos WO 98/52976 y WO 00/34317. Estos motivos se unen a cualquiera de los 18 alotipos principales de DR de la clase II de MHC, y así constituyen los posibles epítopes de linfocitos T. Los posibles epítopes de linfocitos T detectados se pueden eliminar sustituyendo números pequeños de restos de aminoácidos en las regiones variables, o preferentemente, por sustituciones de un único aminoácido. Se hacen sustituciones conservativas en la medida de lo posible, frecuentemente pero no exclusivamente, se puede usar un aminoácido común en esta posición en las secuencias de anticuerpos de la línea germinal humana. Las secuencias de la línea germinal humana se desvelan en Tomlinson, I.A. et al., 1992, J. Mol. Biol. 227:776-798; Cook, G. P. et al., 1995, Immunol. Today Vol. 16 (5): 237-242; Chothia, D. et al., 1992, J. Mol. Bio. 227:799-817. El directorio V BASE proporciona un directorio completo de secuencias de la región variable de inmunoglobulina humana (compilado por Tomlinson, I.A. et al. MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, R.U.). Después de la desinmunización se identifican cambios, se pueden construir ácidos nucleicos que codifican V_H y V_L por mutagénesis u otros métodos de síntesis (por ejemplo, síntesis *de novo*, sustitución de casetes, etc.). Opcionalmente, se puede fusionar la secuencia variable mutagenizada con una región constante humana, por ejemplo, IgG1 humana o regiones constantes κ .

En algunos casos, un posible epítipo de linfocitos T incluirá restos que se conoce o predice que son importantes para la función del anticuerpo. Por ejemplo, los posibles epítipes de linfocitos T están normalmente inclinados hacia las CDR. Además, los posibles epítipes de linfocitos T pueden ocurrir en restos de la región estructural importantes para la estructura y unión del anticuerpo. Los cambios para eliminar estos posibles epítipes requerirán en algunos casos más escrutinio, por ejemplo, haciendo y probando cadenas con y sin el cambio. Cuando sea posible, los posibles epítipes de linfocitos T que solapan las CDR se eliminaron por sustituciones fuera de las CDR. En algunos casos, una alteración dentro de una CDR es la única opción, y así se deben probar variantes con y sin esta sustitución. En otros casos, la sustitución requerida para retirar un posible epítipo de linfocitos T es en una posición de resto dentro de la región estructural que podría ser crítica para la unión del anticuerpo. En estos casos, se deben probar las variantes con y sin esta sustitución. Así, en algunos casos se diseñaron varias regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras desinmunizadas de variante y se probaron diversas combinaciones de cadena pesada / ligera con el fin de identificar el anticuerpo desinmunizado óptimo. La elección del anticuerpo desinmunizado final se puede hacer entonces considerando la afinidad de unión de las diferentes variantes conjuntamente con el grado de desinmunización, es decir, el número de posibles epítipes de linfocitos T que quedan en la región variable. Se puede usar la desinmunización para modificar cualquier anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo que incluye una secuencia no humana, por ejemplo, un anticuerpo sintético, un anticuerpo murino, otro anticuerpo monoclonal no humano, o un anticuerpo aislado de una biblioteca de presentación.

Los anticuerpo de unión a calicreína plasmática se "retromutan a la línea germinal" invirtiendo uno o más aminoácidos no de la línea germinal en regiones estructurales a aminoácidos de la línea germinal correspondientes del anticuerpo, mientras que se retienen sustancialmente las propiedades de unión. También se pueden usar métodos similares en la región constante, por ejemplo, en dominios de inmunoglobulina constantes.

Los anticuerpos que se unen a calicreína plasmática, por ejemplo, un anticuerpo descrito en el presente documento, se pueden modificar con el fin de hacer las regiones variables del anticuerpo más similares a una o más secuencias de la línea germinal. Por ejemplo, un anticuerpo puede incluir una, dos, tres o más sustituciones de aminoácidos, por ejemplo, en una región estructural, CDR, o región constante, para hacerla más similar a una secuencia de referencia de la línea germinal. Un método de retromutación a la línea germinal a modo de ejemplo puede incluir identificar una o más secuencias de la línea germinal que son similares (por ejemplo, las más similares en una base de datos particular) a la secuencia del anticuerpo aislado. Las mutaciones (al nivel de aminoácidos) se hacen entonces en el anticuerpo aislado, ya sea gradualmente o en combinación con otras mutaciones. Por ejemplo, se hace una biblioteca de ácidos nucleicos que incluye secuencias que codifican algunas o todas las posibles mutaciones de la línea germinal. Entonces se evalúan los anticuerpos mutados, por ejemplo, para identificar un anticuerpo que tiene uno o más restos adicionales de la línea germinal con respecto al anticuerpo aislado y que es todavía útil (por ejemplo, tiene una actividad funcional). En una realización, se introducen tantos restos de la línea germinal en un anticuerpo aislado como sea posible.

En una realización, se usa mutagénesis para sustituir o insertar uno o más restos de la línea germinal en una región estructural y/o región constante. Por ejemplo, un resto de la región estructural y/o región constante de la línea germinal puede ser de una secuencia de la línea germinal que es similar (por ejemplo, el más similar) a la región no variable que se modifica. Después de la mutagénesis, se puede evaluar la actividad (por ejemplo, unión u otra actividad funcional) del anticuerpo para determinar si el resto o restos de la línea germinal son tolerados (es decir, no suprimen la actividad). Se puede realizar mutagénesis similar en las regiones estructurales.

Se puede realizar en diferentes formas la selección de una secuencia de la línea germinal. Por ejemplo, se puede seleccionar una secuencia de la línea germinal si cumple un criterio predeterminado para selectividad o similitud, por ejemplo, al menos un cierto porcentaje de identidad, por ejemplo, al menos 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 99,5 % de identidad. La selección se puede realizar usando al menos 2, 3, 5 o 10 secuencias de la línea germinal. En el caso de CDR1 y CDR2, identificar una secuencia similar de la línea germinal puede incluir seleccionar dicha secuencia. En el caso de CDR3, identificar una secuencia similar de la línea germinal puede incluir

seleccionar dicha secuencia, pero puede incluir usar dos secuencias de la línea germinal que contribuyen por separado a la porción del extremo amino y la porción del extremo carboxi de la secuencia. En otras implementaciones se usan más de una o dos secuencias de la línea germinal, por ejemplo, para formar una secuencia consenso.

En una realización, con respecto a una secuencia del dominio variable de referencia particular, por ejemplo, una secuencia descrita en el presente documento, una secuencia relacionada del dominio variable tiene al menos 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95 o 100 % de las posiciones de aminoácidos de CDR que no son idénticas a restos en las secuencias de CDR de referencia, restos que son idénticos a restos en posiciones correspondientes en una secuencia de la línea germinal humana (es decir, una secuencia de aminoácidos codificada por un ácido nucleico de la línea germinal humana).

En una realización, con respecto a una secuencia del dominio variable de referencia particular, por ejemplo, una secuencia descrita en el presente documento, una secuencia del dominio variable relacionada tiene al menos 30, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 % de las regiones FR idénticas a la secuencia de FR de una secuencia de la línea germinal humana, por ejemplo, una secuencia de la línea germinal relacionada con la secuencia del dominio variable de referencia.

Por consiguiente, es posible aislar un anticuerpo que tiene actividad similar a un anticuerpo de interés dado, pero es más similar a una o más secuencias de la línea germinal, particularmente una o más secuencias de la línea germinal humana. Por ejemplo, un anticuerpo puede ser al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 99,5 % idéntico a una secuencia de la línea germinal en una región fuera de las CDR (por ejemplo, regiones estructurales). Además, un anticuerpo puede incluir al menos 1, 2, 3, 4 o 5 restos de la línea germinal en una región CDR, siendo el resto de la línea germinal de una secuencia de la línea germinal similar (por ejemplo, el más similar) a la región variable que se modifica. Las secuencias de la línea germinal de interés primario son secuencias de la línea germinal humana. La actividad del anticuerpo (por ejemplo, la actividad de unión como se mide por KA) puede estar dentro de un factor o 100, 10, 5, 2, 0,5, 0,1 y 0,001 del anticuerpo original.

Se han determinado las secuencias de la línea germinal de genes de inmunoglobina humana y están disponibles de varias fuentes, que incluye INTERNATIONAL IMMUNOGENETICS INFORMATION SYSTEM® (IMGT), y el directorio V BASE (compilado por Tomlinson, I.A. et al. MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, R.U.).

Las secuencias de referencia de la línea germinal a modo de ejemplo para V_{kappa} incluyen: O12/O2, O18/O8, A20, A30, L14, L1, L15, L4/18a, L5/L19, L8, L23, L9, L24, L11, L12, O11/O1, A17, A1, A18, A2, A19/A3, A23, A27, A11, L2/L16, L6, L20, L25, B3, B2, A26/A10 y A14. Véase, por ejemplo, Tomlinson et al., 1995, EMBO J. 14(18):4628-3.

Una secuencia de referencia de la línea germinal para el dominio variable de HC se puede basar en una secuencia que tiene estructuras canónicas particulares, por ejemplo, 1-3 estructuras en los bucles hipervariables H1 y H2. Las estructuras canónicas de bucles hipervariables de un dominio variable de inmunoglobulina se pueden deducir de su secuencia, como se describe en Chothia et al., 1992, J. Mol. Biol. 227:799-817; Tomlinson et al., 1992, J. Mol. Biol. 227:776-798; y Tomlinson et al., 1995, EMBO J. 14(18):4628-38. Las secuencias a modo de ejemplo con una estructura 1-3 incluyen: DP-1, DP-8, DP-12, DP-2, DP-25, DP-15, DP-7, DP-4, DP-31, DP-32, DP-33, DP-35, DP-40, 7-2, hv3005, hv3005f3, DP-46, DP-47, DP-58, DP-49, DP-50, DP-51, DP-53 y DP-54.

Producción de proteínas

Se pueden usar métodos estándares de ácido nucleico recombinante para expresar una proteína que se une a caliceína plasmática. Generalmente, se clona una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína en un vector de ácido nucleico de expresión. Por supuesto, si la proteína incluye múltiples cadenas de polipéptidos, cada cadena se puede clonar en un vector de expresión, por ejemplo, los mismos vectores o diferentes, que se expresan en las mismas células o diferentes.

Producción de anticuerpos. Se pueden producir algunos anticuerpos, por ejemplo Fabs, en células bacterianas, por ejemplo, células de *E. coli* (véase por ejemplo, Nadkarni, A. et al., 2007 Protein Expr Purif 52(1):219-29). Por ejemplo, si el Fab se codifica por secuencias en un vector de presentación en fagos que incluye un codón de terminación supresible entre la entidad de presentación y una proteína de bacteriófago (o fragmento de la misma), el ácido nucleico del vector se puede transferir a una célula bacteriana que no puede suprimir un codón de terminación. En este caso, el Fab no se fusiona con la proteína del gen III y se secreta en el periplasma y/o medio.

Los anticuerpos también se pueden producir en células eucariotas. En una realización, los anticuerpos (por ejemplo, scFv) se expresan en una célula de levadura tal como *Pichia* (véanse, por ejemplo, Powers et al., 2001, J. Immunol. Methods. 251 : 123-35; Schoonooghe S. et al, 2009 BMC Biotechnol. 9:70; Abdel-Salam, HA. et al, 2001 Appl Microbiol Biotechnol 56(1 -2): 157-64; Takahashi K. et al, 2000 Biosci Biotechnol Biochem 64(10):2138-44; Edqvist, J. et al., 1991 J Biotechnol 20(3):291 -300), *Hansenula* o *Saccharomyces*. Un experto en la técnica puede optimizar la producción de anticuerpos en levadura optimizando, por ejemplo, las condiciones de oxígeno (véanse, por ejemplo, Baumann K., et al. 2010 BMC Syst. Biol. 4: 141), osmolaridad (véase, por ejemplo, Dragosits, M. et al., 2010 BMC Genomics 11:207), temperatura (véase, por ejemplo, Dragosits, M. et al., 2009 J Proteome Res. 8(3): 1380-92), condiciones de fermentación (véase, por ejemplo, Ning, D. et al. 2005 J. Biochem. and Mol. Biol. 38(3): 294-299),

cepa de levadura (véase, por ejemplo, Kozyr, AV et al. 2004 Mol Biol (Mosk) 38(6): 1067-75; Horwitz, AH. et al, 1988 Proc Natl Acad Sci U S A 85(22): 8678-82; Bowdish, K. et al. 1991 J Biol Chem 266(18): 11901-8), expresión en exceso de proteínas para potenciar la producción de anticuerpos (véase, por ejemplo, Gasser, B. et al., 2006 Biotechnol. Bioeng. 94(2):353-61), nivel de acidez del cultivo (véase, por ejemplo, Kobayashi H., et al, 1997 FEMS Microbiol Lett 152(2):235-42), concentraciones de sustratos y/o iones (véase, por ejemplo, Ko JH. et al., 1996 Appl Biochem Biotechnol 60(1):41 - 8). Además, se pueden usar sistemas de levadura para producir anticuerpos con una semivida prolongada (véase, por ejemplo, Smith, BJ. et al. 2001 Bioconjug Chem 12(5):750-756),

En una realización preferida, los anticuerpos se producen en células de mamífero. Las células hospedadoras de mamífero preferidas para expresar los anticuerpos de clon o fragmentos de unión al antígeno de los mismos incluyen ovario de hámster chino (células CHO) (incluyendo células CHO *dhfr*-, descritas en Urlaub y Chasin, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, usadas con un marcador de selección de DHFR, por ejemplo, como se describe en Kaufman y Sharp, 1982, Mol. Biol. 159:601 621), líneas celulares linfocíticas, por ejemplo, células de mieloma NS0 y células SP2, células COS, células HEK 293T (J. Immunol. Methods (2004) 289(1-2):65-80), y una célula de un animal transgénico, por ejemplo, un mamífero transgénico. Por ejemplo, la célula es una célula epitelial mamaria.

En algunas realizaciones, se producen proteínas de unión a calicreína plasmática en un sistema de planta o libre de células (véase, por ejemplo, Galeffi, P., et al., 2006 J Transl Med 4:39).

Además de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el dominio de inmunoglobulina diversificado, los vectores de expresión recombinantes pueden llevar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células hospedadoras (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores de selección. El gen marcador de selección facilita la selección de células hospedadoras en las que el vector se ha introducido (véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. Nº 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017). Por ejemplo, normalmente el gen marcador de selección confiere resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, en una célula hospedadora en la que se ha introducido el vector. Los genes marcadores de selección preferidos incluyen el gen de dihidrofolato reductasa (DHFR) (para su uso en células hospedadoras *dhfr* con selección/amplificación con metotrexato) y el gen *neo* (para selección con G418).

En un sistema a modo de ejemplo para la expresión recombinante de un anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, un vector de expresión recombinante que codifica tanto la cadena pesada del anticuerpo como la cadena ligera del anticuerpo se introduce en células CHO *dhfr* por transfección mediada por fosfato de calcio. Dentro del vector de expresión recombinante, los genes de la cadena pesada y ligera del anticuerpo se unen cada uno operativamente a elementos reguladores potenciadores / promotores (por ejemplo, derivados de SV40, CMV, adenovirus y similares, tales como un elemento promotor del potenciador de CMV / regulador de AdMLP o un elemento regulador del potenciador de SV40 / promotor de AdMLP) para conducir altos niveles de transcripción de los genes. El vector de expresión recombinante también lleva un gen DHFR, que permite la selección de células CHO que se han transfectado con el vector usando selección / amplificación con metotrexato. Se cultivan las células hospedadoras transformantes seleccionadas para permitir la expresión de las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo y se recupera anticuerpo intacto del medio de cultivo. Se usan técnicas estándares de biología molecular para preparar el vector de expresión recombinante, transfectar las células hospedadoras, seleccionar transformantes, cultivar las células hospedadoras y recuperar el anticuerpo del medio de cultivo. Por ejemplo, se pueden aislar algunos anticuerpos por cromatografía de afinidad con una matriz acoplada a proteína A o proteína G.

Para los anticuerpos que incluyen un dominio Fc, el sistema de producción de anticuerpos puede producir anticuerpos en los que está glucosilada la región Fc. Por ejemplo, el dominio Fc de moléculas de IgG está glucosilado en la asparagina 297 en el dominio CH2. Esta asparagina es el sitio para la modificación con oligosacáridos de tipo biantenarico. Se ha demostrado que se requiere esta glucosilación para funciones efectoras mediadas por receptores de Fcγ y el complemento C1q (Burton y Woof, 1992, Adv. Immunol. 51 : 1-84; Jefferis et al., 1998, Immunol. Rev. 163:59-76). En una realización, el dominio Fc se produce en un sistema de expresión de mamífero que glucosila apropiadamente el resto correspondiente a la asparagina 297. El dominio Fc también puede incluir otras modificaciones postraduccionales eucariotas.

También se pueden producir anticuerpos por un animal transgénico. Por ejemplo, la patente de EE. UU. Nº 5.849.992 describe un método de expresión de un anticuerpo en la glándula mamaria de un mamífero transgénico. Se construye un transgén que incluye un promotor específico de la leche y ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo de interés y una secuencia señal para la secreción. La leche producida por las hembras de dichos mamíferos transgénicos incluye, secretada en ella, el anticuerpo de interés. El anticuerpo se puede purificar de la leche, o para algunas aplicaciones, se usa directamente.

Caracterización de proteínas de unión a calicreína plasmática

CI₅₀ (concentración inhibidora al 50 %) y CE₅₀ (concentración eficaz al 50 %). Dentro de una serie o grupo de proteínas de unión, las que tienen menores valores de CI₅₀ o CE₅₀ se consideran inhibidores más potentes de calicreína plasmática que las proteínas de unión que tienen mayores valores de CI₅₀ o CE₅₀. Las proteínas de unión a modo de ejemplo tienen un valor de CI₅₀ inferior a 800 nM, 400 nM, 100 nM, 25 nM, 5 nM o 1 nM, por ejemplo,

como se mide en un ensayo *in vitro* para la inhibición de la actividad de calicreína plasmática cuando la calicreína plasmática es a 2 pM.

Las proteínas de unión a calicreína plasmática también se pueden caracterizar con referencia a la actividad de los eventos de señalización de factor XII y HMWK (cininógeno de alto peso molecular), por ejemplo, la producción de factor XIIa y/o bradiquinina.

Las proteínas de unión también se pueden evaluar para la selectividad hacia calicreína plasmática. Por ejemplo, se puede ensayar una proteína de unión a calicreína plasmática para su potencia hacia calicreína plasmática y se puede determinar un panel de calicreínas y un valor de CI_{50} o valor de CE_{50} para cada calicreína. En una realización, un compuesto que demuestra un bajo valor de CI_{50} o valor de CE_{50} para la calicreína plasmática, y un mayor valor de CI_{50} o valor de CE_{50} , por ejemplo, al menos 2, 5 o 10 veces mayor, para otra calicreína dentro del panel de prueba se considera que es selectivo hacia calicreína plasmática.

Se puede realizar un estudio farmacocinético en rata, ratones o mono con proteínas de unión a calicreína plasmática para determinar la semivida de calicreína plasmática en el suero. Asimismo, el efecto de la proteína de unión se puede evaluar *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal para una enfermedad (por ejemplo, edema inducido por carragenina en la pata trasera de la rata (Winter et al. Proc Soc Exp Biol Med. 1962;111:544-7)), para su uso como un terapéutico, por ejemplo, para tratar una enfermedad o afección descrita en el presente documento, por ejemplo, un trastorno asociado a calicreína plasmática.

Composiciones farmacéuticas

Se pueden usar las proteínas (por ejemplo, proteínas de unión) que se unen a calicreína plasmática (por ejemplo, calicreína plasmática humana y/o calicreína plasmática murina) y, por ejemplo, incluyen al menos una región variable de inmunoglobulina en los métodos de tratamiento (o prevención) de una enfermedad o afección asociada a calicreína plasmática. Las proteínas de unión pueden estar presentes en una composición, por ejemplo, una composición farmacéuticamente aceptable o composición farmacéutica, que incluye una proteína de unión de calicreína plasmática, por ejemplo, una molécula de anticuerpo u otro polipéptido o péptido identificado que se une a calicreína plasmática, como se describe en el presente documento. La proteína de unión a calicreína plasmática se puede formular junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas incluyen composiciones terapéuticas y composiciones de diagnóstico, por ejemplo, composiciones que incluyen proteínas de unión a calicreína plasmática marcadas para la obtención de imágenes *in vivo*, y composiciones que incluyen proteínas de unión a calicreína plasmática marcadas para el tratamiento (o prevención) de una enfermedad asociada a calicreína plasmática.

Un vehículo farmacéuticamente aceptable incluye todos y cada uno de disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retraso de la absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles. Preferentemente, el vehículo es adecuado para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, por inyección o infusión), aunque también se contemplan vehículos adecuados para inhalación y administración intranasal. Dependiendo de la vía de administración, la proteína de unión a calicreína plasmática se puede recubrir en un material para proteger el compuesto de la acción de ácidos y otras condiciones naturales que puedan inactivar el compuesto.

Una sal farmacéuticamente aceptable es una sal que retiene la actividad biológica deseada del compuesto y no confiere ningún efecto toxicológico no deseado (véase, por ejemplo, Berge, S.M., et al., 1977, J. Pharm. Sci. 66:1-19). Ejemplos de dichas sales incluyen sales de adición de ácido y sales de adición de base. Las sales de adición de ácido incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, y similares, así como de ácidos orgánicos no tóxicos tales como ácidos mono- y dicarboxílicos alifáticos, ácidos alcanoicos sustituidos con fenilo, ácidos hidroxialcanoicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos, y similares. Las sales de adición de base incluyen las derivadas de metales alcalinotérreos, tales como sodio, potasio, magnesio, calcio, y similares, así como de aminas orgánicas no tóxicas, tales como N,N'-dibenciletilendiamina, N-metilglucamina, cloroprocaina, colina, dietanolamina, etilendiamina, procaina, y similares.

Las composiciones pueden estar en una variedad de formas. Éstas incluyen, por ejemplo, formas farmacéuticas líquidas, semisólidas y sólidas, tales como disoluciones líquidas (por ejemplo, disoluciones inyectables e infusibles), dispersiones o suspensiones, comprimidos, píldoras, polvos, liposomas y supositorios. La forma puede depender del modo de administración previsto y aplicación terapéutica. Muchas composiciones están en forma de disoluciones inyectables o infusibles, tales como composiciones similares a las usadas para administración de seres humanos con anticuerpos. Un modo de administración a modo de ejemplo es parenteral (por ejemplo, intravenoso, subcutáneo, intraperitoneal, intramuscular). En una realización, la proteína de unión a calicreína plasmática es adecuada para administración por infusión o inyección intravenosa. En otra realización preferida, la proteína de unión a calicreína plasmática es adecuada para administración por inyección intramuscular o subcutánea.

Las expresiones "administración parenteral" y "administrado por vía parenteral", como se usan en el presente documento, significan modos de administración distintos de administración enteral y tópica, normalmente por

inyección, e incluyen, sin limitación, inyección intravenosa, intramuscular, intrarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intrarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal, e infusión. La composición se puede formular como una disolución, microemulsión, dispersión, liposoma, u otra estructura ordenada adecuada para la alta concentración de fármaco. Se pueden preparar disoluciones inyectables estériles incorporando la proteína de unión en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de componentes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido por esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros componentes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado a vacío y liofilización que da un polvo del principio activo más cualquier componente deseado adicional de una disolución previamente esterilizada por filtración del mismo. La fluidez apropiada de una disolución se puede mantener, por ejemplo, usando un recubrimiento tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partículas requerido en el caso de la dispersión y usando tensioactivos. Se puede provocar la absorción prolongada de composiciones inyectables incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

Se puede administrar una proteína de unión a calicreína plasmática mediante una variedad de métodos, aunque para muchas aplicaciones, la vía/modo de administración preferido es la inyección intravenosa o infusión. Por ejemplo, para aplicaciones terapéuticas, la proteína de unión a calicreína plasmática se puede administrar por infusión intravenosa a una tasa inferior a 30, 20, 10, 5 o 1 mg/min para alcanzar una dosis de aproximadamente 1 a 100 mg/m² o 7 a 25 mg/m². La vía y/o modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados. En ciertas realizaciones, el compuesto activo se puede preparar con un vehículo que protegerá el compuesto contra la rápida liberación, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes, y sistemas de administración microencapsulada. Se pueden usar polímeros biocompatibles biodegradables, tales como etilenoacetato de vinilo, polianhidridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Están disponibles muchos métodos para la preparación de tales formulaciones. Véanse, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., 1978, Marcel Dekker, Inc., New York.

Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar con dispositivos médicos. Por ejemplo, en una realización, una composición farmacéutica desvelada en el presente documento se puede administrar con un dispositivo, por ejemplo, un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja, una bomba, o implante.

En ciertas realizaciones, se puede formular una proteína de unión a calicreína plasmática para garantizar la apropiada distribución *in vivo*. Por ejemplo, la barrera hematoencefálica (BHE) excluye muchos compuestos altamente hidrófilos. Para garantizar que los compuestos terapéuticos desvelados en el presente documento crucen la BHE (si se desea), se pueden formular, por ejemplo, en liposomas. Para los métodos de fabricación de liposomas, véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. N° 4.522.811; 5.374.548; y 5.399.331. Los liposomas pueden comprender uno o más restos que son selectivamente transportados en células u órganos específicos, así potencian la administración de fármaco dirigida (véase, por ejemplo, V.V. Ranade, 1989, J. Clin. Pharmacol. 29:685).

Las pautas posológicas se ajustan para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar un único bolo, se pueden administrar con el tiempo varias dosis divididas o la dosis se puede reducir o aumentar proporcionalmente como se indica por las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular las composiciones parentales en forma unitaria de dosificación para facilitar la administración y uniformidad de la dosificación. La forma unitaria de dosificación como se usa en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos que se van a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas unitarias de dosificación puede venir impuesta por y directamente dependiente de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular a lograr, y (b) las limitaciones inherentes en la materia del mezclado de dicho compuesto activo para el tratamiento de sensibilidad en individuos.

Un intervalo no limitante a modo de ejemplo para una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de una proteína de unión (por ejemplo, un anticuerpo) desvelada en el presente documento es 0,1-20 mg/kg, más preferentemente 1-10 mg/kg. Se puede administrar un anticuerpo anti-calicreína plasmática, por ejemplo, por infusión intravenosa, por ejemplo, a una tasa de inferior a 30, 20, 10, 5 o 1 mg/min para alcanzar una dosis de aproximadamente 1 a 100 mg/m² o aproximadamente 5 a 30 mg/m². Para proteínas de unión más pequeñas en peso molecular que un anticuerpo, las cantidades apropiadas pueden ser proporcionalmente inferiores. Los valores de dosificación pueden variar con el tipo y la gravedad de la afección que va a aliviarse. Para un sujeto particular, se pueden ajustar pautas posológicas específicas con el tiempo según la necesidad individual y el criterio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones.

Las composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento pueden incluir una "cantidad terapéuticamente eficaz" o una "cantidad profilácticamente eficaz" de una proteína de unión a calicreína plasmática desvelada en el presente documento. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición puede variar según factores tales como el estado de enfermedad, edad,

sexo y peso del individuo, y la capacidad de la proteína para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial de la composición es compensado por los efectos terapéuticamente beneficiosos.

Una "dosificación terapéuticamente eficaz" modula preferentemente un parámetro medible, por ejemplo, niveles de anticuerpos IgG circulantes en un grado estadísticamente significativo o al menos aproximadamente 20 %, más preferentemente en al menos aproximadamente 40 %, incluso más preferentemente en al menos aproximadamente 60 %, y todavía más preferentemente en al menos aproximadamente 80 % con respecto a los sujetos no tratados. La capacidad de un compuesto para modular un parámetro medible, por ejemplo, un parámetro asociado a enfermedad, se puede evaluar en un sistema de modelo animal predictivo de eficacia en trastornos y condiciones humanas, por ejemplo, una enfermedad asociada a calicreína plasmática. Alternativamente, esta propiedad de una composición se puede evaluar examinando la capacidad del compuesto para modular un parámetro *in vitro*.

Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado profiláctico deseado. Normalmente, debido a que una dosis profiláctica se usa en sujetos antes de o en una fase más temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será inferior a la cantidad terapéuticamente eficaz.

Estabilización y retención

En una realización, una proteína de unión a calicreína plasmática se asocia físicamente con un resto que mejora su estabilización y/o retención en circulación, por ejemplo, en sangre, suero, linfa, u otros tejidos, por ejemplo, en al menos 1,5, 2, 5, 10 o 50 veces. Por ejemplo, una proteína de unión a calicreína plasmática se puede asociar a un polímero, por ejemplo, un polímero sustancialmente no antigénico, tal como poli(óxidos de alquilenos) o poli(óxidos de etileno). Los polímeros adecuados variarán sustancialmente en peso. Se pueden usar los polímeros que tienen pesos moleculares promedios en número que varían desde aproximadamente 200 hasta aproximadamente 35.000 (o aproximadamente 1.000 a aproximadamente 15.000, y 2.000 a aproximadamente 12.500). Por ejemplo, se puede conjugar una proteína de unión a calicreína plasmática con un polímero soluble en agua, por ejemplo, polímeros de polivinilo hidrófilos, por ejemplo, poli(alcohol vinílico) y polivinilpirrolidona. Una lista no limitante de dichos polímeros incluye homopolímeros de poli(óxido de alquilenos) tales como polietilenglicol (PEG) o polipropilenglicoles, polioles polioxietilenados, copolímeros de los mismos, y copolímeros de bloque de los mismos, a condición de que se mantenga la solubilidad en agua de los copolímeros de bloque.

También se puede asociar una proteína de unión a calicreína plasmática a una proteína transportadora, por ejemplo, una albúmina de suero, tal como una albúmina de suero humano (véase, por ejemplo, Smith, BJ. et al., 2001 Bioconjug Chem 12(5): 750-756). Por ejemplo, se puede usar una fusión traduccional para asociar la proteína transportadora con la proteína de unión a calicreína plasmática.

También se puede modificar una proteína de unión a calicreína plasmática como un derivado de HESilación. Los procesos para la HESilación de una proteína de unión a calicreína plasmática utilizan hidroxietilalmidón para modificar la proteína. La HESilación de una proteína puede prolongar la semivida en circulación de la proteína y también reducir la eliminación renal.

Kits

Se puede proporcionar en un kit una proteína de unión a calicreína plasmática descrita en el presente documento, por ejemplo, como un componente de un kit. Por ejemplo, el kit incluye (a) una proteína de unión a calicreína plasmática, por ejemplo, una composición (por ejemplo, una composición farmacéutica) que incluye una proteína de unión a calicreína plasmática, y, opcionalmente (b) material informativo. El material informativo puede ser material descriptivo, de instrucciones, de comercialización u otro material que se refiere a un método descrito en el presente documento y/o al uso de una proteína de unión a calicreína plasmática, por ejemplo, para un método descrito en el presente documento.

El material informativo del kit no se limita en su forma. En un ejemplo, el material informativo puede incluir información sobre la producción del compuesto, peso molecular del compuesto, concentración, fecha de caducidad, información del lote o sitio de producción, etc. En un ejemplo, el material informativo se refiere al uso de la proteína de unión para tratar, prevenir o diagnosticar trastornos y afecciones, por ejemplo, una enfermedad o afección asociada a calicreína plasmática.

En un ejemplo, el material informativo puede incluir instrucciones para administrar una proteína de unión a calicreína plasmática en un modo adecuado para realizar los métodos descritos en el presente documento, por ejemplo, en una dosis adecuada, forma farmacéutica o modo de administración (por ejemplo, una dosis, forma farmacéutica o modo de administración descrito en el presente documento). En otro ejemplo, el material informativo puede incluir instrucciones para administrar una proteína de unión a calicreína plasmática a un sujeto adecuado, por ejemplo, un humano, por ejemplo, un humano que tiene, o en riesgo de, un trastorno o afección descrito en el presente documento, por ejemplo, una enfermedad o afección asociada a calicreína plasmática. Por ejemplo, el material puede incluir instrucciones para administrar una proteína de unión a calicreína plasmática a un paciente con un trastorno o afección descrito en el presente documento, por ejemplo, una enfermedad asociada a calicreína

plasmática. El material informativo de los kits no se limita en su forma. En muchos casos, el material informativo, por ejemplo, instrucciones, se proporciona en formato impreso, pero también puede estar en otros formatos, tales como material legible por ordenador.

Se puede proporcionar una proteína de unión a calicreína plasmática en cualquier forma, por ejemplo, forma líquida, seca o liofilizada. Se prefiere que una proteína de unión a calicreína plasmática esté sustancialmente pura y/o estéril. Cuando una proteína de unión a calicreína plasmática se proporciona en una disolución líquida, la disolución líquida es preferentemente una disolución acuosa, prefiriéndose una disolución acuosa estéril. Cuando una proteína de unión a calicreína plasmática se proporciona como forma seca, la reconstitución es generalmente mediante la adición de un disolvente adecuado. El disolvente, por ejemplo, agua estéril o tampón, se puede proporcionar opcionalmente en el kit.

El kit puede incluir uno o más recipientes para la composición que contiene una proteína de unión a calicreína plasmática. En algunos ejemplos, el kit contiene recipientes separados, divisores o compartimentos para la composición y material informativo. Por ejemplo, la composición puede estar contenida en una botella, vial o jeringa, y el material informativo puede estar contenido en asociación con el recipiente. En otros ejemplos, los elementos separados del kit están contenidos dentro de un único recipiente sin dividir. Por ejemplo, la composición está contenida en una botella, vial o jeringa que tiene unida a la misma el material informativo en forma de una etiqueta. En algunos ejemplos, el kit incluye una pluralidad (por ejemplo, un envase) de recipientes individuales, conteniendo cada uno una o más formas farmacéuticas unitarias (por ejemplo, una forma farmacéutica descrita en el presente documento) de una proteína de unión a calicreína plasmática. Por ejemplo, el kit incluye una pluralidad de jeringas, ampollas, envases de lámina o envases alveolados, conteniendo cada uno una dosis unitaria única de una proteína de unión a calicreína plasmática. Los recipientes de los kits pueden ser impermeables al aire, resistentes al agua (por ejemplo, impermeables a cambios en la humedad o evaporación) y/u opacos a la luz.

El kit incluye opcionalmente un dispositivo adecuado para administración de la composición, por ejemplo, una jeringa, inhalante, cuentagotas (por ejemplo, cuentagotas para los ojos), hisopo (por ejemplo, un hisopo de algodón o hisopo de madera), o cualquiera de dicho dispositivo de administración. En un ejemplo, el dispositivo es un dispositivo implantable que dispensa dosis medidas de la proteína de unión. La divulgación también caracteriza un método para proporcionar un kit, por ejemplo, combinando los componentes descritos en el presente documento.

Tratamientos

Las proteínas que se unen a calicreína plasmática, por ejemplo, como se describen en el presente documento, tienen utilidades terapéuticas y profilácticas, particularmente en sujetos humanos. Estas proteínas de unión se administran a un sujeto para tratar, prevenir y/o diagnosticar una variedad de trastornos y afecciones, que incluyen, por ejemplo, una enfermedad asociada a calicreína plasmática, o incluso a células en cultivo, por ejemplo, *in vitro* o *ex vivo*. Por ejemplo, estas proteínas de unión se pueden usar para modificar los efectos de la calicreína plasmática liberada de células en cultivo (Lilla et al., J Biol Chem. 284(20): 13792-13803 (2009)). El tratamiento incluye administrar una cantidad eficaz para aliviar, mitigar, alterar, remediar, mejorar, corregir o afectar el trastorno, los síntomas del trastorno o la predisposición hacia el trastorno. El tratamiento también puede retardar la aparición, por ejemplo, prevenir la aparición, o prevenir el deterioro de una enfermedad o afección.

Como se usa en el presente documento, una cantidad de un agente de unión diana eficaz para prevenir un trastorno, o una cantidad profilácticamente eficaz del agente de unión, se refiere a una cantidad de un agente de unión diana, por ejemplo, una proteína de unión a calicreína plasmática, por ejemplo, un anticuerpo anti-calicreína plasmática descrito en el presente documento, que es eficaz, tras la administración de dosis única o múltiple al sujeto, para prevenir o retrasar el hecho de la aparición o reaparición de un trastorno, por ejemplo, un trastorno descrito en el presente documento, por ejemplo, una enfermedad asociada a calicreína plasmática.

Los métodos de administración de proteínas de unión a calicreína plasmática y otros agentes también se describen en "Composiciones farmacéuticas". Las dosificaciones adecuadas de las moléculas usadas pueden depender de la edad y peso del sujeto y el fármaco particular usado. Las proteínas de unión se pueden usar como agentes competitivos para inhibir, reducir una interacción no deseable, por ejemplo, entre calicreína plasmática y su sustrato (por ejemplo, factor XII o HMWK). La dosis de la proteína de unión a calicreína plasmática puede ser la cantidad suficiente para bloquear 90 %, 95 %, 99 % o 99,9 % de la actividad de calicreína plasmática en el paciente, especialmente en el sitio de enfermedad. Dependiendo de la enfermedad, esto puede requerir 0,1, 1,0, 3,0, 6,0 o 10,0 mg/kg. Para una IgG que tiene una masa molecular de 150.000 g/mol (dos sitios de unión), estas dosis corresponden a aproximadamente 18 nM, 180 nM, 540 nM, 1,08 µM y 1,8 µM de sitios de unión para un volumen de 5 l de sangre.

En ocasiones, las proteínas de unión a calicreína plasmática se usan para inhibir una actividad (por ejemplo, inhiben al menos una actividad de calicreína plasmática, por ejemplo, reducen la producción de factor XIIa y/o bradiquinina) de calicreína plasmática, por ejemplo, *in vivo*. Las proteínas de unión se pueden usar por sí mismas o conjugadas a un agente, por ejemplo, un fármaco citotóxico, enzima de citotoxina, o radioisótopo. Este método incluye: administrar la proteína de unión sola o unida a un agente (por ejemplo, un fármaco citotóxico), a un sujeto que requiere tal tratamiento. Por ejemplo, se pueden usar las proteínas de unión a calicreína plasmática que no inhiben

sustancialmente la calicreína plasmática para administrar nanopartículas que contienen agentes, tales como toxinas, a células o tejidos asociados a calicreína plasmática, por ejemplo, para tratar un trastorno asociado a calicreína plasmática.

Debido a que las proteínas de unión a calicreína plasmática reconocen las células que expresan calicreína plasmática y pueden unirse a células que están asociadas con (por ejemplo, en proximidad de o entremezcladas con) un trastorno o afección asociado a calicreína plasmática, las proteínas de unión a calicreína plasmática se pueden usar para inhibir una actividad (por ejemplo, inhibir al menos una actividad de calicreína plasmática, por ejemplo, reducir la producción de factor XIIa y/o bradiquinina) de cualquiera de dichas células e inhibir la enfermedad asociada a calicreína plasmática. El reducir la actividad de calicreína plasmática puede inhibir indirectamente células que pueden ser dependientes de la actividad de calicreína plasmática para el desarrollo y/o la progresión de un trastorno asociado a calicreína plasmática.

Las proteínas de unión se pueden usar para administrar un agente (por ejemplo, cualquiera de una variedad de fármacos citotóxicos y terapéuticos) a células y tejidos donde está presente la calicreína plasmática. Los agentes a modo de ejemplo incluyen un compuesto que emite radiación, moléculas de plantas, origen fúngico o bacteriano, proteínas biológicas, y sus mezclas. Los fármacos citotóxicos pueden ser fármacos citotóxicos que actúan intracelularmente, tales como toxinas, emisores de radiación de intervalo corto, por ejemplo, emisores α de alta energía de intervalo corto.

Para dirigir células que expresan calicreína plasmática, se puede usar un sistema de profármaco. Por ejemplo, se conjuga una primera proteína de unión con un profármaco que se activa solo cuando está en estrecha proximidad con un activador de profármaco. El activador de profármaco se conjuga con una segunda proteína de unión, preferentemente una que se une a un sitio no competidor en la molécula diana. Si se unen dos proteínas de unión a sitios de unión competidores o no competidores, se puede determinar por ensayos de unión competitiva convencionales. Los pares de fármaco-profármaco a modo de ejemplo se describen en Blakely et al., (1996) Cancer Research, 56:3287 3292.

Las proteínas de unión a calicreína plasmática se pueden usar directamente *in vivo* para eliminar las células que expresan antígeno mediante citotoxicidad natural dependiente de complemento (CDC) o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). Las proteínas de unión descritas en el presente documento pueden incluir el dominio efector de unión al complemento, tal como las porciones Fc de IgG1, -2, o -3 o correspondientes a las porciones de IgM que se unen al complemento. En ocasiones, una población de células diana se trata *ex vivo* con un agente de unión descrito en el presente documento y células efectoras apropiadas. El tratamiento puede ser complementado mediante la adición de complemento o suero que contiene complemento. Además, se puede mejorar la fagocitosis de células diana recubiertas con una proteína de unión descrita en el presente documento uniendo proteínas del complemento. En ocasiones, células diana recubiertas con la proteína de unión que incluye un dominio efector de unión al complemento se lisan por el complemento.

Los métodos de administración de proteínas de unión a calicreína plasmática se describen en "Composiciones farmacéuticas". Las dosificaciones adecuadas de las moléculas usadas dependerán de la edad y peso del sujeto y el fármaco particular usado. Las proteínas de unión se pueden usar como agentes competitivos para inhibir o reducir una interacción no deseable, por ejemplo, entre un agente natural o patológico y la calicreína plasmática.

La proteína de unión a calicreína plasmática se puede usar para administrar macro y micromoléculas, por ejemplo, un gen en la célula para fines de terapia génica en el endotelio o epitelio y dirigir solo los tejidos que expresan la calicreína plasmática. Las proteínas de unión se pueden usar para administrar una variedad de fármacos citotóxicos que incluyen fármacos terapéuticos, un compuesto que emite radiación, moléculas de plantas, origen fúngico o bacteriano, proteínas biológicas y sus mezclas. Los fármacos citotóxicos pueden ser fármacos citotóxicos que actúan intracelularmente, tales como emisores de radiación de intervalo corto, que incluyen, por ejemplo, emisores α de alta energía de corto intervalo, como se describen en el presente documento.

En el caso de toxinas de polipéptido, se pueden usar técnicas de ácido nucleico recombinante para construir un ácido nucleico que codifica la proteína de unión (por ejemplo, anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo) y la citotoxina (o un componente de polipéptido de la misma) como fusiones traduccionales. El ácido nucleico recombinante se expresa entonces, por ejemplo, en células y se aísla el polipéptido de fusión codificado.

Alternativamente, la proteína de unión a calicreína plasmática se puede acoplar a emisores de radiación de alta energía, por ejemplo, un radioisótopo, tal como ^{131}I , un emisor γ que, cuando se localiza en un sitio, da como resultado una destrucción de varios diámetros celulares. Véase, por ejemplo, S.E. Order, "Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy", Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy, R.W. Baldwin et al. (eds.), pp 303 316 (Academic Press 1985). O radioisótopos adecuados incluyen emisores α , tales como ^{212}Bi , ^{213}Bi y ^{211}At , y emisores β , tales como ^{186}Re y ^{90}Y . Además, también se puede usar ^{177}Lu como tanto un agente de obtención de imágenes como citotóxico.

La radioinmunoterapia (RIT) usando anticuerpos marcados con ^{131}I , ^{90}Y y ^{177}Lu está en intensa investigación clínica. Existen diferencias significativas en las características físicas de estos tres núclidos y, como resultado, la elección

del radionúclido es muy crítica con el fin de administrar la máxima dosis de radiación a un tejido de interés. Las partículas de mayor energía beta de ^{90}Y pueden ser buenas para los tumores de gran masa. Las partículas de energía beta relativamente baja de ^{131}I son ideales, pero *in vivo* la deshalogenación de moléculas radioyodadas es una desventaja importante para la internalización del anticuerpo. A diferencia, ^{177}Lu tiene partícula beta de baja energía con solo el intervalo de 0,2-0,3 mm y suministra dosis de mucha menos radiación a la médula ósea en comparación con ^{90}Y . Además, debido a la semivida física más larga (en comparación con ^{90}Y), los tiempos de residencia son mayores. Como resultado, se pueden administrar mayores actividades (más cantidades de mCi) de agentes marcados con ^{177}Lu con dosis de comparativamente menos radiación a la médula ósea. Ha habido varios estudios clínicos que investigan el uso de anticuerpos marcados con ^{177}Lu en el tratamiento de diversos cánceres. (Mulligan T et al., 1995, Clin. Canc. Res. 1: 1447-1454; Meredith RF, et al., 1996, J. Nucl. Med. 37:1491-1496; Alvarez RD, et al., 1997, Gynecol. Oncol. 65:94-101).

Enfermedades y afecciones a modo de ejemplo

Una proteína de unión a calicreína plasmática descrita en el presente documento es útil para tratar (o prevenir) una enfermedad o afección en la que la actividad de calicreína plasmática participa, por ejemplo, en una enfermedad o afección descrita en el presente documento, o para tratar (o prevenir) uno o más síntomas asociados a la misma. En ocasiones, la proteína de unión a calicreína plasmática (por ejemplo, calicreína plasmática que se une a IgG o Fab) inhibe la actividad de calicreína plasmática.

Los ejemplos de tales enfermedades y afecciones que se puede tratar (o prevenir) por una proteína de unión a calicreína plasmática descrita en el presente documento incluyen: artritis reumatoide, gota, enfermedad intestinal, mucositis oral, dolor neuropático, dolor inflamatorio, enfermedad espinal degenerativa con estenosis del conducto vertebral, trombosis arterial o venosa, íleo posoperatorio, aneurisma aórtica, osteoartritis, vasculitis, edema, angioedema hereditario, edema cerebral, embolia pulmonar, accidente cerebrovascular, coagulación inducida por dispositivos de asistencia ventricular o prótesis endovasculares, traumatismo craneoencefálico o edema cerebral peritumoral, septicemia, evento isquémico agudo de la arteria cerebral media (ACM) (accidente cerebrovascular), reestenosis (por ejemplo, después de angioplastia), nefritis por lupus eritematoso sistémico y lesión por quemadura. Una proteína de unión a calicreína plasmática descrita en el presente documento también se puede usar para promover la cicatrización. Una proteína de unión a calicreína plasmática descrita en el presente documento también se puede usar como tratamiento de oncología por mecanismos que incluyen, pero no se limitan a, bloqueo de la producción de bradiquinina pro-angiogénica.

Se puede administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática a un sujeto que tiene o que se sospecha que tiene un trastorno en el que participa la actividad de calicreína plasmática, tratando así (por ejemplo, mejorando o corrigiendo un síntoma o característica de un trastorno, ralentizando, estabilizando y/o deteniendo la progresión de la enfermedad) el trastorno.

La proteína de unión a calicreína plasmática se puede administrar en una cantidad terapéuticamente eficaz. Una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática es la cantidad que es eficaz, tras la administración de dosis únicas o múltiples a un sujeto, en tratar un sujeto, por ejemplo, curar, aliviar, mitigar o mejorar al menos un síntoma de un trastorno en un sujeto a un grado más allá del esperado en ausencia de tal tratamiento. Una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición puede variar según factores tales como el estado de enfermedad, edad, sexo y peso del individuo, y la capacidad del compuesto para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial de la composición es compensado por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una dosificación terapéuticamente eficaz modula preferentemente un parámetro medible, favorablemente, con respecto a los sujetos no tratados. La capacidad de un compuesto para afectar (por ejemplo, inhibir) un parámetro medible se puede evaluar en un sistema de modelo animal predictivo de eficacia en un trastorno humano.

Las pautas posológicas se pueden ajustar para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, se pueden administrar un único bolo, se pueden administrar con el tiempo varias dosis divididas o la dosis se puede reducir o aumentar proporcionalmente como se indica por las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular las composiciones parentales en forma unitaria de dosificación para facilitar la administración y uniformidad de la dosificación. La forma unitaria de dosificación, como se usa en el presente documento, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos que se van a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido.

Artritis reumatoide

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria crónica autoinmunitaria que causa la inflamación de las articulaciones y dolor y normalmente da como resultado la destrucción de las articulaciones. La AR generalmente sigue una evolución recidivante/remitente, con "crisis" de actividad de la enfermedad intercaladas con remisiones de los síntomas de la enfermedad. La AR se asocia con varios trastornos inflamatorios adicionales, que incluyen síndrome de Sjogren (sequedad de los ojos y de la boca causada por inflamación de las glándulas lacrimales y salivares), pleuritis (inflamación de la pleura que causa dolor al respirar profundo y toser), nódulos reumatoides

(sitios nodulares de inflamación que se desarrollan dentro de los pulmones), pericarditis (inflamación del pericardio que causa dolor al recostarse o inclinarse hacia adelante), síndrome de Felty (esplenomegalia y leucopenia observadas conjuntamente con AR, que hace que el sujeto sea propenso a infección) y vasculitis (una inflamación de los vasos sanguíneos que puede bloquear la circulación sanguínea). La calicreína plasmática participa en la artritis reumatoide.

Los síntomas de la AR activa incluyen fatiga, falta de apetito, febrícula, dolores musculares y articulares, y rigidez. La rigidez muscular y articular son normalmente más notables por la mañana y después de periodos de inactividad. Durante las crisis, las articulaciones se vuelven frecuentemente rojas, hinchadas, dolorosas y sensibles, generalmente como consecuencia de sinovitis.

El tratamiento para la artritis reumatoide implica una combinación de medicaciones, descanso, ejercicios de estiramiento articular y protección articular. Se usan dos clases de medicaciones en el tratamiento de la artritis reumatoide: "fármacos de primera línea" antiinflamatorios y "fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad" (FARME). Los fármacos de primera línea incluyen AINE (por ejemplo, aspirina, naproxeno, ibuprofeno y etodolaco) y cortisona (corticosteroides). Los FARME, tales como el oro (por ejemplo, sales de oro, tioglucosa de oro, tiomalato de oro, oro oral), metotrexato, sulfasalazina, D-penicilamina, azatioprina, ciclofosfamida, clorambucilo y ciclosporina, leflunomida, etanercept, infliximab, anakinra y adalimumab, e hidroxicloroquina, promueven la remisión de la enfermedad y previenen la destrucción articular progresiva, pero no son agentes antiinflamatorios.

La divulgación proporciona métodos de tratamiento (por ejemplo, mejora, estabilización o eliminación de uno o más síntomas o mejora o estabilización de la puntuación del sujeto en una escala de AR) de la artritis reumatoide administrando una proteína de unión a calicreína plasmática (por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática) a un sujeto que tiene o que se sospecha que tiene AR. Se proporcionan además métodos de tratamiento de AR administrando una proteína de unión a calicreína plasmática (por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática) en combinación con una segunda terapia, por ejemplo, con al menos un "fármaco de primera línea" antiinflamatorio (por ejemplo, un AINE y/o cortisona) y/o un FARME. La divulgación también proporciona métodos de prevención de artritis reumatoide o un síntoma de la misma administrando una proteína de unión a calicreína plasmática (por ejemplo, una cantidad profilácticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática) a un sujeto en riesgo de desarrollar AR (por ejemplo, un sujeto que tiene un miembro de su familia con AR o una predisposición genética a la misma).

Se proporcionan además métodos de tratamiento (por ejemplo, mejora, estabilización o eliminación de uno o más síntomas) de los trastornos asociados a la artritis reumatoide (síndrome de Sjogren, pleuritis, nódulos reumatoides pulmonares, pericarditis, síndrome de Felty y vasculitis) administrando una proteína de unión a calicreína plasmática (por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática) a un sujeto que tiene o que se sospecha que tiene AR.

Las escalas útiles para evaluar la AR y los síntomas de la AR incluyen, por ejemplo, la escala de gravedad de la artritis reumatoide (RASS; Bardwell et al., (2002) *Rheumatology* 41(1):38-45), el índice de salud específico de artritis SF-36 (ASHI; Ware et al., (1999) *Med. Care* 37(5 Suppl):MS40-50), las escalas de medición del impacto de la artritis o las escalas de medición del impacto de la artritis 2 (AIMS o AIMS2; Meenan et al. (1992) *Arthritis Rheum.* 35(1):1-10); el cuestionario de evaluación de la salud de Stanford (HAQ), HAQII, o HAQ modificado (véase, por ejemplo, Pincus et al. (1983) *Arthritis Rheum.* 26(11):1346-53).

La orientación para la determinación de la dosificación que suministra una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática se puede obtener de modelos animales de artritis reumatoide, tales como artritis inducida por colágeno (CIA), que se induce, normalmente en roedores, por inmunización con colágeno de tipo II autógeno o heterólogo en adyuvante (Williams et al. *Methods Mol Med.* 98:207-16 (2004)).

Gota

La gota es una afección que resulta de cristales de ácido úrico que se depositan en los tejidos del cuerpo. La gota se caracteriza por una sobrecarga de ácido úrico en el cuerpo y ataques recurrentes de inflamación articular (artritis). La gota crónica puede conducir a depósitos de coágulos duros de ácido úrico en y alrededor de las articulaciones, función renal reducida y cálculos renales. La gota se relaciona frecuentemente con una anomalía heredada en la capacidad del cuerpo para procesar el ácido úrico. El ácido úrico es un producto de descomposición de las purinas, que son parte de muchos alimentos. Una anomalía en la manipulación del ácido úrico puede causar ataques de artritis dolorosa (ataque de gota), cálculos renales y bloque de los túbulos filtradores del riñón con cristales de ácido úrico, que conducen a insuficiencia renal. Algunos pacientes pueden solo desarrollar elevados niveles de ácido úrico en sangre (hiperuricemia) sin tener artritis o problemas renales.

Los síntomas de la gota incluyen, por ejemplo, dolor insoportable e inesperado, inflamación, rojez, calor y rigidez en el pie afectado u otras partes del cuerpo, y febrícula.

Los tratamientos para la gota incluyen, por ejemplo, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), colchicina y glucocorticoides orales, glucocorticoides intrarticulares administrados por una inyección articular, inhibidores de

xantina oxidasa (por ejemplo, alopurinol, febuxostat), uricosúricos (por ejemplo, probenecid, EDTA), urato oxidasas (por ejemplo, pegloticasa), bicarbonato sódico y dieta pobre en purinas.

La divulgación proporciona métodos de tratamiento (por ejemplo, mejora, estabilización o eliminación de uno o más síntomas o el empeoramiento de) de la gota administrando una proteína de unión a calicreína plasmática (por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática) a un sujeto que tiene o que se sospecha que tiene gota. Se proporcionan además métodos de tratamiento de la gota administrando una proteína de unión a calicreína plasmática (por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína) en combinación con una segunda terapia, por ejemplo, un AINE, una colchicina, un glucocorticoide oral, un glucocorticoide intrarticular administrado mediante una inyección articular, un inhibidor de xantina oxidasa (por ejemplo, alopurinol, febuxostat), un uricosúrico (por ejemplo, probenecid, EDTA), una urato oxidasa (por ejemplo, pegloticasa), bicarbonato sódico y/o dieta pobre en purinas. La divulgación también proporciona métodos de prevención de la gota o un síntoma de la misma administrando una proteína de unión a calicreína plasmática (por ejemplo, una cantidad profilácticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática) a un sujeto en riesgo de desarrollar gota (por ejemplo, un sujeto que tiene un miembro de su familia con gota o una predisposición genética a la misma).

La orientación para la determinación de la dosificación que suministra una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática se puede obtener de modelos animales de gota, véase, por ejemplo, Reginato y Olsen, Curr Opin Rheumatol. 19(2): 134-45 (2007) y referencias citadas en su interior.

Enfermedad intestinal (EII)

La enfermedad inflamatoria del intestino (EII) es un grupo de afecciones inflamatorias del intestino grueso y, en algunos casos, el intestino delgado. Las principales formas de la EII son la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa (CU). Están otras formas de EII que representan muchos menos casos: colitis colagenosa, colitis linfocítica, colitis isquémica, colitis por exclusión, síndrome de Behçet, colitis infecciosa y colitis indeterminada. La principal diferencia entre la enfermedad de Crohn y la CU es la localización y la naturaleza de los cambios inflamatorios. La enfermedad de Crohn puede afectar cualquier parte del tubo gastrointestinal, desde la boca hasta el ano (lesiones salteadas), aunque la mayoría de los casos empiezan en el íleon terminal. La colitis ulcerosa, a diferencia, está restringida al colon y el recto. Microscópicamente, la colitis ulcerosa está restringida a la mucosa (revestimiento epitelial del intestino), mientras que la enfermedad de Crohn afecta toda la pared intestinal. Finalmente, la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa están presentes con manifestaciones extraintestinales (tales como problemas del hígado, artritis, manifestaciones de la piel y problemas oculares) en diferentes proporciones.

Los síntomas de EII incluyen dolor abdominal, vómitos, diarrea, rectorragia, pérdida de peso, aumento de peso y diversas molestias o enfermedades asociadas (artritis, pioderma gangrenosa, colangitis esclerosante primaria). El diagnóstico generalmente es por colonoscopia con biopsia de lesiones patológicas. Raramente se puede hacer un diagnóstico definitivo o de enfermedad de Crohn o de colitis ulcerosa debido a idiosincrasias en la presentación. En este caso, se puede hacer un diagnóstico de colitis indeterminada.

El tratamiento para EII, dependiendo del nivel de gravedad, puede requerir inmunosupresión para controlar los síntomas. Se pueden usar inmunosupresores tales como azatioprina, metotrexato o 6-mercaptopurina. Más comúnmente, el tratamiento de EII requiere una forma de mesalamina. Frecuentemente, se usan esteroides para controlar las crisis de la enfermedad y fueron una vez aceptables como fármaco de mantenimiento. Se han usado biológicos, tales como infliximab, para tratar pacientes con enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa. Casos graves pueden requerir cirugía, tal como resección intestinal, estricturoplastia o una colostomía o ileostomía temporal o permanente. Los tratamientos médicos alternativos para EII existen en diversas formas, sin embargo, tales métodos se concentran en controlar la patología subyacente con el fin de evitar exposición esteroidea prolongada o extirpación quirúrgica. Normalmente, el tratamiento empieza administrando fármacos, tales como prednisona, con efectos antiinflamatorios altos. Una vez se controla satisfactoriamente la inflamación, el paciente se cambia normalmente a un fármaco más ligero, tal como asacol -una mesalamina- para mantener la enfermedad en remisión. Si no es satisfactorio, se puede o no puede administrar una combinación de los fármacos inmunosupresores anteriormente mencionados con una mesalamina (que también puede tener un efecto antiinflamatorio), dependiendo del paciente.

La divulgación proporciona métodos de tratamiento (por ejemplo, mejora, estabilización o eliminación de uno o más síntomas de) de EII administrando una proteína de unión a calicreína plasmática (por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática) a un sujeto que tiene o que se sospecha que tiene EII. Se proporcionan además métodos de tratamiento de EII administrando una proteína de unión a calicreína plasmática (por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína) en combinación con una segunda terapia, por ejemplo, un inmunosupresor (por ejemplo, azatioprina, metotrexato, 6-mercaptopurina), una mesalamina, un esteroide y/o infliximab. La divulgación también proporciona métodos de prevención de EII o un síntoma de la misma administrando una proteína de unión a calicreína plasmática (por ejemplo, una cantidad profilácticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática) a un sujeto en riesgo de desarrollar EII (por ejemplo, un sujeto que tiene un miembro de su familia con EII o una predisposición genética a la misma).

La orientación para la determinación de la dosificación que suministra una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática se puede obtener de modelos animales de EII, véanse, por ejemplo, aquellos descritos en la patente de EE. UU. N° 6.114.382, documento WO 2004/071186, y referencias citadas en su interior.

5 **Mucositis oral**

La mucositis oral es la inflamación dolorosa y ulceración de las membranas mucosas en la boca, normalmente como un efecto adverso del tratamiento de quimioterapia y radioterapia para el cáncer.

Los síntomas de la mucositis oral incluyen, por ejemplo, úlceras, eritema periférico, sensación de ardor acompañada por enrojecimiento, dificultad para habla, comer, o incluso abrir la boca, y disgeusia (alteración en la percepción del sabor).

El tratamiento para la mucositis oral incluye higiene bucal (enjuague bucal con sal, GELCLAIR®, CAPHOSOL®, MUGARD®), palifermina (un factor de crecimiento de queratinocitos humano), citocinas y otros modificadores de la inflamación (por ejemplo, IL-1, IL-11, TGF-beta3), complementación de aminoácidos (por ejemplo, glutamina), vitaminas, factores estimulantes de colonias, crioterapia y terapia con láser.

La divulgación proporciona métodos de tratamiento (por ejemplo, mejora, reducción o eliminación de uno o más síntomas, o estabilización de la puntuación del sujeto en una escala de mucositis) de la mucositis oral administrando una proteína de unión a calicreína plasmática (por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática) a un sujeto que tiene o que se sospecha que tiene mucositis oral. Se proporcionan además métodos de tratamiento de mucositis oral administrando una proteína de unión a calicreína plasmática (por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática) en combinación con una segunda terapia, por ejemplo, higiene bucal (enjuague bucal con sal, GELCLAIR®, CAPHOSOL®, MUGARD®), palifermina (un factor de crecimiento de queratinocitos humano), una citocina y/o un modificador de la inflamación (por ejemplo, IL-1, IL-11, TGF-beta3), una complementación de aminoácidos (por ejemplo, glutamina), una vitamina, un factor estimulante de colonias, crioterapia y terapia con láser. La divulgación también proporciona métodos de prevención de mucositis oral o un síntoma de la misma administrando una proteína de unión a calicreína plasmática (por ejemplo, una cantidad profilácticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática) a un sujeto en riesgo de desarrollar mucositis oral (por ejemplo, un sujeto que ha recibido o está recibiendo quimioterapia o radioterapia).

Las escalas útiles para evaluar la mucositis oral incluyen la puntuación de toxicidad oral de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Handbook for reporting results of cancer treatment. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 1979:15-22), los criterios de toxicidad común del Instituto Nacional del Cáncer (NCI-CTC) para mucositis oral (Criterios de toxicidad común del Instituto Nacional del Cáncer. Versión 2.0, 1 de junio de 1999, Sonis et al., Cancer. 85:2103-2113 (1999)) y la escala de evaluación de mucositis oral (OMAS).

La orientación para la determinación de la dosificación que suministra una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática se puede obtener de modelos animales de mucositis oral, tales como un modelo animal de oral mucositis inducida por un régimen de acondicionamiento de trasplante de células madre hematopoyéticas (Chen et al., Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. 42(11):672-6 (2007)).

Dolor neuropático

El dolor neuropático es un estado de dolor crónico complejo que normalmente va acompañado por lesión de tejido. Con el dolor neuropático, las propias fibras nerviosas se pueden dañar, ser disfuncionales o lesionar. Estas fibras nerviosas dañadas envían señales incorrectas a otros centros de dolor. El impacto de la lesión de las fibras nerviosas incluye un cambio en la función nerviosa tanto en el sitio de lesión como las áreas alrededor de la lesión.

Los síntomas de dolor neuropático incluyen, por ejemplo, dolor fulgurante y de ardor y hormigueo y entumecimiento.

Los tratamientos para el dolor neuropático incluyen, por ejemplo, medicaciones (por ejemplo, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) (por ejemplo, ALEVE®, MOTRIN®, o morfina), fármacos anticonvulsivos y antidepresivos) y dispositivos invasivos o implantables (por ejemplo, estimulación eléctrica).

La divulgación proporciona métodos de tratamiento (por ejemplo, mejora, reducción o eliminación de uno o más síntomas o estabilización de la puntuación del sujeto en una escala de dolor) de dolor neuropático administrando una proteína de unión a calicreína plasmática (por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática) a un sujeto que tiene o que se sospecha que tiene dolor neuropático. Se proporcionan además métodos de tratamiento de dolor neuropático administrando una proteína de unión a calicreína plasmática (por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática) en combinación con una segunda terapia, por ejemplo, un tratamiento no quirúrgico ((por ejemplo, un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE) (por ejemplo, ALEVE®, MOTRIN®, o morfina), un anticonvulsivo y/o un fármaco antidepresivo) y/o un dispositivo invasivo o implantable (por ejemplo, estimulación eléctrica). La divulgación también proporciona métodos de prevención de dolor neuropático o un síntoma del mismo administrando una

proteína de unión a calicreína plasmática (por ejemplo, una cantidad profilácticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática) a un sujeto en riesgo de desarrollar dolor neuropático (por ejemplo, un sujeto que ha sufrido una lesión de tejido).

Las escalas útiles para la evaluación del dolor neuropático incluyen, por ejemplo, la escala de clasificación del dolor de Wong-Baker FACES (Fundación de la escala de clasificación del dolor Wong-Baker FACES), la escala analógica visual (VAS) (Huskisson, J. *Rheumatol.* 9 (5): 768-9 (1982)), el cuestionario de dolor de McGill (MPQ) (Melzack, dolor 1 (3): 277-99 (1975)), la escala diferencial de los descriptores (DDS) (Gracely y Kwilosz, *Pain* 35 (3): 279-88 (1988)), la escala de dolor de Faces - revisada (FPS-R) (Hicks et al., *Pain* 93 (2): 173-83 (2001)), el cuadro numérico de 11 puntos (BS-11) (Jensen et al., *Clin J Pain* 5 (2): 153-9 (1989)), la escala de clasificación numérica (NRS-11) (Hartrick et al., *Pain Pract* 3 (4): 310-6 (2003)), el índice de dolor con dolorímetro (DPI) (Hardy et al., (1952). *Pain Sensations and Reactions*. Baltimore: The Williams & Wilkins Co.) y el inventario breve del dolor (BPI) (Cleeland and Ryan *Ann. Acad. Med. Singap.* 23 (2): 129-38 (1994)).

La orientación para la determinación de la dosificación que suministra una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática se puede obtener de modelos animales de dolor neuropático, véanse, por ejemplo, aquellos descritos en Martin et al., *Methods Mol Med.* 84:233-42 (2003) y referencias citadas en su interior.

Dolor inflamatorio

El dolor inflamatorio se causa por un ataque tal como heridas por penetración, quemaduras, frío extremo, fracturas, artritis, afecciones autoinmunitarias, estiramiento excesivo, infecciones y vasoconstricción hasta la integridad de tejidos a un nivel celular. Durante la inflamación, una compleja interacción neuro-inmunitaria da como resultado la hiperalgesia primaria, en la que un gran intervalo de moléculas inflamatorias que incluyen prostaglandinas y bradiquinina inducen y mantienen la sensibilidad nociceptora alterada.

Los tratamientos para el dolor inflamatorio incluyen, por ejemplo, fármacos antiinflamatorios no esteroideo (AINE) y corticosteroides.

La divulgación proporciona métodos de tratamiento (por ejemplo, mejora, reducción o eliminación de uno o más síntomas de) de dolor inflamatorio administrando una proteína de unión a calicreína plasmática (por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática) a un sujeto que tiene o que se sospecha que tiene dolor inflamatorio. Se proporcionan además métodos de tratamiento de dolor inflamatorio administrando una proteína de unión a calicreína plasmática (por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática) en combinación con una segunda terapia, por ejemplo, un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE) y/o un corticosteroide. La divulgación también proporciona métodos de prevención de dolor inflamatorio o un síntoma del mismo administrando una proteína de unión a calicreína plasmática (por ejemplo, una cantidad profilácticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática) a un sujeto en riesgo de desarrollar dolor inflamatorio (por ejemplo, un sujeto que ha experimentado un ataque, por ejemplo, tal como una herida por penetración, una quemadura, frío extremo, una fractura, artritis, una afección autoinmunitaria, estiramiento excesivo o infección).

Las escalas útiles para la evaluación de dolor inflamatorio incluyen, por ejemplo, la escala de clasificación del dolor de Wong-Baker FACES (Wong-Baker FACES Pain Rating Scale Fundación), la escala analógica visual (VAS) (Huskisson, J. *Rheumatol.* 9 (5): 768-9 (1982)), el cuestionario de dolor de McGill (MPQ) (Melzack, *Pain* 1 (3): 277-99 (1975)), la escala diferencial de los descriptores (DDS) (Gracely y Kwilosz, *Pain* 35 (3): 279-88 (1988)), la escala de dolor de Faces - revisada (FPS-R) (Hicks et al., *Pain* 93 (2): 173-83 (2001)), cuadro numérico de 11 puntos (BS-11) (Jensen et al., *Clin J Pain* 5 (2): 153-9 (1989)), la escala de clasificación numérica (NRS-11) (Hartrick et al., *Pain Pract* 3 (4): 310-6 (2003)), el índice de dolor con dolorímetro (DPI) (Hardy et al., (1952). *Pain Sensations and Reactions*. Baltimore: The Williams & Wilkins Co.) y el inventario breve del dolor (BPI) (Cleeland and Ryan *Ann. Acad. Med. Singap.* 23 (2): 129-38 (1994)).

La orientación para la determinación de la dosificación que suministra una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática se puede obtener de modelos animales de dolor inflamatorio tal como un modelo animal de dolor inflamatorio crónico (Wilson et al., *Eur J Pain.* 10(6):537-49 (2006)) y un modelo de dolor inflamatorio e hiperalgesia (Ren y Dubner, *ILAR J.* 40(3):111-118 (1999)).

Estenosis del conducto vertebral

La estenosis del conducto vertebral es una afección médica en la que el conducto vertebral estrecha y comprime la médula espinal y los nervios. Esto es normalmente debido a la común manifestación de la degeneración espinal que ocurre con el envejecimiento. También se puede causar algunas veces por hernia de disco espinal, osteoporosis o un tumor. La estenosis del conducto vertebral puede afectar la columna cervical, torácica o lumbar. En algunos casos, puede estar presentes en los tres sitios en el mismo paciente.

Los síntomas de la estenosis del conducto vertebral incluyen, por ejemplo, dolor o calambre en las piernas, dolor irradiado de espalda y cadera, dolor en el cuello y los hombros, pérdida de equilibrio y pérdida de la función o de la vejiga (síndrome de la cola de caballo).

Los tratamientos para la estenosis del conducto vertebral incluyen, por ejemplo, tratamientos no quirúrgicos (por ejemplo, terapia física, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) (por ejemplo, aspirina, ibuprofeno e indometacina), analgésicos (por ejemplo, acetaminofeno), sulfato de condroitina, glucosamina, reposo o actividad restringida, ortesis dorsal o corsé, inyecciones epidurales de esteroides (por ejemplo, corticosteroide)) y cirugía (por ejemplo, laminectomía descompresiva, laminectomía y fusión).

La divulgación proporciona métodos de tratamiento (por ejemplo, mejora, reducción o eliminación de uno o más síntomas de) de la estenosis del conducto vertebral administrando una proteína de unión a calicreína plasmática (por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática) a un sujeto que tiene o que se sospecha que tiene estenosis del conducto vertebral. Se proporcionan además métodos de tratamiento de la estenosis del conducto vertebral administrando una proteína de unión a calicreína plasmática (por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática) en combinación con una segunda terapia, por ejemplo, un tratamiento no quirúrgico (por ejemplo, terapia física y/o un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE) (por ejemplo, aspirina, ibuprofeno o indometacina), un analgésico (por ejemplo, acetaminofeno), sulfato de condroitina, glucosamina, reposo o actividad restringida, una ortesis dorsal o corsé, una inyección epidural de esteroides (por ejemplo, corticosteroide) y/o cirugía (por ejemplo, laminectomía descompresiva, laminectomía y/o fusión). La divulgación también proporciona métodos de prevención de la estenosis del conducto vertebral o un síntoma de la misma administrando una proteína de unión a calicreína plasmática (por ejemplo, una cantidad profilácticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática) a un sujeto en riesgo de desarrollar la estenosis del conducto vertebral (por ejemplo, un sujeto que tiene degeneración espinal).

La orientación para la determinación de la dosificación que suministra una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática se puede obtener de modelos animales de estenosis del conducto vertebral, tales como un modelo de estenosis lumbar del conducto vertebral (Sekiguchi et al., Spine 29, 1105-1111 (2004)).

Trombosis arterial y venosa

La trombosis arterial es la formación de un trombo dentro de una arteria. En la mayoría de los casos, la trombosis arterial sigue a ruptura del ateroma, y se denomina, por tanto, aterotrombosis.

La trombosis arterial está asociada con varios trastornos, que incluye accidente cerebrovascular e infarto de miocardio. En el accidente cerebrovascular trombótico, se forma un trombo (coágulo de sangre) normalmente alrededor de placas ateroscleróticas. Puesto que el bloqueo de la arteria es gradual, la aparición de accidentes cerebrovasculares trombóticos sintomáticos es más lenta. El accidente cerebrovascular trombótico se puede dividir en dos categorías - enfermedad de vasos grandes y enfermedad de vasos pequeños. La primera afecta vasos tales como las carótidas internas, vertebral y el polígono de Willis. La última puede afectar a vasos más pequeños tales como las ramificaciones del polígono de Willis. El infarto de miocardio (IM) se causa por un infarto (muerte de tejido debido a isquemia), frecuentemente debido a la obstrucción de la arteria coronaria por un trombo. El IM puede llegar rápidamente a ser mortal si no se recibe rápidamente tratamiento médico de urgencias.

La trombosis venosa es un coágulo de sangre que se forma dentro de una vena. Si se rompe un trozo de un coágulo de sangre formado en una vena, se puede transportar al lado derecho del corazón, y desde allí a los pulmones. Un trozo de trombo que es transportado de esta forma es una embolia y el proceso de formación de un trombo que llega a ser embólico se denomina una tromboembolia. Una embolia que se aloja en los pulmones es una embolia pulmonar (EP). Un émbolo pulmonar es una afección muy grave que puede ser mortal si no se reconoce y trata rápidamente.

Las trombosis venosas superficiales pueden causar molestia, pero generalmente no causa consecuencias graves, a diferencia de las trombosis venosas profundas (TVP) que se forman en las venas profundas de las piernas o en las venas pélvicas. Las embolias sistémicas de origen venoso pueden ocurrir en pacientes con un defecto septal auricular o ventricular, a través del cual puede pasar un émbolo al aparato articular. Dicho evento se llama embolia paradójica.

La prevención de trombosis arterial y/o venosa incluye medicaciones (por ejemplo, anticoagulantes (por ejemplo, heparina), aspirina y vitamina E) y métodos mecánicos (por ejemplo, bombas mecánicas para las piernas (medias de compresión neumática)).

La divulgación proporciona métodos de tratamiento (por ejemplo, mejora, reducción o eliminación de uno o más síntomas de) de la trombosis arterial y/o venosa administrando una proteína de unión a calicreína plasmática (por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática) a un sujeto que tiene o que se sospecha que tiene trombosis arterial y/o venosa. Se proporcionan además métodos de tratamiento de trombosis arterial y/o venosa administrando una proteína de unión a calicreína plasmática (por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática) en combinación con una segunda terapia, por ejemplo, un anticoagulante (por ejemplo, heparina), aspirina y/o vitamina E y/o un método mecánico (por ejemplo, una bomba mecánica para las piernas (medias de compresión neumática)). La divulgación

también proporciona métodos de prevención de la trombosis arterial y/o venosa o un síntoma de la misma administrando una proteína de unión a calicreína plasmática (por ejemplo, una cantidad profilácticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática) a un sujeto en riesgo de desarrollar trombosis arterial y/o venosa (por ejemplo, un sujeto que ha sufrido un accidente cerebrovascular o infarto de miocardio).

- 5 La orientación para la determinación de la dosificación que suministra una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática se puede obtener de modelos animales de trombosis arterial o venosa, tales como un modelo de trombosis arterial de doble inserción (Gomez-Jorge et al., J. Vasc. Inter. Rad. 9(4): 633-638 (1998), un modelo de trombosis venosa en rata con condiciones de flujo bajo en la corriente sanguínea venosa (Fredrich et al., Blood Coagul Fibrinolysis. 5(2):243-8 (1994)), y un modelo canino para trombosis venosa y embolia pulmonar espontánea (Frisbiel, Spinal Cord 43, 635-639 (2005)).

Íleo posoperatorio

El íleo posoperatorio es una parálisis temporal de una porción de los intestinos normalmente después de una cirugía abdominal. El íleo posoperatorio ocurre comúnmente durante 24 a 72 horas después de la cirugía abdominal.

- 15 Los síntomas de íleo posoperatorio incluyen, por ejemplo, molestia abdominal moderada y difusa, estreñimiento, distensión abdominal, náuseas o vómitos, falta de defecación y/o flatulencia, y eructos excesivos.

Los tratamientos para el íleo posoperatorio incluyen, por ejemplo, nil por os (NPO o "nada por la boca") hasta que el sonido peristáltico se oiga de la auscultación del área donde se encuentra esta porción, succión nasogástrica, alimentaciones parenterales y medicaciones (por ejemplo, lactulosa y eritromicina).

- 20 La divulgación proporciona métodos de tratamiento (por ejemplo, mejora, reducción o eliminación de uno o más síntomas de) de íleo posoperatorio administrando una proteína de unión a calicreína plasmática (por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática) a un sujeto que tiene o que se sospecha que tiene íleo posoperatorio. Se proporcionan además métodos de tratamiento de íleo posoperatorio administrando una proteína de unión a calicreína plasmática (por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática) en combinación con una segunda terapia, por ejemplo, nil por os, succión nasogástrica, alimentaciones parenterales y/o una medicación (por ejemplo, lactulosa y/o eritromicina). La divulgación también proporciona métodos de prevención del íleo posoperatorio o un síntoma del mismo administrando una proteína de unión a calicreína plasmática (por ejemplo, una cantidad profilácticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática) a un sujeto en riesgo de desarrollar íleo posoperatorio (por ejemplo, un sujeto que ha tenido cirugía abdominal).

- 30 La orientación para la determinación de la dosificación que suministra una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática se puede obtener de modelos animales de íleo posoperatorio, tales como un modelo para investigar íleo posoperatorio con transductores con extensómetro en ratas despiertas (Huge et al. J Surg Res. 74(2):112-8 (1998)).

Aneurisma aórtica

- 35 Una aneurisma aórtica es un término general para cualquier inflamación (dilatación o aneurisma) de la aorta, que normalmente representa una debilidad subyacente en la pared de la aorta en esa localización. Los tipos de aneurismas aórticos incluyen aneurisma de la raíz aórtica, aneurisma aórtica torácica, aneurisma aórtica abdominal y aneurisma aórtica toracoabdominal.

- 40 Las aneurismas aórticas más intactas no producen síntomas. A medida que se agrandan, los síntomas de la aneurisma aórtica incluyen, por ejemplo, ansiedad o sensación de estrés, náuseas o vómitos, piel sudorosa, frecuencia cardíaca rápida, dolor abdominal, se puede desarrollar dolor de espalda, dolor de las piernas o entumecimiento, eritema nodoso (lesiones en las piernas normalmente encontradas cerca de la región del tobillo), y una voz ronca a medida que se estira el nervio laríngeo recurrente izquierdo que serpentea alrededor del arco de la aorta. Una vez se rompe una aneurisma, puede causar dolor grave y una fuerte hemorragia interna, y es mortal en ausencia de tratamiento rápido.

- Los tratamientos para la aneurisma aórtica incluyen, por ejemplo, medicaciones, tratamiento quirúrgico y tratamiento endovascular. Las aneurismas más pequeñas que no están en alto riesgo de rotura se pueden tratar con fármacos para tratar la hipertensión arterial, tales como beta-bloqueantes; o doxiciclina para la inhibición de la metaloproteinas-9 de matriz. El tratamiento quirúrgico normalmente implica abrir la porción dilatada de la aorta y la inserción de un tubo de parche sintético (Dacron o Gore-tex). El tratamiento endovascular, como una alternativa mínimamente invasiva a la reparación de cirugía abierta, implica la colocación de una prótesis endovascular mediante una técnica percutánea (normalmente mediante las arterias femorales) en la porción enferma de la aorta.

- 55 La divulgación proporciona métodos de tratamiento (por ejemplo, estabilización, reducción o eliminación de uno o más síntomas de) de aneurisma aórtica administrando una proteína de unión a calicreína plasmática (por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática) a un sujeto que tiene o que se sospecha que tiene aneurisma aórtica. Se proporcionan además métodos de tratamiento de aneurisma aórtica

administrando una proteína de unión a calicreína plasmática (por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática) en combinación con una segunda terapia, por ejemplo, una medicación (por ejemplo, un fármaco para tratar hipertensión arterial (por ejemplo, un beta-bloqueante) o doxiciclina), cirugía y/o un tratamiento endovascular. La divulgación también proporciona métodos de prevención de la aneurisma aórtica o un síntoma de la misma administrando una proteína de unión a calicreína plasmática (por ejemplo, una cantidad profilácticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática) a un sujeto en riesgo de desarrollar aneurisma aórtica (por ejemplo, un sujeto que tiene hipertensión arterial).

La orientación para la determinación de la dosificación que suministra una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática se puede obtener de un modelo animal de aneurisma aórtica, por ejemplo, un modelo de rata de aneurisma aórtica abdominal usando una combinación de infusión intraluminal de elastasa y exposición extraluminal a cloruro de calcio (Tanaka et al. J Vasc Surg. 50(6):1423-32 (2009)).

Osteoartritis

La osteoartritis, también conocida como artritis degenerativa, se caracteriza por la rotura y pérdida eventual del cartílago de una o más articulaciones. La osteoartritis ocurre cuando el cartílago que amortigua los extremos de los huesos en las articulaciones se deteriora con el tiempo. La superficie lisa del cartílago se vuelve áspera, causando irritación. Si el cartílago se desgasta completamente, se dañarán los extremos de los huesos. La osteoartritis comúnmente afecta a las manos, pies, columna vertebral y articulaciones portadoras de gran peso, tales como las caderas y las rodillas.

Los síntomas de la osteoartritis incluyen, por ejemplo, dolor, dolor con la palpación, rigidez, pérdida de flexibilidad, sensación insoportable y espolones óseos.

Los tratamientos para la osteoartritis incluyen, por ejemplo, medidas conservativas (por ejemplo, reposo, reducción de peso, terapia física y ocupacional) y medicaciones (por ejemplo, acetaminofeno, cremas para el alivio del dolor aplicadas a la piel sobre las articulaciones (por ejemplo, capsaicina, salicina, salicilato de metilo y mentol), fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) (por ejemplo, aspirina, ibuprofeno, nabumetona y naproxeno) e inhibidores de Cox-2.

La divulgación proporciona métodos de tratamiento (por ejemplo, estabilización, reducción o eliminación de uno o más síntomas o estabilización de la puntuación del sujeto en una escala de osteoartritis) de la osteoartritis administrando una proteína de unión a calicreína plasmática (por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática) a un sujeto que tiene o que se sospecha que tiene osteoartritis. Se proporcionan además métodos de tratamiento de osteoartritis administrando una proteína de unión a calicreína plasmática (por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática) en combinación con una segunda terapia, por ejemplo, una medida conservativa (por ejemplo, reposo, reducción de peso, terapia física y/o ocupacional) y/o una medicación (por ejemplo, acetaminofeno, una crema tópica para el alivio del dolor, un AINE (por ejemplo, aspirina, ibuprofeno, nabumetona o naproxeno) y/o un inhibidor de Cox-2. La divulgación también proporciona métodos de prevención de la osteoartritis o un síntoma de la misma administrando una proteína de unión a calicreína plasmática (por ejemplo, una cantidad profilácticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática) a un sujeto en riesgo de desarrollar osteoartritis (por ejemplo, un sujeto que ha tenido una lesión articular).

Las escalas útiles para la evaluación de la osteoartritis incluyen, por ejemplo, la puntuación del resultado de lesión de rodilla y osteoartritis (KOOS; Roos et al. (1998) J. Orthop. Sports Phys. Ther. 28(2):88-96), el índice de osteoartritis de las Universidades de Ontario occidental y McMaster (WOMAC; Roos et al. (2003) Health Qual. Life Outcomes 1(1):17), y la escala general de salud del formulario corto de 36 puntos (SF-36 GHS), así como otras herramientas de evaluación conocidas en la técnica.

La orientación para la determinación de la dosificación que suministra una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática se puede obtener de un modelo animal de osteoartritis, por ejemplo, inyección de mono-yodoacetato (MIA) en la articulación femorotibial de roedores que promueve la pérdida de cartílago articular similar al observado en osteoartritis humana (Guzman et al. Toxicol Pathol. 31(6):619-24 (2003)), y corte transversal del ligamento cruzado anterior (ACL) en caninos para inducir osteoartritis (Fife y Brandt J Clin Invest. 84(5): 1432-1439 (1989)).

Vasculitis

La vasculitis se refiere a un grupo heterogéneo de trastornos que se caracteriza por destrucción inflamatoria de vasos sanguíneos. Se pueden afectar tanto las arterias como las venas. La linfangitis se considera algunas veces un tipo de vasculitis. La vasculitis es principalmente debida a la migración de leucocitos y el daño resultante. La vasculitis se puede clasificar por la causa subyacente, la localización de los vasos afectados, o el tipo o tamaño de los vasos sanguíneos. La vasculitis está asociada con varios trastornos y afecciones adicionales, por ejemplo, enfermedad de Kawasaki, enfermedad de Behçet, poliarteritis nodosa, granulomatosis de Wegener, crioglobulinemia, arteritis de Takayasu, síndrome de Churg-Strauss, arteritis de células gigantes (arteritis temporal), púrpura de Henoch-Schönlein, enfermedades reumáticas (por ejemplo, artritis reumatoide y lupus eritematoso

sistémico), cáncer (por ejemplo, linfomas), infecciones (por ejemplo, hepatitis C), exposición a productos químicos y fármacos (por ejemplo, anfetaminas, cocaína y vacunas anticarbuncosas que contienen el antígeno protector del carbunco como componente primario).

5 Los síntomas de la vasculitis incluyen, por ejemplo, fiebre, pérdida de peso, púrpura palpable, livedo reticular, mialgia o miositis, artralgia o artritis, mononeuritis múltiple, cefalea, accidente cerebrovascular, acúfenos, agudeza visual reducida, pérdida visual aguda, infarto de miocardio, hipertensión, gangrena, hemorragias nasales, tos con sangre, infiltrados pulmonares, dolor abdominal, heces con sangre, perforaciones y glomerulonefritis.

Los tratamientos para la vasculitis incluyen, por ejemplo, medicaciones relacionadas con cortisona (por ejemplo, prednisona) y fármacos inmunosupresores (por ejemplo, ciclofosfamida).

10 La divulgación proporciona métodos de tratamiento (por ejemplo, estabilización, reducción o eliminación de uno o más síntomas o estabilización de la puntuación del sujeto en una escala de vasculitis) de vasculitis administrando una proteína de unión a calicreína plasmática (por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática) a un sujeto que tiene o que se sospecha que tiene vasculitis. Se proporcionan además métodos de tratamiento de vasculitis administrando una proteína de unión a calicreína plasmática (por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática) en combinación con una segunda terapia (por ejemplo, una mediación relacionada con cortisona (por ejemplo, prednisona) y/o un fármaco inmunosupresor (por ejemplo, ciclofosfamida)). La divulgación también proporciona métodos de prevención de la vasculitis o un síntoma de la misma administrando una proteína de unión a calicreína plasmática (por ejemplo, una cantidad profilácticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática) a un sujeto en riesgo de desarrollar vasculitis (por ejemplo, un sujeto que ha tenido enfermedad de Kawasaki, enfermedad de Behçet, poliarteritis nodosa, granulomatosis de Wegener, crioglobulinemia o arteritis de Takayasu, etc.).

25 La divulgación también proporciona métodos de tratamiento (por ejemplo, estabilización, reducción o eliminación de uno o más síntomas o estabilización de la puntuación del sujeto en una escala de vasculitis) de vasculitis asociada con lupus eritematoso sistémico administrando una proteína de unión a calicreína plasmática (por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática) a un sujeto que tiene o que se sospecha que tiene vasculitis asociada con lupus eritematoso sistémico. Se proporcionan además métodos de tratamiento de la vasculitis asociada con lupus eritematoso sistémico administrando una proteína de unión a calicreína plasmática (por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática) en combinación con una segunda terapia, por ejemplo, una medicación relacionada con cortisona (por ejemplo, prednisona) y/o un fármaco inmunosupresor (por ejemplo, ciclofosfamida).

30 Se proporcionan además métodos de tratamiento (por ejemplo, mejora, estabilización o eliminación de uno o más síntomas) de un trastorno asociado a la vasculitis (enfermedad de Kawasaki, enfermedad de Behçet, poliarteritis nodosa, granulomatosis de Wegener, crioglobulinemia, arteritis de Takayasu, síndrome de Churg-Strauss, arteritis de células gigantes (arteritis temporal), púrpura de Henoch-Schönlein, enfermedades reumáticas (por ejemplo, artritis reumatoide y lupus eritematoso sistémico), cáncer (por ejemplo, linfomas), infecciones (por ejemplo, hepatitis C), exposición a productos químicos y fármacos (por ejemplo, anfetaminas, cocaína y vacunas anticarbuncosas que contienen el antígeno protector del carbunco como componente primario) administrando una proteína de unión a calicreína plasmática (por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática) a un sujeto que tiene o que se sospecha que tiene un trastorno asociado a la vasculitis. La divulgación también proporciona métodos de prevención de un trastorno asociado a la vasculitis o un síntoma del mismo administrando una proteína de unión a calicreína plasmática (por ejemplo, una cantidad profilácticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática) a un sujeto en riesgo de desarrollar un trastorno asociado a la vasculitis.

45 Las escalas útiles para la evaluación de la osteoartritis incluyen, por ejemplo, la puntuación de actividad de vasculitis de Birmingham (BVAS) versión 3 (Mukhtyar et al. Ann Rheum Dis. 68(12): 1827-32 (2009)), así como otras herramientas de evaluación conocidas en la técnica.

La orientación para la determinación de la dosificación que suministra una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática se puede obtener de un modelo animal de vasculitis, véanse, por ejemplo, aquellos descritos en Katz et al., Clin Rev Allergy Immunol. 35(1-2):11-8 (2008) y referencias citadas en su interior.

50 **Traumatismo craneoencefálico**

El traumatismo craneoencefálico se refiere a traumatismo a la cabeza, que puede o puede no incluir lesión al cerebro. Los tipos de traumatismo craneoencefálico incluyen conmoción, hematoma epidural, hematoma subdural, contusión cerebral y lesión axonal difusa.

55 Los síntomas del traumatismo craneoencefálico incluyen, por ejemplo, coma, confusión, somnolencia, cambio de personalidad, convulsiones, náuseas y vómitos, cefalea y un intervalo de lucidez, durante el que un paciente parece consciente solo para deteriorarse después, fuga de líquido cefalorraquídeo, deformidad o depresión visible en la cabeza o cara, un ojo que no se puede mover o se desvía hacia un lado puede indicar que un hueso facial roto está pellizcando un nervio que inerva los músculos del ojo, heridas o cardenales sobre el cuero cabelludo o la cara,

fracturas de la base del cráneo, una hemorragia subcutánea sobre el mastoide, hemotímpano, rinorrea y otorrea de líquido cefalorraquídeo .

Los tratamientos para el traumatismo craneoencefálico incluyen, por ejemplo, controlar la elevada presión intracraneal (por ejemplo, sedación, paralizantes, derivación de líquido cefalorraquídeo), craniectomía descompresiva, coma por barbitúricos, solución salina hipertónica e hipotermia.

La divulgación proporciona métodos de tratamiento (por ejemplo, estabilización, reducción o eliminación de uno o más síntomas o estabilización de la puntuación del sujeto en una escala de traumatismo craneoencefálico) de traumatismo craneoencefálico administrando una proteína de unión a calicreína plasmática (por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática) a un sujeto que tiene o que se sospecha que tiene traumatismo craneoencefálico. Se proporcionan además métodos de tratamiento de traumatismo craneoencefálico administrando una proteína de unión a calicreína plasmática (por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática) en combinación con una segunda terapia, por ejemplo, controlar la elevada presión intracraneal (por ejemplo, sedación, un paralizante y/o derivación de líquido cefalorraquídeo), craniectomía descompresiva, coma por barbitúricos, solución salina hipertónica y/o hipotermia. La divulgación también proporciona métodos de prevención del traumatismo craneoencefálico o un síntoma del mismo administrando una proteína de unión a calicreína plasmática (por ejemplo, una cantidad profilácticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática) a un sujeto en riesgo de desarrollar traumatismo craneoencefálico (por ejemplo, un sujeto que participará en una actividad peligrosa o deporte de contacto).

Las escalas útiles para evaluar traumatismo craneoencefálico y síntomas del traumatismo craneoencefálico incluyen, por ejemplo, la escala de coma de Glasgow (Teasdale y Jennett, Lancet 13;2(7872):81-4 (1974)), así como otras herramientas de evaluación conocidas en la técnica.

La orientación para la determinación de la dosificación que suministra una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática se puede obtener de modelos animales de traumatismo craneoencefálico, véanse, por ejemplo, los descritos en Cernak, NeuroRx. 2(3): 410-422 (2005) y referencias citadas en su interior.

Edema cerebral

El edema del cerebro (edema cerebral) es un exceso de acumulación de agua en los espacios intracelulares y/o extracelulares del cerebro. Los tipos de edema cerebral incluyen, por ejemplo, edema cerebral vasogénico, edema cerebral citotóxico, edema cerebral osmótico y edema cerebral intersticial.

El edema cerebral vasogénico es debido a una rotura de las estrechas uniones endoteliales que constituyen la barrera hematoencefálica (BHE). Esto permite normalmente que proteínas intravasculares excluidas y líquido penetren en el espacio extracelular del parénquima cerebral. Una vez los constituyentes del plasma cruzan la BHE, se extiende el edema; esto puede ser bastante rápido y generalizado. A medida que entra agua en la materia blanca, se mueve extracelularmente a lo largo de los fascículos y también puede afectar la materia gris. Este tipo de edema se observa en respuesta a traumatismo, tumores, inflamación focal, estadios tardíos de isquemia cerebral y encefalopatía hipertensiva. Algunos de los mecanismos que contribuyen a una disfunción de la BHE son: rotura física por hipertensión o traumatismo arterial, liberación facilitada por tumor de compuestos destructivos vasoactivos y endoteliales (por ejemplo, ácido araquidónico, neurotransmisores excitadores, eicosanoides, bradiquinina, histamina y radicales libres). Algunas de las subcategorías especiales del edema vasogénico incluyen: edema cerebral hidrostático, edema cerebral de cáncer cerebral, edema cerebral de las alturas.

El edema cerebral citotóxico es debido a la perturbación en el metabolismo celular dando como resultado el inadecuado funcionamiento de la bomba de sodio y potasio en la membrana celular de la glía. Como resultado existe, retención celular de sodio y agua. El edema citotóxico se observa con diversas intoxicaciones (dinitrofenol, trietilestano, hexaclorofeno, isoniazida), en síndrome de Reye, hipotermia grave, isquemia temprana, encefalopatía, accidente cerebrovascular temprano o hipoxia, paro cardíaco, seudotumor cerebral y toxinas cerebrales.

El edema cerebral osmótico ocurre cuando el plasma se diluye por el excesivo consumo de agua (o hiponatremia), síndrome de la secreción inapropiada de hormona antidiurética (SIADH), hemodiálisis, o la rápida reducción de la glucosa en sangre en el estado hiperglucémico hiperosmolar (HHS), con anterioridad acidosis no cetótica hiperosmolar (HONK) y la osmolalidad cerebral supera la osmolalidad en suero creando una presión anormal.

El edema cerebral intersticial ocurre en hidrocefalo obstructivo. Esta forma de edema es debida a la rotura de la barrera de líquido cefalorraquídeo cerebral (LCR)-cerebro dando como resultado flujo trans-ependimario de LCR, que permite que el LCR penetre en el cerebro y se extienda en el espacio extracelular de la materia blanca.

Los síntomas del edema cerebral (por ejemplo, edema cerebral peritumoral) incluyen, por ejemplo, cefalea, pérdida de coordinación (ataxia), debilidad y disminución de los niveles de conocimiento que incluyen desorientación, pérdida de memoria, alucinaciones, comportamiento psicótico y coma.

Los tratamientos para el edema cerebral (por ejemplo, edema cerebral peritumoral) incluyen, por ejemplo, medicaciones (por ejemplo, dexametasona, manitol, diuréticos) y descompresión quirúrgica.

La divulgación proporciona métodos de tratamiento (por ejemplo, estabilización, reducción o eliminación de uno o más síntomas de) de edema cerebral (por ejemplo, peritumoral edema cerebral) administrando una proteína de unión a calicreína plasmática (por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática) a un sujeto que tiene o que se sospecha que tiene edema cerebral (por ejemplo, edema cerebral peritumoral). Se proporcionan además métodos de tratamiento de edema cerebral (por ejemplo, edema cerebral peritumoral) administrando una proteína de unión a calicreína plasmática (por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática) en combinación con una segunda terapia, por ejemplo, una medicación (por ejemplo dexametasona, manitol y/o diuréticos) y/o descompresión quirúrgica. La divulgación también proporciona métodos de prevención del edema cerebral o un síntoma del mismo administrando una proteína de unión a calicreína plasmática (por ejemplo, una cantidad profilácticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática) a un sujeto en riesgo de desarrollar edema cerebral (por ejemplo, un sujeto al que se le ha diagnosticado un tumor cerebral).

La orientación para la determinación de la dosificación que suministra una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática se puede obtener de modelos animales de edema cerebral, por ejemplo, un modelo de rata de embolia cerebral en el que la recirculación se puede introducir en el área isquémica (Koizumi et al., Jpn J Stroke 8: 1-8 (1986)).

Septicemia

La septicemia es una afección médica grave que se caracteriza por un estado inflamatorio de cuerpo entero y la presencia de una infección conocida o presunta. Esta respuesta inmunológica se puede causar por microbios en la sangre, orina, pulmones, piel, u otros tejidos y puede conducir a activación generalizada de proteínas de fase aguda, que afectan el sistema del complemento y las vías de la coagulación, que entonces causan daño a la vasculatura, así como a los órganos. Los diferentes niveles de septicemia incluyen síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), septicemia (SIRS en respuesta a un proceso infeccioso confirmado), septicemia grave (septicemia con disfunción orgánica, hipoperfusión, o hipotensión) y choque séptico (septicemia con hipotensión arterial refractaria o anomalías de la hipoperfusión a pesar de rehidratación adecuada).

Los síntomas de la septicemia incluyen, por ejemplo, síntomas generales relacionados con la infección, inflamación aguda presente en todo el cuerpo, hipotermia o fiebre, taquicardia, taquipnea o hipocapnia debida a hiperventilación, leucopenia, leucocitosis, bandemia y disfunción orgánica (por ejemplo, pulmón, cerebro, hígado, riñón y/o corazón).

Los tratamientos para la septicemia incluyen, por ejemplo, antibióticos, fármacos vasopresores, insulina, corticosteroides, drotrecogina alfa, drenaje quirúrgico de acumulaciones de líquido infectado, sustitución de líquido y soporte apropiado para la disfunción orgánica (por ejemplo, hemodiálisis en insuficiencia renal, ventilación mecánica en disfunción pulmonar, transfusión de hemoderivados, y terapia con fármacos y líquidos para insuficiencia circulatoria). Se puede usar la terapia dirigida a objetivos tempranos (EGDT), un enfoque sistemático a la rehidratación, para tratar septicemia grave y choque séptico.

La divulgación proporciona métodos de tratamiento (por ejemplo, estabilización, reducción o eliminación de uno o más síntomas o estabilización de la puntuación del sujeto en una escala de septicemia) de la septicemia administrando una proteína de unión a calicreína plasmática (por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática) a un sujeto que tiene o que se sospecha que tiene septicemia. Se proporcionan además métodos de tratamiento de septicemia administrando una proteína de unión a calicreína plasmática (por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática) en combinación con una segunda terapia, por ejemplo, un antibiótico, un fármaco vasopresor, insulina, un corticosteroide, drotrecogina alfa, drenaje quirúrgico de acumulaciones de líquido infectado, sustitución de líquido, un soporte apropiado para la disfunción orgánica (por ejemplo, hemodiálisis en insuficiencia renal, ventilación mecánica en disfunción pulmonar, transfusión de hemoderivados y/o terapia con fármacos y líquidos para insuficiencia circulatoria) y/o terapia dirigida a objetivos tempranos (EGDT). La divulgación también proporciona métodos de prevención de la septicemia o un síntoma de la misma administrando una proteína de unión a calicreína plasmática (por ejemplo, una cantidad profilácticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática) a un sujeto en riesgo de desarrollar septicemia (por ejemplo, un sujeto al que se le ha diagnosticado una infección).

Las escalas útiles para evaluar la septicemia y los síntomas de la septicemia incluyen, por ejemplo, la escala de septicemia de Baltimore (Meek et al. *J Burn Care Rehabil.* 12(6):564-8 (1991)), así como otras herramientas de evaluación conocidas en la técnica.

La orientación para la determinación de la dosificación que suministra una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática se puede obtener de modelos animales de septicemia, véanse, por ejemplo, los descritos en la patente de EE. UU. N° 6.964.856, y Buras et al. *Nat Rev Drug Discov.* 4(10):854-65 (2005) y referencias citadas en su interior.

Evento isquémico agudo de la arteria cerebral media (ACM) (Accidente cerebrovascular)

Un evento isquémico agudo de la arteria cerebral media (ACM) (accidente cerebrovascular) es la pérdida que se desarrolla rápidamente de la(s) función(es) cerebral(es) debido a alteración en el riego sanguíneo al cerebro debido a isquemia (falta de suministro de glucosa y oxígeno) causada por trombosis (por ejemplo, trombosis venosa), embolia o hipoperfusión sistémica. Como resultado, el área del cerebro afectada es incapaz de funcionar, que conduce a incapacidad para mover una o más extremidades en un lado del cuerpo, incapacidad para entender o plantear una conversación, o incapacidad para ver un lado del campo visual. Un accidente cerebrovascular es una urgencia médica y puede causar daño neurológico permanente, complicaciones y/o muerte.

Los síntomas del evento isquémico agudo de la arteria cerebral media (ACM) (accidente cerebrovascular) incluyen, por ejemplo, hemiplejía, sensación reducida y debilidad muscular de la cara, entumecimiento, reducción en la sensación sensorial o vibratoria, olor, sabor, audición o visión alterados (total o parcial), caída del párpado (ptosis) y debilidad de los músculos oculares, disminución de los reflejos, problemas de equilibrio y nistagmo, alteración de la respiración y la frecuencia cardíaca, debilidad en el músculo esternocleidomastoideo con incapacidad para girar la cabeza hacia un lado, debilidad en la lengua (incapacidad para sacar y/o moverla de lado a lado), afasia, apraxia, defecto del campo visual, déficits de memoria, heminatención, pensamiento desorganizado, confusión, gestos hipersexuales, anosognosia, problemas para caminar, alteración de la coordinación del movimiento, y vértigo y/o desequilibrio.

El tratamiento para el evento isquémico agudo de la arteria cerebral media (ACM) (accidente cerebrovascular) incluye, por ejemplo, trombólisis (por ejemplo, activador tisular del plasminógeno (tPA)), trombectomía, angioplastia e implantación de prótesis endovascular, hipotermia terapéutica y medicaciones (por ejemplo, aspirina, clopidogrel y dipiridamol).

La divulgación proporciona métodos de tratamiento (por ejemplo, estabilización, reducción o eliminación de uno o más síntomas o estabilización de la puntuación del sujeto en una escala de accidente cerebrovascular) del evento isquémico agudo de la arteria cerebral media (ACM) (accidente cerebrovascular) administrando una proteína de unión a calicreína plasmática (por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática) a un sujeto que tiene o que se sospecha que tiene evento isquémico agudo de la arteria cerebral media (ACM) (accidente cerebrovascular). Se proporcionan además métodos de tratamiento de evento isquémico agudo de la arteria cerebral media (ACM) (accidente cerebrovascular) administrando una proteína de unión a calicreína plasmática (por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática) en combinación con una segunda terapia, por ejemplo, trombólisis (por ejemplo, activador tisular del plasminógeno (tPA)), trombectomía, angioplastia e implantación de prótesis endovascular, hipotermia terapéutica y/o una medicación (por ejemplo, aspirina, clopidogrel y dipiridamol). La divulgación también proporciona métodos de prevención del evento isquémico agudo de la arteria cerebral media (ACM) (accidente cerebrovascular) o un síntoma del mismo administrando una proteína de unión a calicreína plasmática (por ejemplo, una cantidad profilácticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática) a un sujeto en riesgo de desarrollar evento isquémico agudo de la arteria cerebral media (ACM) (accidente cerebrovascular) (por ejemplo, un sujeto que ha sufrido hipoperfusión sistémica).

Las escalas útiles para evaluar el evento isquémico agudo de la arteria cerebral media (ACM) (accidente cerebrovascular) y los síntomas del evento isquémico agudo de la arteria cerebral media (ACM) (accidente cerebrovascular) incluyen, por ejemplo, la clasificación del proyecto de accidente cerebrovascular de la comunidad de Oxford (OCSP, también conocidos como la clasificación de Bamford u Oxford) (Bamford et al., *Lancet* 337 (8756): 1521-6 (1991)), y TOAST (Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment) (Adams et al., *Stroke* 24 (1): 35-41 (1993)).

La orientación para la determinación de la dosificación que suministra una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática se puede obtener de modelos animales de evento isquémico agudo de la arteria cerebral media (ACM) (accidente cerebrovascular), véanse, por ejemplo, los descritos en Beech et al., *Brain Res* 895: 18-24 (2001), Buchan et al., *Stroke* 23 (2): 273-9 (1992), Carmichael, *NeuroRx* 2: 396-409 (2005), Chen et al., *Stroke* 17 (4): 738-43 (1986), Dittmar et al., *Stroke* 34: 2252-7 (2003), Dittmar et al., *J Neurosci Methods* 156: 50 (2006), Gerriets et al., *J Neurosci Methods* 122: 201-11 (2003), Gerriets et al., *Stroke* 35: 2372-2377 (2004), Graham et al., *Comp Med* 54: 486-496 (2004), Koizumi et al., *Jpn J Stroke* 8: 1-8 (2004), Longa et al., *Stroke* 20 (1): 84-91 (1989), Mayzel-Oreg, *Magn Reson Med* 51: 1232-8 (2004), Schmid-Elsaesser et al., *Stroke* 29 (10): 2162-70 (1989), Tamura et al., *J Cereb Blood Flow Metab* 1: 53-60 (1981), Watson et al., *Ann Neurol* 17: 497-504 (1985) y Zhang et al., *J Cereb Blood Flow Metab* 17: 123-35 (1997).

Reestenosis

La reestenosis es la remanifestación de la estenosis, un estrechamiento de un vaso sanguíneo, que conduce a circulación sanguínea restringida. La reestenosis normalmente se refiere a una arteria u otro vaso sanguíneo grande que se ha estrechado, recibido tratamiento para limpiar el bloqueo tal como angioplastia, y posteriormente se ha vuelto a reestrechar. Se puede definir como una reducción en la circunferencia de la luz de 50 % o más, y tuvo una alta tasa de incidencia (25-50 %) en pacientes que se habían sometido a angioplastia con globo, necesitando la mayoría de los pacientes angioplastia adicional en el plazo de 6 meses.

Los tratamientos para la reestenosis incluyen, por ejemplo, angioplastia adicional si la reestenosis ocurre sin una prótesis endovascular o en cualquier extremo de una prótesis endovascular, angioplastia repetida e inserción de otra prótesis endovascular dentro de la original si la reestenosis ocurre dentro de una prótesis endovascular, prótesis endovasculares que eluyen fármaco, braquiterapia y radiación intracoronaria.

- 5 La divulgación proporciona métodos de tratamiento (por ejemplo, estabilización, reducción o eliminación de uno o más síntomas de) de reestenosis (por ejemplo, después de angioplastia) administrando una proteína de unión a calicreína plasmática (por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática) a un sujeto que tiene o que se sospecha que tiene reestenosis (por ejemplo, después de angioplastia). Se proporcionan además métodos de tratamiento de reestenosis (por ejemplo, después de angioplastia)
- 10 administrando una proteína de unión a calicreína plasmática (por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática) en combinación con una segunda terapia, por ejemplo, angioplastia si la reestenosis ocurre sin una prótesis endovascular o en cualquier extremo de una prótesis endovascular, angioplastia repetida e inserción de otra prótesis endovascular dentro de la original si la reestenosis ocurre dentro de una prótesis endovascular, una prótesis endovascular eluye fármaco, braquiterapia y/o radiación intracoronaria. La divulgación también proporciona métodos de prevención de la reestenosis o un síntoma de la misma administrando
- 15 una proteína de unión a calicreína plasmática (por ejemplo, una cantidad profilácticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática) a un sujeto en riesgo de desarrollar reestenosis (por ejemplo, un sujeto que ha tenido estenosis).

- 20 La orientación para la determinación de la dosificación que suministra una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática se puede obtener de modelos animales de reestenosis, véanse, por ejemplo, los descritos en las patentes de EE. UU. N° 5.304.122 y 6.034.053, y Kantor et al., Cardiovasc Radiat Med. 1(1):48-54 (1999), y referencias citadas en su interior.

Nefritis por lupus eritematoso sistémico

- 25 La nefritis por lupus eritematoso sistémico es una inflamación del riñón causada por lupus eritematoso sistémico (LES), una enfermedad autoinmunitaria crónica de tejido conjuntivo. El LES se puede asociar a vasculitis que son trastornos caracterizados por la destrucción inflamatoria de los vasos sanguíneos.

Los síntomas de la nefritis por lupus eritematoso sistémico incluyen, por ejemplo, síntomas generales de enfermedad renal, aumento de peso, hipertensión arterial, orina espumosa más oscura e inflamación alrededor de los ojos, piernas, tobillos o dedos.

- 30 Los tratamientos para la nefritis por lupus eritematoso sistémico incluyen, por ejemplo, terapia con esteroides (por ejemplo, corticosteroides), quimioterapia (por ejemplo, ciclofosfamida, azatioprina, micofenolato mofetilo, o ciclosporina) y agentes inmunosupresores (por ejemplo, micofenolato mofetilo y ciclofosfamida intravenosa).

- La divulgación proporciona métodos de tratamiento (por ejemplo, estabilización, reducción o eliminación de uno o más síntomas o estabilización de la puntuación del sujeto en una escala de lupus) de la nefritis por lupus eritematoso sistémico administrando una proteína de unión a calicreína plasmática (por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática) a un sujeto que tiene o que se sospecha que tiene nefritis por lupus eritematoso sistémico. Se proporcionan además métodos de tratamiento de nefritis por lupus eritematoso sistémico administrando una proteína de unión a calicreína plasmática (por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática) en combinación con una segunda terapia,
- 35 por ejemplo, terapia con esteroides (por ejemplo, un corticosteroide), quimioterapia (por ejemplo, ciclofosfamida, azatioprina, micofenolato mofetilo y/o ciclosporina) y/o un agente inmunosupresor (por ejemplo, micofenolato mofetilo y/o ciclofosfamida intravenosa). La divulgación también proporciona métodos de prevención de la nefritis por lupus eritematoso sistémico o un síntoma de la misma administrando una proteína de unión a calicreína plasmática (por ejemplo, una cantidad profilácticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática) a un sujeto en
- 40 riesgo de desarrollar nefritis por lupus eritematoso sistémico (por ejemplo, un sujeto al que se le ha diagnosticado lupus o un sujeto que tiene un miembro de su familia con lupus o una predisposición genética al mismo).
- 45

- Las escalas útiles para evaluar la nefritis por lupus eritematoso sistémico y los síntomas de la nefritis por lupus eritematoso sistémico incluyen, por ejemplo, la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) basada en la biopsia (Weening et al., J. Am. Soc. Nephrol. 15 (2): 241-50 (2004)), así como otras herramientas de
- 50 evaluación conocidas en la técnica.

La orientación para la determinación de la dosificación que suministra una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática se puede obtener de modelos animales de nefritis por lupus eritematoso sistémico, véanse, por ejemplo, los descritos en la patente de EE. UU. N° 7.26.5261, Peng, Methods Mol Med. 102:227-72 (2004), y referencias citadas en su interior.

- 55 **Lesión por quemadura y cicatrización**

Una lesión por quemadura es un tipo de lesión que se puede causar por calor, electricidad, productos químicos, luz, radiación o fricción. Se pueden dañar músculo, hueso, vaso sanguíneo, tejido dérmico y epidérmico con dolor

posterior debido a una profunda lesión a los nervios. Dependiendo de la localización afectada y el grado de gravedad, una víctima de una quemadura puede experimentar un amplio número de complicaciones posiblemente mortales que incluyen choque, infección, desequilibrio de electrolitos y disnea. En las lesiones por quemadura, el daño a la epidermis y los elementos dérmicos es el resultado de varios ataques clave que se pueden dividir en ataques iniciales (por ejemplo, lesión por calor, lesión inflamatoria por mediadores, lesión inducida por isquemia) y diferidos. El exceso de calor causa la rápida desnaturalización de las proteínas y daño célula. Gran parte del daño al tejido, por ejemplo, en la quemadura de subsuperficie perfundida, se puede causar por mediadores tóxicos de la inflamación (por ejemplo, oxidantes y/o proteasas) que se activan con la quemadura. El consumo de oxígeno de la herida por los neutrófilos puede conducir a hipoxia de tejido. Ocurre trombosis vascular superficial instantánea junto con muerte celular del ataque por calor y causa isquemia y además daño de tejido. La lesión diferida después del daño inicial por calor y por mediadores incluye, por ejemplo, inflamación causada por tejido neurótico, bacterias sobre la superficie, agentes tópicos caústicos y exudado superficial; y daño continuado a células viables y nuevo crecimiento de tejido por exceso de actividad proteolítica de la herida y la liberación de oxidantes.

Los tratamientos de la lesión por quemadura incluyen, por ejemplo, líquidos intravenosos, apósitos, abordaje del dolor (por ejemplo, analgésicos (por ejemplo, ibuprofeno y acetaminofeno), narcóticos y anestésicos locales), inhibidores de los mediadores inflamatorios, y antibióticos.

La divulgación proporciona métodos de tratamiento (por ejemplo, estabilización, reducción o eliminación de uno o más síntomas o estabilización de la puntuación del sujeto en una escala de quemadura) de una lesión por quemadura y/o promoción de la cicatrización administrando una proteína de unión a calicreína plasmática (por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática) a un sujeto que tiene o que se sospecha que tiene una lesión por quemadura. Se proporcionan además métodos de tratamiento de una lesión por quemadura administrando una proteína de unión a calicreína plasmática (por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática) en combinación con una segunda terapia, por ejemplo, líquido intravenoso, un apósito, abordaje del dolor (por ejemplo, un analgésico (por ejemplo, ibuprofeno y acetaminofeno), un narcótico y un anestésico local), un inhibidor de los mediadores inflamatorios y un antibiótico. La divulgación también proporciona métodos de prevención de las lesiones por quemadura o un síntoma de las mismas administrando una proteína de unión a calicreína plasmática (por ejemplo, una cantidad profilácticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática) a un sujeto en riesgo de desarrollar lesiones por quemadura (por ejemplo, un sujeto cuya ocupación crea un riesgo de una lesión por quemadura, por ejemplo, bombero o cocinero).

Las escalas útiles para evaluar las quemaduras y los síntomas de las quemaduras incluyen, por ejemplo, escalas de quemaduras por grados, por espesor y por área superficial del cuerpo total (TBSA) (Meek et al. *J Burn Care Rehabil.* 12(6):564-8 (1991)), así como otras herramientas de evaluación conocidas en la técnica.

La orientación para la determinación de la dosificación que suministra una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión a calicreína plasmática se puede obtener de modelos animales de quemadura, tales como un modelo de quemadura porcina (Singer y McClain, *Methods Mol Med.* 78:107-19 (2003)), una modelo de oveja de lesión térmica (Jonkam et al., *Shock*, 28:704-709 (2007)), un modelo de conejo de lesión térmica (Nwariaku et al., *Burns*, 22:324-327 (1996)) y un modelo de ratón de herida por quemadura (Stevenson et al., *Methods Mol Med.* 78:95-105 (2003)).

Terapias de combinación

Se puede administrar una proteína de unión a calicreína plasmática descrita en el presente documento, por ejemplo, un anticuerpo contra anticalicreína plasmática, por ejemplo, un Fab o IgG anti-calicreína plasmática, en combinación con una o más de las otras terapias para tratar una enfermedad o afección asociada a una actividad de calicreína plasmática, por ejemplo, una enfermedad o afección descrita en el presente documento. Por ejemplo, una proteína de unión a calicreína plasmática se puede usar terapéutica o profilácticamente con cirugía, otro Fab o IgG anti-calicreína plasmática (por ejemplo, otro Fab o IgG descrita en el presente documento), otro inhibidor de calicreína plasmática, un inhibidor de péptido, o inhibidor de molécula pequeña. Ejemplos de inhibidores de calicreína plasmática que se pueden usar en la terapia de combinación con una proteína de unión a calicreína plasmática descrita en el presente documento incluyen los inhibidores de calicreína plasmática descritos en, por ejemplo, los documentos WO 95/21601 o WO 2003/103475.

Se pueden usar uno o más inhibidores de calicreína plasmática en combinación con una o más proteínas de unión a calicreína plasmática descritas en el presente documento. Por ejemplo, la combinación puede dar como resultado una dosis más baja del inhibidor que se necesita, de forma que se reduzcan los efectos secundarios.

Se puede administrar una proteína de unión a calicreína plasmática descrita en el presente documento en combinación con una o más terapias actuales para tratar una enfermedad o afección asociada a calicreína plasmática, que incluyen, pero no se limitan a, las actuales terapias para tratar el trastorno, por ejemplo, una terapia actual para artritis reumatoide, gota, enfermedad intestinal, mucositis oral, dolor neuropático, dolor inflamatorio, enfermedad espinal degenerativa con estenosis del conducto vertebral, trombosis arterial o venosa, íleo posoperatorio, aneurisma aórtica, osteoartritis, vasculitis, traumatismo craneoencefálico o edema cerebral

peritumoral, septicemia, evento isquémico agudo de la arteria cerebral media (ACM) (accidente cerebrovascular), reestenosis (por ejemplo, después de angioplastia), nefritis por lupus eritematoso sistémico, lesión por quemadura, o cicatrización. Por ejemplo, la inhibición de pCal es un novedoso mecanismo para tratar la enfermedad y, por tanto, podría proporcionar efectos que son sinérgicos o aditivos con otros agentes terapéuticos. Por ejemplo, una proteína descrita en el presente documento que inhibe la calicreína plasmática o que inhibe un evento aguas abajo de la actividad de calicreína plasmática también se puede usar en combinación con otro tratamiento para una enfermedad asociada a calicreína plasmática, tal como cirugía o administración de un segundo agente, por ejemplo, como se describe en el presente documento. Por ejemplo, el segundo agente puede incluir ecaltantide, un inhibidor de C1 esterasa (por ejemplo, CINRYZE™), aprotinina (TRASYLOL®), un inhibidor del receptor de bradiquinina B2 (por ejemplo, icatibant (FIRAZYR®)).

El término "combinación" se refiere al uso de los dos o más agentes o terapias para tratar al mismo paciente, en el que el uso o la acción de los agentes o terapias se solapan en el tiempo. Los agentes o terapias se pueden administrar al mismo tiempo (por ejemplo, como una única formulación que se administra a un paciente o como dos formulaciones separadas administradas simultáneamente) o secuencialmente en cualquier orden. Las administraciones secuenciales son administraciones que se administran en tiempos diferentes. El tiempo entre la administración de un agente y otro agente puede ser minutos, horas, días o semanas. El uso de una proteína de unión a calicreína plasmática descrita en el presente documento también se puede usar para reducir la dosificación de otra terapia, por ejemplo, para reducir los efectos secundarios asociados a otro agente que se administra. Por consiguiente, una combinación puede incluir administrar un segundo agente a una dosificación al menos 10, 20, 30 o 50 % más baja que la que se usaría en ausencia de la proteína de unión a calicreína plasmática.

El segundo agente o terapia también puede ser otro agente para una terapia asociada a calicreína plasmática. Ejemplos no limitantes de otro tratamiento para una enfermedad o afección asociada a calicreína plasmática incluyen, por ejemplo, ecaltantide, un inhibidor de C1 esterasa (por ejemplo, CINRYZE™), aprotinina (TRASYLOL®), un inhibidor del receptor de bradiquinina B2 (por ejemplo, icatibant (FIRAZYR®)) o una segunda proteína de unión descrita en el presente documento.

Una terapia de combinación puede incluir administrar un agente que reduce los efectos secundarios de otras terapias. El agente puede ser un agente que reduce los efectos secundarios de un tratamiento de enfermedad asociada a calicreína plasmática. Por ejemplo, para enfermedades inflamatorias, un inhibidor de pCal podría ser el ahorro de esteroides. Por tanto, podría haber sinergia con un inhibidor de TNF-alfa para tratar inflamación o un bloqueante de VEGF para tratar cáncer y/o angiogénesis.

Usos de diagnóstico

Una proteína que se une a calicreína plasmática descrita en el presente documento puede tener utilidades de diagnóstico *in vitro* e *in vivo*. Se puede usar una proteína de unión a calicreína plasmática descrita en el presente documento (por ejemplo, una proteína que se une o se une e inhibe calicreína plasmática), por ejemplo, para la obtención de imágenes *in vivo*, por ejemplo, durante el transcurso de un tratamiento para una enfermedad o afección en la que la calicreína plasmática es activa, por ejemplo, una enfermedad o afección descrita en el presente documento, o en el diagnóstico de una enfermedad o afección descrita en el presente documento.

En un aspecto, la divulgación proporciona un método de diagnóstico para la detección de la presencia de calicreína plasmática, *in vitro* o *in vivo* (por ejemplo, obtención de imágenes *in vivo* en un sujeto). El método puede incluir localizar calicreína plasmática dentro de un sujeto o dentro de una muestra de un sujeto. Con respecto a la evaluación de muestras, el método puede incluir, por ejemplo: (i) poner en contacto una muestra con proteína de unión a calicreína plasmática; y (ii) detectar la localización de la proteína de unión a calicreína plasmática en la muestra.

También se puede usar una proteína de unión a calicreína plasmática para determinar el nivel cualitativo o cuantitativo de expresión de calicreína plasmática en una muestra. El método también puede incluir poner en contacto una muestra de referencia (por ejemplo, una muestra de control, por ejemplo, un control negativo) con la proteína de unión, y determinar una evaluación correspondiente de la muestra de referencia. Una diferencia (por ejemplo, aumento), por ejemplo, una diferencia estadísticamente significativa, en la formación del complejo en la muestra o sujeto con respecto a la muestra de control o sujeto puede ser indicativa de la presencia de calicreína plasmática en la muestra. En ocasiones, la proteína de unión a calicreína plasmática no reacciona de forma cruzada con otra proteína de calicreína, tal como calicreína de tejido y/o con precalicreína plasmática. Por ejemplo, la proteína de unión se une a otra proteína de calicreína o a precalicreína 5 a 10 veces menos bien (o incluso menos bien) que se une a calicreína plasmática. Por ejemplo, la proteína de unión puede unirse a calicreína plasmática con una KD de ~10-50 pM, mientras que se une a calicreína de tejido y/o precalicreína a ~10 nM.

La proteína de unión a calicreína plasmática se puede marcar directa o indirectamente con una sustancia detectable para facilitar la detección del anticuerpo unido o sin unir. Las sustancias detectables adecuadas incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes y materiales radiactivos.

Se puede detectar la formación de complejos entre la proteína de unión a calicreína plasmática y la calicreína plasmática evaluando la proteína de unión unida a la calicreína plasmática o la proteína de unión no unida. Se pueden usar ensayos de detección convencionales, por ejemplo, un ensayo de inmunoadsorción (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA) o inmunohistoquímica de tejido. Además de marcar la proteína de unión a calicreína plasmática, la presencia de calicreína plasmática se puede ensayar en una muestra por un inmunoensayo de competición que utiliza patrones marcados con una sustancia detectable y una proteína de unión a calicreína plasmática no marcada. En un ejemplo de este ensayo, se combinan la muestra biológica, los patrones marcados y la proteína de unión a calicreína plasmática y se determina la cantidad de patrón marcado unido a la proteína de unión no marcada. La cantidad de calicreína plasmática en la muestra es inversamente proporcional a la cantidad de patrón marcado unido a la proteína de unión a calicreína plasmática.

Se pueden preparar proteínas marcadas con fluoróforos y cromóforos. Debido a que los anticuerpos y otras proteínas absorben luz que tiene longitudes de onda de hasta aproximadamente 310 nm, se deben seleccionar restos fluorescentes que tengan absorción sustancial a longitudes de onda superiores a 310 nm y preferentemente superiores a 400 nm. Se describen una variedad de agentes fluorescentes y cromóforos adecuados por Stryer, 1968, Science 162:526 y Brand, L. et al., 1972, Annu. Rev. Biochem. 41:843-868. Las proteínas se pueden marcar con grupos cromóforos fluorescentes mediante procedimientos convencionales, tales como los desvelados en las patentes de EE. UU. Nº 3.940.475, 4.289.747 y 4.376.110. Un grupo de agentes fluorescentes que tiene varias de las propiedades deseables descritas anteriormente es los colorantes de xanteno, que incluyen las fluoresceínas y las rodaminas. Otro grupo de compuestos fluorescentes son las naftilaminas. Una vez marcada con un fluoróforo o cromóforo, la proteína se puede usar para detectar la presencia o localización de la calicreína plasmática en una muestra, por ejemplo, usando microscopía fluorescente (tal como microscopía confocal o con deconvolución).

Análisis histológico. Se puede realizar inmunohistoquímica usando las proteínas descritas en el presente documento. Por ejemplo, en el caso de un anticuerpo, el anticuerpo se puede sintetizar con una marca (tal como una marca de purificación o de epítipo), o se puede marcar detectablemente, por ejemplo, conjugando una marca o grupo de unión a marca. Por ejemplo, se puede unir un quelante al anticuerpo. El anticuerpo se pone entonces en contacto con su preparación histológica, por ejemplo, una sección fijada de tejido que está sobre un portaobjetos de microscopio. Después de una incubación para la unión, la preparación se lava para retirar el anticuerpo sin unir. Entonces se analiza la preparación, por ejemplo, usando microscopía, para identificar si el anticuerpo se une o no a la preparación.

Por supuesto, el anticuerpo (u otro polipéptido o péptido) puede estar sin marcar en el momento de la unión. Después de la unión y el lavado, el anticuerpo se marca con el fin de hacerlo detectable.

Matrices de proteína. La proteína de unión a calicreína plasmática también se puede inmovilizar sobre una matriz de proteína. La matriz de proteína se puede usar como una herramienta de diagnóstico, por ejemplo, para cribar muestras médicas (tales como células aisladas, sangre, sueros, biopsias, y similares). Por supuesto, la matriz de proteína también puede incluir otras proteínas de unión, por ejemplo, que se une a calicreína plasmática o a otras moléculas diana.

Los métodos de producción de matrices de polipéptidos se describen, por ejemplo, en De Wildt et al., 2000, Nat. Biotechnol. 18:989-994; Lueking et al., 1999, Anal. Biochem. 270:103-111; Ge, 2000, Nucleic Acids Res. 28, e3, I-VII; MacBeath y Schreiber, 2000, Science 289:1760-1763; documentos WO 01/40803 y WO 99/51773A1. Los polipéptidos para la matriz pueden ser aplicados a alta velocidad, por ejemplo, usando aparatos robóticos comercialmente disponibles, por ejemplo, de Genetic Microsystems o BioRobotics. El sustrato de la matriz puede ser, por ejemplo, nitrocelulosa, plástico, vidrio, por ejemplo, vidrio modificado en la superficie. La matriz también puede incluir una matriz porosa, por ejemplo, acrilamida, agarosa, u otro polímero.

Por ejemplo, la matriz puede ser una matriz de anticuerpos, por ejemplo, como se describe en De Wildt, arriba. Las células que producen las proteínas se pueden cultivar sobre un filtro en un formato de matriz. Se induce la producción de polipéptidos, y los polipéptidos expresados se inmovilizan en el filtro en la localización de la célula. Se puede poner en contacto una matriz de proteínas con una diana marcada para determinar el grado de unión de la diana a cada polipéptido inmovilizado. La información sobre el grado de unión en cada dirección de la matriz se puede almacenar como un perfil, por ejemplo, en una base de datos informática. La matriz de proteína se puede producir por duplicado y usar para la comparación de perfiles de unión, por ejemplo, de una diana y una no diana.

FACS (Citometría de flujo activada por fluorescencia). Se puede usar la proteína de unión a calicreína plasmática para marcar células, por ejemplo, células en una muestra (por ejemplo, una muestra de paciente). La proteína de unión también se une (o se puede unir) a un compuesto fluorescente. Entonces, las células se pueden clasificar usando citometría activada por fluorescencia (por ejemplo, usando un citómetro disponible de Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose CA; véanse también las patentes de EE. UU. Nº 5.627.037; 5.030.002; y 5.137.809). A medida que las células pasan a través del citómetro, un haz de láser excita el compuesto fluorescente mientras que un detector cuenta las células que pasan a través y determina si un compuesto fluorescente está unido o no a la célula detectando la fluorescencia. Se puede cuantificar y analizar la cantidad de marca unida a cada célula para caracterizar la muestra.

El citómetro también puede desviar la célula y separar células unidas por la proteína de unión de las células no unidas por la proteína de unión. Se pueden cultivar y/o caracterizar las células separadas.

Obtención de imágenes *in vivo*. También se caracteriza un método de detección de la presencia de calicreína plasmática que expresa tejidos *in vivo*. El método incluye (i) administrar a un sujeto (por ejemplo, un paciente que tiene, por ejemplo, una enfermedad o afección asociada a calicreína plasmática) un anticuerpo anti-calicreína plasmática, conjugado con un marcador detectable; (ii) exponer el sujeto a un medio para detectar dicho marcador detectable a la calicreína plasmática que expresa tejidos o células. Por ejemplo, se obtienen imágenes del sujeto, por ejemplo, por RMN u otros medios tomográficos.

Los ejemplos de marcas útiles para la obtención de imágenes de diagnóstico incluyen radiomarcas tales como ^{131}I , ^{111}In , ^{123}I , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{32}P , ^{125}I , ^3H , ^{14}C y ^{188}Rh , marcas fluorescentes tales como fluoresceína y rodamina, marcas activas de resonancia magnética nuclear, isótopos emisores de positrones detectables por un equipo de tomografía de emisión de positrones ("PET"), agentes quimioluminiscentes tales como luciferina, y marcadores enzimáticos tales como peroxidasa o fosfatasa. También se pueden emplear los emisores de radiación de intervalo corto, tales como los isótopos detectables por sondas de detector de intervalo corto. La proteína se puede marcar con dichos reactivos; por ejemplo, véase Wensel and Meares, 1983, *Radioimmunoimaging and Radioimmunotherapy*, Elsevier, New York, para técnicas referentes al radiomarcado de anticuerpos y D. Colcher et al., 1986, *Meth. Enzymol.* 121: 802-816.

La proteína de unión se puede marcar con un isótopo radiactivo (tal como ^{14}C , ^3H , ^{35}S , ^{125}I , ^{32}P , ^{131}I). Se puede usar una proteína de unión radiomarcada para pruebas de diagnóstico, por ejemplo, un ensayo *in vitro*. La actividad específica de una proteína de unión isotópicamente marcada depende de la semivida, la pureza isotópica de la marca radiactiva, y cómo la marca se incorpora en el anticuerpo.

En el caso de una proteína de unión radiomarcada, la proteína de unión se administra al paciente, se localiza en las células que llevan el antígeno con el que reacciona la proteína de unión, y se detecta o "se obtienen imágenes" *in vivo* usando técnicas conocidas tales como escaneo radionuclear usando, por ejemplo, una gammacámara o tomografía de emisión. Véase, por ejemplo, A.R. Bradwell et al., "Developments in Antibody Imaging", *Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy*, R.W. Baldwin et al., (eds.), pp 65 85 (Academic Press 1985). Alternativamente, se puede usar un escáner de tomografía transaxial de emisión de positrones, tal como el designado Pet VI localizado en el Laboratorio Nacional de Brookhaven, donde la radiomarca emite positrones (por ejemplo, ^{11}C , ^{18}F , ^{15}O y ^{13}N).

Agentes de contraste de IRM. La imagen por resonancia magnética (IRM) usa RMN para visualizar características internas del sujeto vivo, y es útil para el pronóstico, diagnóstico, tratamiento y cirugía. Se puede usar IRM sin compuestos trazadores radiactivos por el obvio beneficio. Algunas técnicas de IRM se resumen en el documento EPA-0 502 814. Generalmente, se usan las diferencias relacionadas con las constantes del tiempo de relajación T1 y T2 de los protones de agua en diferentes entornos para generar una imagen. Sin embargo, estas diferencias pueden ser insuficientes para proporcionar imágenes nítidas de alta resolución.

Las diferencias en estas constantes del tiempo de relajación se pueden potenciar por agentes de contraste. Los ejemplos de dichos agentes de contraste incluyen varios agentes magnéticos, agentes paramagnéticos (que principalmente alteran T1) y ferromagnéticos o superparamagnéticos (que principalmente alteran la respuesta T2). Se pueden usar quelatos (por ejemplo, quelatos de EDTA, DTPA y NTA) para unir (y reducir la toxicidad) de algunas sustancias paramagnéticas (por ejemplo, Fe^{+3} , Mn^{+2} , Gd^{+3}). Otros agentes pueden estar en forma de partículas, por ejemplo, menos de 10 mm a aproximadamente 10 nM de diámetro). Las partículas pueden tener propiedades ferromagnéticas, antiferromagnéticas o superparamagnéticas. Las partículas pueden incluir, por ejemplo, magnetita (Fe_3O_4), $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, ferritas, y otros compuestos minerales magnéticos de elementos de transición. Las partículas magnéticas pueden incluir: uno o más cristales magnéticos con y sin material no magnético. El material no magnético puede incluir polímeros sintéticos o naturales (tales como Sepharose, dextrano, dextrina, almidón y similares).

La proteína de unión a calicreína plasmática también se puede marcar con un grupo indicador que contiene el átomo de ^{19}F activo para RMN, o una pluralidad de dichos átomos en la medida en que (i) sustancialmente todos los átomos de flúor naturalmente abundantes sean el isótopo de ^{19}F y, así, sustancialmente todos los compuestos que contienen flúor sean activos para RMN; (ii) muchos compuestos polifluorados químicamente activos tales como anhídrido trifluoroacético están comercialmente disponibles a coste relativamente bajo; y (iii) se han encontrado médicamente aceptables muchos compuestos fluorados para su uso en seres humanos tales como los poliéteres perfluorados utilizados para llevar oxígeno como sustituciones de hemoglobina. Después de dejar dicho tiempo para la incubación, se lleva a cabo una IRM de cuerpo entero usando un aparato tal como uno de los descritos por Pykett, 1982, *Sci. Am.* 246:78 88 para localizar y obtener imágenes de tejidos que expresan calicreína plasmática.

Los siguientes ejemplos proporcionan ilustración adicional y no son limitantes.

Ejemplos

EJEMPLO 1:

5 Los presentes inventores han descubierto varios inhibidores de anticuerpo y agentes de unión de calicreína plasmática (pCal). Los más potentes de éstos se han caracterizado adicionalmente y se muestra que tienen constantes de inhibición aparente ($K_{i,ap}$) < 10 nM, son inhibidores de pCal específicos con respecto otras serina proteasas probadas y no se unen a precalicreína. Las secuencias de aminoácidos de las CDR para los inhibidores y los agentes de unión se muestran en las **Tablas 1 y 2**, respectivamente.

Tabla 1 Secuencias de aminoácidos de CDR, señal de ELISA y constante de inhibición aparente de anticuerpos de pCal

Nombre inicial	ELISA de pCal humana (T/B)	pCal humana (Ki,ap nM)	LV-CDR1	LV-CDR2	LV-CDR3	HV-CDR1	HV-CDR2	HV-CDR3
M6-D09	39,9	5,9	RASQSIIRNYLN	AASLTOS	QQLSGYPHT	FYYMV	VIYPSGGITVYADSVKG	DKWAVMPPIYYYAMDV
M7-B04	4,1	54	TGTNSDVGNYNLVS	EVNKRPS	CSYAGNRNFYV	WYSMV	SISPSGGITVYADSVKG	HTAARPFYYYMDV
M7-E07	45,7	36	SGDKLGDKYAC	QDSKRPS	QAWDSSTGV	WYLM	YIYPSGGFTYVYADSVKG	TEGPLSWGYGMDV
M8-A09	5,4	105	SGDKLGDKYAY	QDNNRPS	QAWDSRTW	TYFML	SIYPSGGINTVYADSVKG	AASPVRNYYYGMDV
M10-F10	39,2	<100 nM	RASQSIIVYLN	GASNLQF	QQTFSLFT	FYNMN	SISPSGGFTVYADSVKG	GGGAYRNNWWGGFDI
M10-H05	42,2	18	RASQSVSSSYLA	GASSRAT	QQYGSSPFT	PYNMY	SIRPSGGFTVYADSVKG	GFIARWYFYDY
M12-D05	48,5	5,2	SGDQLGDKYVG	QDTKRPS	QAWDTSTAG	WYTMV	RIYPSGGWTKYADSVKG	EGLLWFGENAFDI
M27-E05	41,3	16	SGDKLGDKYAC	QDSKRPS	QAWDSSTGV	WYLM	YIYPSGGFTYVYADSVKG	TEGPLSWGYGMDV
M28-B11	33,3	5,5	SGDQLGDKYVG	QDTKRPS	QAWDTSTAG	WYTMV	RIYPSGGWTKYADSVKG	EGLLWFGENAFDI
M29-D09	47,5	0,7	SGNKLGDYVA	QDTKRPS	QAWDSSIVI	WYTMV	YIYPSGGATFYADSVKG	GSYDIWGFYSDH
M29-E09	28,8	11	SGDNLGNKYNS	QDTKRPS	QAWDGNVV	WYEMG	SIYSSGGTMYADSVKG	NPQYSGYDRSLSDGAFDI
M35-G04	11,1	2,9	RASQSVSSSYLA	DASNRAT	QQRSNWPRGFT	YYHMS	VIYPSGGSTKYADSVKG	GGSSDYAWGSYRRPYFDY
M38-F02	33,5	14	SGEKLGDYVS	EDSRPS	QAWDSSTAI	YYMMV	YIYSSGGHTVYADSVKG	DLFLYDFWSKGAFDI
M41-A11	28,0	13	SGDKLGDKYTS	QDIKRPS	QAWDSPNARV	HYRMS	SIYPSGGRTVYADSVKG	DKFEWRLFRGIGNDAFDI
M73-D06	4,0	<100 nM	SGSSSNIGSNTVS	NDHRRPS	SAWDDSLNGW	RYEMY	SISSSGGPTAYADSVKG	GTPKWELLRSIYENAFDI
M76-D01	11,2	<100 nM	RSSQSLSDGNTYLD	TLSYRAS	MOGTHWPPT	FYAMH	GIYPSGGRTVYADSVKG	DSSGSPNPLFDY
M110-C12	2,4	<100 nM	RSSLILLHSNGYNYL	LSSTRAS	MQPLETPPT	YYEMD	GISSSGGHTAYADSVKG	ERRSSSRARYYYYGMDV
M137-E12	4,5	79	SGNNSNFGSNTVT	SDSRPS	AAWDDSLNGV	DYRMQ	VIYPSGGNTMYADSVKG	GGPGSSIAARRAPTYGYGMD
M142-H08	29,9	0,2	RASQPIIDNYLN	AASRLQS	QQSYTPVPT	AYSMI	YIYPSGGRTVYADSVKG	GGLLLWFRELKSNYFDY
M145-D01	6,2	1,1	RASQSVSSSYLA	DASNRAT	QQRSNWPRGFT	YYHMS	VIYPSGGSTKYADSVKG	GGSSDYAWGSYRRPYFDY
M145-D11	40,0	0,79	SGDKLGDKYTS	QDIKRPS	QAWDSPNARV	HYRMS	SIYPSGGRTVYADSVKG	DKFEWRLFRGIGNDAFDI
M146-E12	49,6	2,2	RASGDIGNALG	DASTLOS	LOGYNYPRT	RYIMH	SISPSGGTSTVYADSVKG	EFENAYHYYYYGMDV
M152-A12	19,	<100 nM	RASQSISSSYLS	AASSLOS	QQSISIPRT	PYFMG	GIGPSGGSTTYADSVKG	EGPPYSSGWYRGLRQYHFDY
M160-G12	38,3	17	RASQSISSSYLA	AASTLOS	QQLSNYPLT	HYLMT	YISPSGGHTIYADSVKG	VARGIAARSRTSYFDY

Nombre inicial	ELISA de pCal humana (T/B)	pCal humana (K _i ,ap nM)	LV-CDR1	LV-CDR2	LV-CDR3	HV-CDR1	HV-CDR2	HV-CDR3
M161-C11	41,8	0,3	SGDKLGDKYVS	QDTKRPS	QAWDSSTYV	DYAMK	SISSSGGVTQYADSVKG	EEDYSSSWYSRRFDYYYGMD V
M162-A04	11,4	4,8	RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	HYIMM	GIYSSGGITVYADSVKG	RRTGIPRRDAFDI
X67-B03	nd	2,1	RASQPIDNYLN	AASRLQS	QQSYTVPYT	AYSMI	YIRPSGGRTTYADSVKG	GGLLLWSRELKSNYFDY
X67-C03	nd	0,7	RASQPIDNYLN	AASRLQS	QQSYTVPYT	AYSMI	YIRPSGGRTTYADSVKG	GGLLLWFMEKSNYFDY
X67-C09	nd	8,6	RASQPIDNYLN	AASRLQS	QQSYTVPYT	AYSMI	YIRPSGGRTTYADSVKG	GGLLLWGRELKSNYFDY
X67-D03	nd	0,1	RASQPIDNYLN	AASRLQS	QQSYTVPYT	AYSMI	YIRPSGGRTTYADSVKG	GGLLLWNRELKSNYFDY
X67-E04	nd	1,3	RASQPIDNYLN	AASRLQS	QQSYTVPYT	AYSMI	YIRPSGGRTTYADSVKG	GGLLLWDRELKSNYFDY
X67-F01	nd	0,9	RASQPIDNYLN	AASRLQS	QQSYTVPYT	AYSMI	YIRPSGGRTTYADSVKG	GGLLLWQRELKSNYFDY
X67-F10	nd	1,3	RASQPIDNYLN	AASRLQS	QQSYTVPYT	AYSMI	YIRPSGGRTTYADSVKG	GGLLLWTRELKSNYFDY
X67-G04	nd	0,35	RASQPIDNYLN	AASRLQS	QQSYTVPYT	AYSMI	YIRPSGGRTTYADSVKG	GGLLLWARELKSNYFDY
X67-H04	nd	3,6	RASQPIDNYLN	AASRLQS	QQSYTVPYT	AYSMI	YIRPSGGRTTYADSVKG	GGLLLWERELKSNYFDY
X81-E01	nd	0,2	RTSQFVNSNYLA	GASSRAT	QQSSRTPTWT	HYLMT	YISPSGGHTIYADSVKG	VARGIAARSRTSYFDY

Se muestran a continuación las secuencias de aminoácidos del dominio variable de la cadena ligera (LC) y cadena pesada (HC) de inhibidores de anticuerpos pCal

M10-H05		HC			
EVQLLES	GGG	LVQPGG	SLRL	SCAASG	FTFS
PY	MYWVR	QA	PGK	GLEW	VSS
IR	PSGGG	TVY	60		
ADSVKGR	FTI	SRD	NSKNTLY	LOMNSL	RAED
TAVYYC	AGGF	IAARW	YYFDY	WGOGT	LVTVS
120					

ES 2 905 545 T3

SASTKGPSVF	PLAPSSKS						138
M12-D05		LC					
QSVLTQPPSV	SVSPGQTATI	TCSGDQLGDK	YVGWYQQKPG	QSPILVIYQD	TKRPSGIPER		60
FSGSNSGNTA	TLTISGTHTV	DEAHYYCQAW	DTSTAGFGGG	TKLTVL			106
M12-D05		HC					
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	WYTMVWVRQA	PGKGLEWVSR	IYPSGGWTKY		60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TATYYCAREG	LLWFGENAFD	IWGQGTMTVT		120
SSASTKGPSV	FPLAPSSKS						139
M27-E05		LC					
QSELTQPPSV	SVSPGQTASI	TCSGDKLGDK	YACWYQQKPG	QSPVLVIYQD	SKRPSGIPER		60
FSGSNSGNTA	TLTISGTQAM	DEADYYCQAW	DSSTGVFGGG	TKLTVL			106
M27-E05		HC					
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	WYLMIWVRQA	PGKGLEWVS	IYPSGGFTTY		60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	MAVYYCARTE	GPLSWGYGMD	VWGQGTMTVT		120
SSASTKGPSV	FPLAPSSKS						139
M28-B11		LC					
QSVLTQPPSV	SVSPGQTATI	TCSGDQLGDK	YVGWYQQKPG	QSPILVIYQD	TKRPSGIPER		60
FSGSNSGNTA	TLTISGTHTV	DEAHYYCQAW	DTSTAGFGGG	TKLTVL			106
M28-B11		HC					
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	WYTMVWVRQA	PGKGLEWVSR	IYPSGGWTKY		60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TATYYCAREG	LLWFGENAFD	IWGQGTMTVT		120
SSASTKGPSV	FPLAPSSKS						139
M29-D09		LC					
QSALTQPPTV	SVSPGQTARI	TCSGNKLGDK	YVAWYQQKPG	QSPMLVIYQD	TKRPSRVSER		60
FSGSNSANTA	TLSISGTQAL	DEADYYCQAW	DSSIVIFGGG	TRLTVL			106
M29-D09		HC					
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	WYTMVWVRQA	PGKGLEWVS	IYPSGGATFY		60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAMGS	YDYIWFYSD	HWGQGTMLTV		120
SSASTKGPSV	FPLAPSSKS						139
M29-E09		LC					
QYELTQPPSV	SVSPGQTATI	TCSGDNLGNK	YNSWYQQKPG	QSPLLVIYQD	TKRPSAIPER		60
FSGSNSGNTA	TLTISGTQAM	DEADYYCQAW	DGNVVFGGGT	KLTVL			105
M29-E09		HC					
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	WYEMGWVRQA	PGKGLEWVSS	IYSSGGGTMY		60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARNP	QYSGYDRSL	DGAFDIWWGQ		120
TMVTVSSAST	KGPSVFPLAP	SSKS					144
M35-G04		LC					
QDIQMTQSPA	TLSLSPGERA	TLSCRASQSV	SSYLAWYQQK	PGQAPRLLIY	DASNRATGIP		60
ARFSGSGSGT	DFTLTISLE	PEDFAVYQCQ	QRSNWPRGFT	FPGTKVDIK			110
M35-G04		HC					
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	YYHMSWVRQA	PGKGLEWVS	ISPSGGSTKY		60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARGG	SSDYAWGSYR	RPYYFDYWGQ		120
GLTVTVSSAS	TKGPSVFPLA	PSSKS					145

ES 2 905 545 T3

M38-F02		LC				
QSVLTQPPSV	SVSPGQTASI	TCSGEKLGDK	YVSWYQQKPG	QSPSLVICED	SRRPSGIPER	60
FSGSNSGNTA	TLTISGAQPM	DEADYYCQAW	DSSTAIFGPG	TKVTVL		106
M38-F02		HC				
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	YYMMVWVRQA	PGKGLEWVSY	IYSSGGHTVY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARDL	FLYDFWSKGA	FDIWGQGTMTV	120
TVSSASTKGP	SVFPLAPSSK	S				141
M41-A11		LC				
QSVLTQPPSV	SVSPGQTASI	TCSGDKLGDGK	YTSWYQQRPG	QSPVLVIYQD	IKRPSGIPER	60
FSGSNSGNTA	TLTISGTQAM	DEADYYCQAW	DSPNARVFGS	GTKVTVL		107
M41-A11		HC				
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	HYRMSWVRQA	PGKGLEWVSS	IYPSGGRTVY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAKDK	FEWRLLFRGI	GNDAFDIWQ	120
GTMVTVSSAS	TKGPSVFPLA	PSSKS				145
M73-D06		LC				
QSELTQPPSA	SETPGQRVTI	SCSGSSSNIG	SNTVSWFQQ	PGSAPRLLIY	NDHRRPSGVP	60
DRFSGSKSGT	SASLVISGLQ	SQDEADYYCS	AWDDSLNGVV	FGGGTKLTVL		110
M73-D06		HC				
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	RYEMYWVRQA	PGKGLEWVSS	ISSSGGPTAY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAMYYCAKGT	PKWELLRSI	YIENAFDIWG	120
QGTMTVTVSSA	STKGPSVFPL	APSSKS				146
M76-D01		LC				
QDIVMTQTPP	SLPVNPGEPA	SISCRSSQSL	SDDGNTYLDW	YLQRPQGSPQ	LLIHTLSYRA	60
SGVPDRFSGS	GSGETDFTLKI	SRVEAEDVG	YYCMQGTWHP	PTFGQGTKVE	IK	112
M76-D01		HC				
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	FYAMHWVRQA	PGKGLEWVSG	IVPSGGRTHY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCATDS	SGSPNPLFDY	WGQGTLVTVS	120
SASTKGPSVF	PLAPSPKS					138
M110-C12		LC				
QDIQMTQSPL	SLSVTPGEPA	SISCRSSLSL	LHSGNGNYLD	WYVQRPQGSP	QLLMYLSSTR	60
ASGVPDRFSG	SGSGTDFTLE	ISRVEAEDVG	VYYCMQPLET	PPTFGGGTKV	EIK	113
M110-C12		HC				
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	YYEMDWVRQA	PGKGLEWVSG	ISSSGGHTAY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TATYYCARER	RSSSRARYYY	GMDVWQGT	120
VTVSSASTKG	PSVFPLAPSS	KS				142
M137-E12		LC				
QSVLIQPPSV	SGIPGQRVTI	SCSGNNSNFG	SNTVTWYQQ	PGTAPKLLIY	SDSRRPSGVP	60
DRFSGSRSDT	SASLAISGLQ	SEDEAEYHCA	AWDDSLNGVF	GGGTKLTVL		109
M137-E12		HC				
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	DYRMQWVRQA	PGKGLEWVSV	IVPSGGNTMY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARGG	PGSSIAARRA	PTGYYGMDVW	120
GQGTTVTVSS	ASTKGPSVFPL	LAPSSKS				147
M142-H08		LC				
QDIQMTQSPS	SLSAFVGDRT	TITCRASQPI	DNYLNWYHQK	PGKAPKLLIY	AASRLQSGVP	60
SRLSGSGFGT	DFTLTISLQ	PEDFGNYCQ	QSYTVPYTFG	GGTKVEIR		108

ES 2 905 545 T3

M142-H08		HC				
EVQLLES	GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	AYSMIWVRQA	PGKGLEWVS	IRPSGGRTTY 60
ADSVKGRFTI		SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARGG	LLLWFRELKS	NYFDYWGQGT 120
LVTVSSASTK		GPSVFPLAPS	SKS			143
M145-D01		LC				
QDIQMTQSPA		TLSSLSPGERA	TLSCRASQSV	SSYLAWYQQK	PGQAPRLLIY	DASNRATGIP 60
ARFSGSGSGT		DFTLTISLLE	PEDFAVYYCQ	QSRNWPFRGFT	FGPGTKVDIK	110
M145-D01		HC				
EVQLLES	GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	YYHMSWVRQA	PGKGLEWVS	ISPSGGSTKY 60
ADSVKGRFTI		SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARGG	SSDYAWGSYR	RPYYFDYWGO 120
GTLVTVSSAS		TKGPSVFPLA	PSSKS			145
M145-D11		LC				
QSVLTQPPSV		SVSPGQTASI	TCSGDKLGDK	YTSWYQQRP	QSPVLVIYQD	IKRPSGIPER 60
FSGSNSGNTA		TLTISGTQAM	DEADYYCQAW	DSPNARVFGS	GTKVTVL	107
M145-D11		HC				
EVQLLES	GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	HYRMSWVRQA	PGKGLEWVSS	IYPSGGRTVY 60
ADSVKGRFTI		SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAKDK	FEWRLLFRGI	GNDAFDIWGO 120
GTMVTVSSAS		TKGPSVFPLA	PSSKS			145
M146-E12		LC				
QDIQMTQSPS		SLSASVGDRV	TITCRASGDI	GNALGWYQQK	PGKAPRLLI	DASTLQSGVP 60
LRFSGSGSGT		EFTLTISLQ	PEDFATYYCL	QGYNYPRTFG	QGTKLEIR	108
M146-E12		HC				
EVQLLES	GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	RYIMHWVRQA	PGKGLEWVSS	ISPSGGLTSTY 60
ADSVKGRFTI		SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAREF	ENAYHYYYG	MDVWGQGTTV 120
TVSSASTKGP		SVFPLAPSSK	S			141
M152-A12		LC				
QDIQMTQSPS		SLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSYLSWYQQR	PGKAPNLLIY	AASSLQSGVP 60
SRFSGSGSGT		DFTLTISLQ	PEDFATYYCQ	QSIISIPRTFG	QGTKVEVK	108
M152-A12		HC				
EVQLLES	GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	PYFMGWVRQA	PGKGLEWVSG	IGPSGGSTTY 60
ADSVKGRFTI		SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAREG	PPYSSGWYRG	LRQYHFDYWG 120
QGTLVTVSSA		STKGPSVFPL	APSSKS			146
M160-G12		LC				
QDIQMTQSPS		FLSASVGDRV	TITCRASQGI	SSYLAWYQQK	PGKAPKLLIY	AASTLQSGVP 60
SRFSGSGSGT		EFTLTISLQ	PEDFATYYCQ	QLNSYPLTFG	GGTKVEIK	108
M160-G12		HC				
EVQLLES	GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	HYLMTWVRQA	PGKGLEWVS	ISPSGGHTIY 60
ADSVKGRFTI		SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARVA	RGIAARSRTS	YFDYWGQGT 120
VTVSSASTKG		PSVFPLAPSS	KS			142
M161-C11		LC				
QSALTQPPSV		SVSPGQTASI	TCSGDKLGDK	YVSWYQQRP	QSPVLVIYQD	TKRPSGIPER 60
FSGSNSGNTA		TLTISGTQAV	DEADYYCQAW	DSSTYVFVGGG	TKVTVL	106
M161-C11		HC				
EVQLLES	GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	DYAMKWVRQA	PGKGLEWVSS	ISSSGGVTOY 60

ES 2 905 545 T3

ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAREE DYSSSWYSRR FDYYYGMDVW 120
 QGGTTVTVSS ASTKGPSVFP LAPSSKS 147

M162-A04 LC
 QDIQMTQSPS TLSASVGDRV TITCRASQSI SSWLAWYQQK PGKAPNLLIY KASTLESGVP 60
 SRFSGSGSGT EFTLTISLQ PDDFATYYCQ QYNTYWTFGQ GTKVEIK 107

M162-A04 HC
 EVQLLES GGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS HYIMMWVRQA PGKGLEWVSG IYSSGGITVY 60
 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAYRR TGIPRRDAFD IWQGQTMVTV 120
 SSASTKGPSV FFLAPSSKS 139

X67-B03 LC
 QDIQMTQSPS SLSAFVGDRV TITCRASQPI DNYLNWYHQB PGKAPKLLIY AASRLQSGVP 60
 SRLSGSGFGT DFTLTISLQ PEDFGNYYCQ QSYTVPYTFG GGTKVEIR 108

X67-B03 HC
 EVQLLES GGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS AYSMIWVRQA PGKGLEWVSY IRPSGGRTTY 60
 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARGG LLLWSRELKS NYFDYWGGGT 120
 LVTVSSASTK GPSVFPLAPS SKS 143

X67-C03 LC
 QDIQMTQSPS SLSAFVGDRV TITCRASQPI DNYLNWYHQB PGKAPKLLIY AASRLQSGVP 60
 SRLSGSGFGT DFTLTISLQ PEDFGNYYCQ QSYTVPYTFG GGTKVEIR 108

X67-C03 HC
 EVQLLES GGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS AYSMIWVRQA PGKGLEWVSY IRPSGGRTTY 60
 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARGG LLLWMRELKS NYFDYWGGGT 120
 LVTVSSASTK GPSVFPLAPS SKS 143

X67-C09 LC
 QDIQMTQSPS SLSAFVGDRV TITCRASQPI DNYLNWYHQB PGKAPKLLIY AASRLQSGVP 60
 SRLSGSGFGT DFTLTISLQ PEDFGNYYCQ QSYTVPYTFG GGTKVEIR 108

X67-C09 HC
 EVQLLES GGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS AYSMIWVRQA PGKGLEWVSY IRPSGGRTTY 60
 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARGG LLLWGRELKS NYFDYWGGGT 120
 LVTVSSASTK GPSVFPLAPS SKS 143

X67-D03 LC
 QDIQMTQSPS SLSAFVGDRV TITCRASQPI DNYLNWYHQB PGKAPKLLIY AASRLQSGVP 60
 SRLSGSGFGT DFTLTISLQ PEDFGNYYCQ QSYTVPYTFG GGTKVEIR 108

X67-D03 HC
 EVQLLES GGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS AYSMIWVRQA PGKGLEWVSY IRPSGGRTTY 60
 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARGG LLLWNRELKS NYFDYWGGGT 120
 LVTVSSASTK GPSVFPLAPS SKS 143

X67-E04 LC
 QDIQMTQSPS SLSAFVGDRV TITCRASQPI DNYLNWYHQB PGKAPKLLIY AASRLQSGVP 60
 SRLSGSGFGT DFTLTISLQ PEDFGNYYCQ QSYTVPYTFG GGTKVEIR 108

X67-E04 HC
 EVQLLES GGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS AYSMIWVRQA PGKGLEWVSY IRPSGGRTTY 60
 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARGG LLLWDRELKS NYFDYWGGGT 120
 LVTVSSASTK GPSVFPLAPS SKS 143

ES 2 905 545 T3

X67-F01 LC						
QDIQMTQSPS	SLSAFVGDRV	TITCRASQPI	DNYLNWYHOK	PGKAPKLLIY	AASRLQSGVP	60
SRLSGSGFGT	DFTLTISLQ	PEDFGNYCQ	QSYTVPYTFG	GGTKVEIR		108
X67-F01 HC						
EVQLLESQGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	AYSMIWRQA	PGKGLEWVS	IRPSGGRTTY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARGG	LLWQRELKS	NYFDYWGQGT	120
LVTVSSASTK	GPSVFPLAPS	SKS				143
X67-F10 LC						
QDIQMTQSPS	SLSAFVGDRV	TITCRASQPI	DNYLNWYHOK	PGKAPKLLIY	AASRLQSGVP	60
SRLSGSGFGT	DFTLTISLQ	PEDFGNYCQ	QSYTVPYTFG	GGTKVEIR		108
X67-F10 HC						
EVQLLESQGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	AYSMIWRQA	PGKGLEWVS	IRPSGGRTTY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARGG	LLWTRELKS	NYFDYWGQGT	120
LVTVSSASTK	GPSVFPLAPS	SKS				143
X67-G04 LC						
QDIQMTQSPS	SLSAFVGDRV	TITCRASQPI	DNYLNWYHOK	PGKAPKLLIY	AASRLQSGVP	60
SRLSGSGFGT	DFTLTISLQ	PEDFGNYCQ	QSYTVPYTFG	GGTKVEIR		108
X67-G04 HC						
EVQLLESQGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	AYSMIWRQA	PGKGLEWVS	IRPSGGRTTY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARGG	LLWRELKS	NYFDYWGQGT	120
LVTVSSASTK	GPSVFPLAPS	SKS				143
X67-H04 LC						
QDIQMTQSPS	SLSAFVGDRV	TITCRASQPI	DNYLNWYHOK	PGKAPKLLIY	AASRLQSGVP	60
SRLSGSGFGT	DFTLTISLQ	PEDFGNYCQ	QSYTVPYTFG	GGTKVEIR		108
X67-H04 HC						
EVQLLESQGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	AYSMIWRQA	PGKGLEWVS	IRPSGGRTTY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARGG	LLWERELKS	NYFDYWGQGT	120
LVTVSSASTK	GPSVFPLAPS	SKS				143

Nota: X81-B01 es una IgG retromutadas a la línea germinal derivada de X63-G06 que se muestra en la **Tabla 7**.

Tabla 2. Secuencias de aminoácidos de CDR y señal de ELISA de agentes de unión de anticuerpos de pCal

Nombre inicial	ELISA de pCal humana (T/B)	LV-CDR1	LV-CDR2	LV-CDR3	HV-CDR1	HV-CDR2	HV-CDR3
M6-A06	11,7	RASQSI MYLN	GTSSLQS	QOSYAPWT	LYQMT	GIWPSGGFTDYADSVKG	VSTAVADNDY
M6-A08	23,4	RASQRISFYLN	GASSLQS	QQTFTPNNT	PYPMQ	SISSSGGIMTEYADSVKG	DDYGGKGAFDI
M6-D03	15,5	RASQSISSYLN	AASSLQS	QOSYSTLWT	KYFMG	VIGSSGGWTSYADSVKG	VSTAVADNDY
M6-D08	16	RASQSISSYLN	GASSLQS	QOSYTRWT	RYHNV	SISPSGGWTSYADSVKG	EMATIAGQFDP
M6-G05	18,5	RASQSISSYLN	NAFSMER	QOSYTTPTT	RYRMV	SIYPSGGMTAYADSVKG	DAVGIGDAFDI
M8-C04	44,7	SGDKLGDKYTS	QDSKRPS	QAWDSSTV	YYPMQ	YIYPSGGFTDYADSVKG	LFYSGSVGFY
M8-D05	11,9	RASQDISSWLV	DASNLOS	QQADGFPLT	LYNMN	SISPSGGFTDYADSVKG	DLDLGILDY
M8-E06	8,8	RASQSISSYLN	AASSLQS	QOSYSTLMYT	HYFMT	SIVPSGGMTQYADSVKG	DSYSSSWFDI
M8-G09	28,2	RASQGVSYLA	GASSLQS	QQYNTYPPT	LYEML	VIYPSGGYTDYADSVKG	SFSGFGEIDY
M8-H04	3,3	RASQYISTYLN	GTSSLQS	QOSFTTPTT	GYWMG	SISSSGGWTQYADSVKG	DDEIAAGGAFDI
M9-A03	14,4	RASQNIIDYLN	GAYNLQS	QOSYGTPTV	GYFMM	SIYSSGGYTDYADSVKG	EVAGTYAFDI
M9-A08	5,5	RASQRISTYLN	GASSLQS	QOSYNTPT	AYEMW	YIGSSGGTSYADSVKG	GNSSSFDAFDI
M9-C08	10,9	RASQSIYVYN	AASSLQR	QOSFSTPLT	HYGMV	YIVPSGGTTYADSVKG	VDYTGDLGY
M9-C10	7,8	RASQGISSYLN	GASSLQS	QESYSTLFT	LYPMQ	SIGSSGGMTFYADSVKG	EVGAAGFAFDI
M9-D08	35,9	RASRTISFYLN	GGSSLHS	QOSFSPWT	WYKMM	SIYPSGGWTSYADSVKG	GSPWGDDAFDI
M9-E04	18,8	RASQSISSYLN	AASNLTQ	QOSHTPPKT	EYDMM	SIGSSGGMTYYADSVKG	DQVAAAIDY
M9-F08	10,9	RASQSISSYLN	AASSLQS	QOSYSTPPYT	PYAMT	VIYPSGGFTDYADSVKG	ASGSYLDIAFDI
M9-F09	7	RASQSISSYLN	AASSLQS	QQTYTTPWT	SYPMG	RISSSGGMTIYADSVKG	DDWNVGMVDV
M9-F10	8,4	RASQSISSYLN	AASTLES	QOSYSTPYT	DYDME	SISPSGGSTIYADSVKG	QGLLTAFDI
M9-G08	4,8	RASQSISSYLN	AASSLQS	QOSYSTPIT	YYTML	SIYPSGGFTMYADSVKG	VDTAMAMIDY
M9-H02	3,5	RASRSIATYLN	GASTLQS	QOSFSDPYT	AYMMI	VIYPSGGVTMYADSVKG	GTVGASDAFDI
M9-H03	4,4	SGDKLGNRYTS	QDNKRPS	QALDSNTYV	WYSMG	YIVPSGGYTMAYADSVKG	DPGVSYYYGMDV
M9-H04	16,1	RASQSISSYLN	AASSLQS	QOSYSTPPT	AYTMW	SIWPSGGSTFYADSVKG	TYDSSAGEVDY
M10-A03	33,7	RASQRISFYLN	GASSLQS	QQTFTPNNT	PYPMQ	SISSSGGIMTEYADSVKG	DDYGGKGAFDI

Nombre inicial	ELISA de pCal humana (T/B)	LV-CDR1	LV-CDR2	LV-CDR3	HV-CDR1	HV-CDR2	HV-CDR3
M10-A12	20,8	RASRDISVYLN	GASSLQS	QQSYSPFT	LYLMH	SIYSSGGFTTYADSVKG	DTDYGMVDV
M10-B09	14,1	RASQSISTYLN	GASSLQS	QQSFSTPWT	WYEMS	RIWPSGGVTMYADSVKG	TSITTVGMDV
M10-C11	5,3	RASQSIYLN	AASLQS	QQSHSPPT	MYPM	YISPSGGMTDYADSVKG	VAGSSDAFDI
M10-D11	6,4	RSSQSLHSGYNYLD	LGSNRS	MQALQIPLT	AYPMN	RISSSGGNTSYADSVKG	GVLGY
M10-E06	32,8	RASQSISTYLN	GASSLQS	QQSYSDPYT	LYRMF	SIWSSGGPTMYADSVKG	EYPSTYYFDY
M10-F09	4,8	RASQTIDDDLI	AASSLQS	QQSYNIPRT	NYDMM	YISPSGGFTTRYADSVKG	DIYYNWGPSHYFDS
M10-G09	7,1	RASQSIGVIN	AASSLQS	QQWVSPFT	QYGMQ	SIRSSGGATRYADSVKG	DGYDSSGYPDY
M11-A10	25	RASQSIDTYLN	DASNL	QHLYAPYS	NYWMM	GIGSSGGFTSYADSVKG	GSYSDYGVFES
M11-E01	11,7	RASQSISSYLN	AASSLQS	QQSYSTPPT	TYEMY	GIGSSGGMTMYADSVKG	EQPGIAALQF
M11-E04	43,2	RASQSIYLT	GAATLQT	QQTFSLPRT	MYHMN	GIVSSGGVTFYADSVKG	ITTVTTGGAFDI
M11-E05	41,4	RTSQTNINYLN	ATHLES	QQSAFAPYT	WYTMG	WIYFGGLTTYADSVKG	LGGPLDAFDI
M11-E06	12,6	RASRGIGTYLN	AASSLET	QESFTNVYN	QYAMH	SIYPSGGFTLYADSVKG	GGWLAGGELLN
M11-G09	23,6	RTSQGINHYLN	AASELQT	QQTYTSPYT	LYNMT	YIYPSGGGTHYADSVKG	DTGFSADAFDI
M11-G12	4,9	RASQTISVYVN	GASSLQS	QQSYSPFT	QYPMN	SISSSGGFTTYADSVKG	EEQQGGFDY
M12-A08	40,4	RASQSISSYLN	AASTLET	QQSYSTPYT	WYVMG	WIVSSGGLTYADSVKG	TTVTTGDAFDI
M12-B04	18	RASQGIRNDLG	AASILQS	LQDYEYPLT	LYSMY	RIYPSGGGTVYADSVKG	DPLYSSGDV
M12-C09	7	RASQSIGIYLN	GASSLQS	QHSYSTPFT	SYAMV	SIGSSGGFTLYADSVKG	MNLGGGDAFDI
M12-C10	8,3	SGDKLGEKYVS	QDNKRPS	QAWDSYTW	DYEMH	GISPSSGGKTQYADSVKG	DLKWGGRGSPDWYFDL
M12-D10	9,9	RASQSISSYLN	AASSLQS	QQSYSTPPT	NYPMD	SISSSGGWTNYADSVKG	DTSGSYLGFYD
M12-E06	48	RASQSISTYLN	GAFLQS	QQSHSTPPT	QYKML	GIGPSGGLTAYADSVKG	APWFGELGMDV
M27-A10	3,2	RASQISAYLN	YGVGSLQS	QQGYTTPVT	WYRMD	SIWPSGGLTSYADSVKG	GWAPGGDAFDI
M27-B01	33,1	RASQSISSYLN	AASSLQS	QQSYSTPYT	DYTMW	SISSSGGITFYADSVKG	SADTAMGGAFDI
M27-B12	2,3	SGDKLGDEYAA	QDRKRPS	QAWGKRNW	WYQMM	SISPSSGGITEYADSVKG	DRSSGWYYYGMDV
M27-E03	35,9	RASQSISSYLN	AASSLQS	QQSYSTPRT	SYMMH	GIYPSGGWTDYADSVKG	LVAGLDAFDI
M27-F04	10,5	RASQSISSYLN	AASSLQS	QQSYSTPPT	WYPMT	SIGPSGGQTIYADSVKG	EYGDYGGGFDP

Nombre inicial	ELISA de pCal humana (T/B)	LV-CDR1	LV-CDR2	LV-CDR3	HV-CDR1	HV-CDR2	HV-CDR3
M27-F11	10	RASQGISSYLA	AASSLOS	QOQSYNTLRT	SYHMM	SIYPSGGATMYADSVKG	DGYHYGDYTYFQH
M27-G01	31,4	RASQSIISTYLN	GASSLOS	QOQSYSDPYT	LYRMF	SIWSSGGPTMYADSVKG	EYPSTYYFDY
M27-G04	4,1	RASQRISYLT	AASSLES	QOAFSTPFT	AYYMV	YISPSGGQTQYADSVKG	EAISSSSFDY
M27-G09	2,2	RTRQSIISYLN	AASSLOS	QOQSYDIPFT	EYDMA	YIVSSGGFTSYADSVKG	WAGWIAAADY
M27-H10	12,4	RASQSIISYLN	AASSLOS	QOQSYSTPQT	AYQMA	VIYSSGGYTDYADSVKG	HNWNDGAFDI
M28-A01	19	RASQSIISYLN	AASSLOS	QOQSYSTLT	WYAMH	GIYSSGGYTKYADSVKG	DLNNGDDVFDI
M28-C03	2,2	RASQSIINFYLN	VASSLES	LQSYSAPTY	YYQMG	SIYPSGGMTDYADSVKG	GSPWGDDAFDI
M28-D02	3,7	RTSRRIGTYLN	GASSLOS	QOQSFSPWT	WYPMQ	YIYPSGGGTDYADSVKG	SSGWLGDAFDI
M28-D12	41,6	RASQSIATYLN	AASSLOS	QOQSYSTRET	WYTMH	VIYPSGGPTSADSVKG	DGSGSYLGFDY
M28-E01	41	RASQSIISYLN	AASSLOS	QOQTYTTPWT	SYPMG	RISSSGGMTYADSVKG	DDWNVGMVDV
M28-E11	29,3	RASQDISNWLA	AASSLQT	QOQSYSLPWT	LYDMT	GISSSGGVITYADSVKG	TYYYDSSGYADAFDI
M28-F01	1,5	RASQSIINTYLN	AASTLES	QOQSYSTPPT	VYLMH	GISPSGGYTYADSVKG	PGGLDAFDI
M28-F05	31,4	RASQSIISYLN	AASSLOS	QOQSYSTPLT	RYIMW	GIYSSGGYTYADSVKG	ELEGLGFDY
M28-F07	33	RASQGISSWLA	ATGGLQS	QOAKSFPLT	DYTMV	SIYPSGGHTLYADSVKG	DHLSSWYGGFFDY
M29-C07	5,2	RASQSIISYLN	AASSLOS	QOQSYSTRYT	GYDMM	VISSSGGNTAYADSVKG	ESSGLYYFDY
M29-D10	23,6	RASQSIITYLN	GASNLHS	QOQSYDTPLT	WYPMY	SIGSSGGPTPYADSVKG	WADYGGSLDY
M29-E02	2	SGSSNIGNNAVS	YDDLPS	AAWDDSLNGFV	RYPMV	VIYPSGGDTFYADSVKG	GDDYLWEAAVY
M29-G08	40,4	RASQIGNDVA	HASTRAY	QOQFYDWPAT	YYHMM	GISPSGGFTFYADSVKG	DYYYDSSGYSPLGY
M29-G10	16,4	RASQSIISYLN	GASQLES	QOQSYNVPYT	FYKMI	SISSSGGSTQYADSVKG	DRVDLGLYDY
M74-A07	8,6	RTSQNINTYLN	GVSSLHR	QOQSYSSPWT	QYLMV	SIYPSGGYTSYADSVKG	VSTAVADNDY
M76-F02	6,4	RASQTIIDNYLH	DASSLOS	QOQSYDTPQYT	LYDMN	GISPSGGQTMAYADSVKG	QPMISAFDI
M76-G02	10,3	RASQSIISYLN	AASSLOS	QOQSYSTPPWT	LYAMW	VISSSGGFTSYADSVKG	YRVGVAATDY
M76-G06	11,8	RASQSIISTYLN	AASSLOS	QOQSYSTPHT	GYIMH	WIYPSGGWTEYADSVKG	DAPGVGAIDY
M76-H02	13,4	RASQDISVYLN	GGASLOS	QOQSYSLPFT	MYWMQ	YIYPSGGPTKYADSVKG	PSGSYGDAFDI

Nombre inicial	ELISA de pCal humana (T/B)	LV-CDR1	LV-CDR2	LV-CDR3	HV-CDR1	HV-CDR2	HV-CDR3
M77-C07	16,1	RASQNISSYLN	AASSLQS	QQSYSTPRT	LYIMG	GIYPSGGFTMYADSVKG	ESSGVAAPDY
M77-H04	7,6	RSSQSLHSGRYNYLD	LGSNIRAS	MQALQRRT	YYTMI	GIRSSGGGTRYADSVKG	DGSRYSYGSIIYYGMDA

Se muestran a continuación las secuencias de aminoácidos del dominio variable de la cadena ligera (LC) y cadena pesada (HC) de agentes de unión de anticuerpos pCal.

M8-C04 HC
EVOLLESGGG LVOPGGSLRL SCAASGFTFS YYPMQWVROA PGKGLEWVS Y IYPSGGLTSY 60

ES 2 905 545 T3

ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARLF	YSGSGVGFY	WQGTTLVTVS	120
SASTKGPSVF	PLAPSSKS					138
M8-D05		LC				
QDIQMTQSPS	FVSASVGDV	TITCRASQDI	SSWLWVYQQK	PGKGPILLIY	DASNLQSGVP	60
SRFSGSGSGT	HFTLTISLQ	PEDFATYYCQ	QADGFPLTFG	GGTKVEMK		108
M8-D05		HC				
EVQLLES	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	LYNMNWVRQA	PGKGLEWVSS	ISPSGGFTDY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARDL	DLGILDYWGQ	GTLVTVSSAS	120
TKGPSVFPLA	PSSKS					135
M8-E06		LC				
QDIQMTQSPS	SLSASVGDV	TITCRASQSI	SSYLNWYQQK	PGKAPKLLIY	AASSLQSGVP	60
SRFSGSGSGT	DFTLTISLQ	PEDFATYYCQ	QSYSTLMYTF	GQGTKLEIK		109
M8-E06		HC				
EVQLLES	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	HYFMTWVRQA	PGKGLEWVSS	IVPSGGMTQY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARDS	YSSSWFDIWG	QGTMTVTVSSA	120
STKGPSVFPL	APSSKS					136
M8-G09		LC				
QDIQMTQSPS	SLSASVGDV	TITCRASQGV	SYLWVYQQK	PGKAPKSLIY	GASSLQSGVP	60
SRFSGSGSGT	VFTLTISLQ	PDDFATYYCQ	QYNTYPPTFG	QGTRLDIK		108
M8-G09		HC				
EVQLLES	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	LYEMLWVRQA	PGKGLEWVSV	IYPSGGYTDY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	MAVYYCARSF	SGFGEIDYWG	QGTMTVTVSSA	120
STKGPSVFPL	APSSKS					136
M8-H04		LC				
QDIQMTQSPS	SLSASIGDV	TITCRASQYI	STYLNWYEQK	PGKAPKLLIY	GTSSLQSGVP	60
SRFSGSGSGT	EFSLTISLQ	PEDFATYYCQ	QSFTTPPTFG	QGTKLEIK		108
M8-H04		HC				
EVQLLES	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	GYWMGWVRQA	PGKGLEWVSS	ISSSGGWTQY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TATYYCARD	EIAAGGAFDI	WQGMAMTVS	120
SASTKGPSVF	PLAPSSKS					138
M9-A03		LC				
QDIQMTQSPS	SLSASLGDRV	TITCRASQNI	DIYLNWYQQT	PGKAPKLLIY	GAYNLQSGVP	60
SRFSGSGSGT	DFTLTISLQ	PEDFGTYYCQ	QSYGTPVFGQ	GTKLEIK		107
M9-A03		HC				
EVQLLES	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	GYFMMWVRQA	PGKGLEWVSS	IYSSGGYTDY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAREV	AGTYAFDIWG	QGTMTVTVSSA	120
STKGPSVFPL	APSSKS					136
M9-A08		LC				
QDIQMTQSPS	SLSASVGDV	TVTCRASQRI	STYLNWYQQK	PGKAPKLLIS	GASSLQSGVP	60
SRFSGSGSGT	DFTLTISLQ	PDDFATYYCQ	QSYNTPRTFG	QGTKVEIR		108
M9-A08		HC				
EVQLLES	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	AYEMWVRQA	PGKGLEWVS	IGSSGGSTSY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCTGGN	SSSFDAFDIW	QGTMTVTVSS	120
ASTKGPSVF	LAPSSKS					137

ES 2 905 545 T3

M9-C08		LC				
QDIQMTQSPS	SLSASVGDRV	TITCRASQSI	SIYVNWYQQK	PGKAPNLLIF	AASSLQRGVP	60
SRFSGSGSGA	DFTLTISLQ	PEDFATYYCQ	QSFSTPLTFG	GGTKVEIK		108
M9-C08		HC				
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	HYGMVWVRQA	PGKGLEWVSY	IVPSGGLTTY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARVD	YTG DGLGYWG	QGTLVTVSSA	120
STKGPSVFPL	APSSKS					136
M9-C10		LC				
QDIQMTQSPS	SLSASVGDRV	TITCRASQGI	SSYLNWYQQK	PGNAPNLLIY	GASSLQSGVP	60
SRFSGSGSGT	DFTLTISLQ	PEDFATYYCQ	ESYSTLFTFG	PGTTVEIK		108
M9-C10		HC				
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	LYPMQWVRQA	PGKGLEWVSS	IGSSGGMTFY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCTREV	GAAGFAFDIW	GQGTMTVTSS	120
ASTKGPSVFP	LAPSSKS					137
M9-D08		LC				
QDIQMTQSPS	SLSASVGDRV	TLTCRASRTI	SFYLNWYQQK	AGKAPELLIY	GGSSLHSGVP	60
SRFSGSGSGT	DFSLTISNLQ	PEDIAVYYCQ	QSFSSPWTFG	QGTKVEIK		108
M9-D08		HC				
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	WYKMMWVRQA	PGKGLEWVSS	IYPSGGWTNY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCTRGS	PWGDDAFDIW	GQGTMTVTSS	120
ASTKGPSVFP	LAPSSKS					137
M9-E04		LC				
QDIQMIQSPS	SLSASVGDRV	TITCRASQSI	SGYLNWYQQR	SGKAPKLLIF	AASNLTGTGP	60
SRFSGSGSGT	DFTLTINNLO	PEDFATYYCQ	QSHTPPKTFG	PGTKVDIK		108
M9-E04		HC				
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	EYDMMWVRQA	PGKGLEWVSS	IGSSGGMTYY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARDQ	VAAAAIDYWG	QGTLVTVSSA	120
STKGPSVFPL	APSSKS					136
M9-F08		LC				
QDIQMTqSPS	SLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSYLNWYQQK	PGKAPKLLIY	AASSLQSGVP	60
SRFSGSGSGT	DFTLTISLQ	PEDFATYYCQ	QSYSTPPYTF	GQGTKLEIK		109
M9-F08		HC				
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	PYAMTWVRQA	PGKGLEWVSV	IYPSGGFTDY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAMYYCARAS	GSYLDAFDIW	GQGTMTVTSS	120
ASTKGPSVFP	LAPSSKS					137
M9-F09		LC				
QDIQMTQSPS	SLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSYLNWYQQK	PGKAPKLLIY	AASSLQSGVP	60
SKFSGSGSGT	DYTLTISLQ	PEDFATYYCQ	QTYTTPWTFG	QGTKVEIK		108
M9-F09		HC				
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	SYPMGWVRQA	PGKGLEWVSR	ISSSGGMTIY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARDQ	WNVGMVDVWGQ	GTTTVTVSSAS	120
TKGPSVFPLA	PSSKS					135
M9-F10		LC				
QDIQMTQSPS	SLSASVGDRV	TITCRASQSI	NTYLNWYQQK	PGKAPKVLII	AASTLESQVP	60
SRFSGSGSGT	DFTLTISLQ	PEDFATYYCQ	QSYSTPYTFG	QGTKLEVR		108

ES 2 905 545 T3

M9-F10		HC				
EVQLLES	GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	DYDMEWVRQA	PGKGLEWVSS	ISPSGGSTIY
ADSVKGRFTI		SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARQG	LLTAFDIWQ	GTMTVTSSAS
TKGPSVFPLA	PSSKS					
M9-G08		LC				
QDIQMTQSPS	SLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSYLNWYQQK	PGKAPKLLIY	AASSLQSGVP	
SRFSGSGSGT	DFTLTISLQ	PEDFATYYCQ	QSYSTPITFG	GGTKVEIK		
M9-G08		HC				
EVQLLES	GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	YYTMLWVRQA	PGKGLEWVSS	IYPSGGFTMY
ADSVKGRFTI		SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARVD	TAMAMIDYWG	QGTTLTVSSA
STKGPSVFPL	APSSKS					
M9-H02		LC				
QDIQMTQSPS	SLSASVGDRV	IITCRASRSI	ATYLNWYQQK	PGKAPNLLIF	GASTLQSGVP	
SRFSGSGSGT	DFTLTISDLQ	PEDFATYYCQ	QSFSDPYTFG	QGTNLEMK		
M9-H02		HC				
EVQLLES	GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	AYMMIWVRQA	PGKGLEWVSV	IYPSGGVTMY
ADSVKGRFTI		SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARGT	VGASDAFDIW	GQGTMTVTSS
ASTKGPSVFP	LAPSSKS					
M9-H03		LC				
QYELTQAPSV	SVAPGQTASI	TCSGDKLGNR	YTSWYQQKPG	QSPVLVIFQD	NKRPSGIPER	
FSGSNSNGNTA	TLTISGTQAM	DEADYYCQAL	DSNTYVFGTG	TKVTVL		
M9-H03		HC				
EVQLLES	GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	WYSMGWVRQA	PGKGLEWVSY	IVPSGGYTMY
ADSVKGRFTI		SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARDP	GVSYYYYGMD	VWGQGTTVTV
SSASTKGPSV	FPLAPSSKS					
M9-H04		LC				
QDIQMTQSPS	SLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSYLNWYQQK	PGKAPKLLIY	AASSLQSGVP	
SRFSGSGSGT	DFTLTISLQ	PEDFATYYCQ	QSYSTPPTFG	QGTRLEIK		
M9-H04		HC				
EVQLLES	GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	AYTMWVRQA	PGKGLEWVSS	IWPSGGSTFY
ADSVKGRFTI		SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARTY	DSSAGEVDYW	GQGTTLTVTSS
ASTKGPSVFP	LAPSSKS					
M10-A03		LC				
QDIQMTQSPS	SLSASVGDRV	TITCRASQRI	SFYLNWFQQK	PGKAPNLLIY	GASSLQSGVP	
SRFSGSGSGT	DFTLTISLQ	PKDFGTYYCQ	QTFTPTNTFG	QGTKLEIK		
M10-A03		HC				
EVQLLES	GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	PYPMQWVRQA	PGKGLEWVSS	ISSSGGMTEY
ADSVKGRFTI		SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARD	YGGKGGAFDI	WGQGTMTVTVS
SASTKGPSVF	PLAPSSKS					
M10-A12		LC				
QDIQMTQSPL	SLSAFVGDRV	TITCRASRDI	SVYLNWYQLK	SGKAPKLLIY	GASSLQSGVP	
SRFSGSGSGT	DFTLTITSLQ	PEDFATYYCQ	QSYSIPPTFG	GGTKVETK		
M10-A12		HC				
EVQLLES	GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	LYLMHWVRQA	PGKGLEWVSS	IYSSGGFTTY

ES 2 905 545 T3

ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARDT	DYGMDVWGQG	TTVTVSSAST	120
KGPSVFPLAP	SSKS					134
M10-B09		LC				
QDIQMTQSPS	SLSASVGDRV	TITCRASQSI	STYLNWYQQR	PGKAPKLLIY	GASSLQSGVP	60
SRFSGSGSGT	DFTLTISLQ	REDFATYYCQ	QSFSTPWTFG	QGTRVEIK		108
M10-B09		HC				
EVQLLES GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	WYEMSWVRQA	PGKGLEWVSR	IWPSGGVTMY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCTRTS	ITTVGMDVWG	QGT TVTVSSA	120
STKGPSVFPL	APSSKS					136
M10-C11		LC				
QDIQMTQSPS	SLSASVGDRV	TITCRASQSI	SIYLNWYQQR	PEKAPKLLIF	AASTLQSGVP	60
SRFSGSGSGT	DFTLTISLQ	PEDFATYYCQ	QSHSIPPTFG	LGTKVEVK		108
M10-C11		HC				
EVQLLES GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	MYPMNWVRQA	PGKGLEWVSY	ISPSGGMTDY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	MAVYYCARVA	GSSDAFDIWG	QGTMTVTSSA	120
STKGPSVFPL	APSSKS					136
M10-D11		LC				
QDIQMTQSPL	SLPVTPEGEA	SISCRSSQSL	LHSNGYNYLD	WYLQKPGQSP	QLLIYLGSR	60
ASGVPRDFSG	SGSGTDFTLK	ISRVEAEDVG	VYYCMQALQT	PLTFGPQTKV	HIK	113
M10-D11		HC				
EVQLLES GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	AYPMNWVRQA	PGKGLEWVSR	ISSSGGNTSY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCALGY	LGWVGQGLTV	TVSSASTKGP	120
SVFPLAPSSK	S					131
M10-E06		LC				
QDIQMTQSPS	SLSASVGDRV	TITCRASQSI	STYLNWYQQR	PGKAPKLLIY	GASSLQSGVP	60
SRFSGSGSGT	DFTLTISLQ	PEDFTIYYCQ	QSYSDPYTFG	QGTKLDIK		108
M10-E06		HC				
EVQLLES GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	LYRMFWVRQA	PGKGLEWVSS	IWSSGGPTMY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAREY	PSTYYFDYWG	QGT LVTVSSA	120
STKGPSVFPL	APSSKS					136
M10-F09		LC				
QDIQMTQSPS	SLSASVGDRV	TITCRASQTI	DDDLIWIYQQR	PGRAPKLLIY	AASSLQSGVP	60
SRFSGSGSGT	DFTLTITSLQ	PEDFATYYCQ	QSYNIPRTFG	QGTKLESK		108
M10-F09		HC				
EVQLLES GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	NYDMMWVRQA	PGKGLEWVSY	ISPSGGFTRY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TATYYCAKDI	YYNWGPSHY	FDSWGQGLTV	120
TVSSASTKGP	SVFPLAPSSK	S				141
M10-G09		LC				
QDIQMTQSPS	SLSASVGDSV	TITCRASQSI	SGYINWYQQR	AGKAPKLLIY	AASSLQSGVP	60
SRFSGSGSGT	HFTLTISLQ	PEDFATYYCQ	QYVSYPTFTG	PGTKVDIK		108
M10-G09		HC				
EVQLLES GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	QYGMQWVRQA	PGKGLEWVSS	IRSSGGATRY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARDG	YYDSSGYPDY	WGQGLTVTVS	120
SASTKGPSVF	PLAPSSKS					138

ES 2 905 545 T3

M11-A10		LC				
QDIQMTQSPS	SLSASVGDRV	AITCRASQSI	DTYLNWYQQK	PGKAPKLLIY	DASNLEIGVP	60
SRFSGSGSGT	DFTFIINSLQ	PEDVATYYCQ	HYLYAPYSFG	QGTKLEIK		108
M11-A10		HC				
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	NYWMMWVRQA	PGKGLEWVSG	IGSSGGFTSY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAKGS	YSDYGVFESW	GQGTLVTVSS	120
ASTKGPSVFP	LAPSSKS					137
M11-E01		LC				
QDIQMTQSPS	SLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSYLNWYQQK	PGKAPKLLIY	AASSLQSGVP	60
SRFSGSGSGT	DFTLTISSLQ	PEDFATYYCQ	QSYSTPPTFG	QGTKVEIK		108
M11-E01		HC				
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	TYEMYWVRQA	PGKGLEWVSG	IGSSGGMTMY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAMYYCAREQ	PGIAALQFWG	QGTTLVTVSSA	120
STKGPSVFPL	APSSKS					136
M11-E04		LC				
QDIQMTQSPS	SLSASVGDRV	TITCRASQSI	SIYLTWYQHR	PGKAPNLLIY	GAATLQTGVP	60
SRFSGSGSGT	DFTLTIRGLQ	PEDFATYYCQ	QTFSLPRTFG	QGTKLEIK		108
M11-E04		HC				
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	MYHMNWVRQA	PGKGLEWVSG	IVSSGGVTFY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARIT	TVTTGGAFDI	WQQGTMVTVS	120
SASTKGPSVF	PLAPSSKS					138
M11-E05		LC				
QDIQMTQSPS	SLSASVGDTV	TITCRTSQTI	NNYLNWYQQR	PGEAPKVLII	ATHTLESQVP	60
SRFSGSGSGT	DFTLTIGSLQ	PEDFATYYCQ	QSFAFPYTFG	QGTKVEIT		108
M11-E05		HC				
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	WYTMGWVRQA	PGKGLEWVSW	IYFEGGLTTYA	60
DSVKGRFTIS	RDNSKNTLYL	QMNSLRAEDT	AVYYCARLGG	PLDAFDIWGQ	GTMVTVSSAS	120
TKGPSVFPLA	PSSKS					135
M11-E06		LC				
QDIQMTQSPS	SLSASIGDRV	TISCRASRGI	GTYLNWYQQH	AGKAPKLLIR	AASSLETGVP	60
PRFSGSGSGT	DFTLTISSLQ	SDDFATYYCQ	ESFTNVYNFG	QGTKLEIK		108
M11-E06		HC				
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	QYAMHWVRQA	PGKGLEWVSS	IYPSGGFTLY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAMYYCARGG	WLAGGELLNW	GQGTLVTVSS	120
ASTKGPSVFP	LAPSSKS					137
M11-G09		LC				
QDIQMTQSPS	SLSASVGDRV	TITCRTSQGI	NHYLNWYQQK	PGKAPKILVF	AASELQTGVP	60
SRFSGTSGSGT	SYTLTITSLQ	PEDVATYYCQ	QTYTSPYTFG	QGTKLEVK		108
M11-G09		HC				
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	LYNMTWVRQA	PGKGLEWVSY	IYPSGGGTHY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARDT	GFWSADAFDI	WQQGTMVTVS	120
SASTKGPSVF	PLAPSSKS					138
M11-G12		LC				
QDIQMTQSPS	SLSAFVGDRV	SITCRASQTI	SVYVNWYQHK	SGQAPKLLIY	GASSLQSGVP	60
SRFSGSGSGT	DFTLTISSLQ	PEDFATYFCQ	QSYSIPPTFG	GGTDVQIR		108

ES 2 905 545 T3

M11-G12	HC						
EVQLLES	GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	QYPMNWVRQA	PGKGLEWVSS	ISSSGGFTTY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAREE	QQGGFDYWQ	GTLVTVSSAS		120
TKGPSVFPLA	PSSKS						135
M12-A08	LC						
QDIQMTQSPS	SLSASVGDRV	TITCRASQSI	SRYLNWYQQK	PGKAPKLLIY	AASTLETGVP		60
SRFSGSGSGT	DFTLTITTLQ	PEDFVIYYCQ	QSYSTPYTFG	QGTKLEIK			108
M12-A08	HC						
EVQLLES	GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	WYYMGWVRQA	PGKGLEWVSW	IVSSGGTLTY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAMYYCARTT	VTTGDAFDIW	GQGTMTVTVSS		120
ASTKGPSVFPL	LAPSSKS						137
M12-B04	LC						
QDIQMTQSPS	SLSASVGDRV	TITCRASQGI	RNDLGWYQHK	PGKAPKLLIY	AASILQSGVP		60
SRFSGTASGT	DFTLTISLQ	PEDFATYFCL	QDYEYPLTFG	GGTKLDIK			108
M12-B04	HC						
EVQLLES	GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	LYSMYWVRQA	PGKGLEWVSR	IRPSGGGTVPY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARDP	LYSSGDVWQ	GTTVTVSSAS		120
TKGPSVFPLA	PSSKS						135
M12-C09	LC						
QDIQMTQSPS	SLSASVGDRV	TITCRASQSI	GIYLNWYHOK	PGKAPNLLIY	GASSLQSGVP		60
SRFSGSGSGT	DFTLTISLQ	PGDFATYYCQ	HSYSTPPTFG	GGTKVEIK			108
M12-C09	HC						
EVQLLES	GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	SYAMVWVRQA	PGKGLEWVSS	IGSSGGFTLY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCASN	LGGGDAFDIW	GQGTMTVTVSS		120
ASTKGPSVFPL	LAPSSKS						137
M12-C10	LC						
QSALTQPPSV	SVSPGQTASI	TCSGDKLGEK	YVSWYQQKPG	QSPVVVIYQD	NKRPSGIPER		60
FSGNSGNTA	TLTISGTQAV	DEADYYCQAW	DSYTVVFGGG	SKLTVLGQPK			110
M12-C10	HC						
EVQLLES	GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	DYEMHWVRQA	PGKGLEWVSG	ISPSGGKTQY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARDL	KWGGRGSPDW	YFDLWGRGTL		120
VTVSSASTKG	PSVFPLAPSS	KS					142
M12-D10	LC						
QDIQMTQSPS	SLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSYLNWYQQK	PGKAPKLLIY	AASSLQSGVP		60
SRFSGSGSGT	DFTLTISLQ	PEDFATYYCQ	QSYSTPPTFG	GGTKVEIK			108
M12-D10	HC						
EVQLLES	GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	NYPMDWVRQA	PGKGLEWVSS	ISSSGGWTNY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCATDT	SGSYLGFDYW	GQGTMTVTVSS		120
ASTKGPSVFPL	LAPSSKS						137
M12-E06	LC						
QDIQMTQSPS	SLSASVGDRV	SITCRASQSI	STYLNWYQHK	PGKAPTLLIY	GAFSLQSGVP		60
SRFSGSGSGT	DFALTISSLQ	PEDFATYYCQ	QSHSTPPTFG	QGTRVEIK			108
M12-E06	HC						
EVQLLES	GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	QYKMLWVRQA	PGKGLEWVSG	IGPSGGLTAY	60

ES 2 905 545 T3

ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARAP	WFGELGMDVW	GQGTTVTVSS	120
ASTKGPSVFP	LAPSSKS					137
M27-A10		LC				
QDIQMTQSPS	SLSASVGDV	TITCRASQSI	SAYLNWYQQK	PGKAPQLLMY	GVGSLQSGVP	60
SRFSGSGSGT	DFTLTISLQ	PEDFATYFCQ	QGYTTPVTFG	GGTKVEIK		108
M27-A10		HC				
EVQLLES	GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	WYRMDWVRQA	PGKGLEWVSS	IWPSGGLTSY 60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARGW	APGGDAFDIW	GQGTMTVTVSS	120
ASTKGPSVFP	LAPSSKS					137
M27-B01		LC				
QDIQMTQSPS	SLSASVGDV	TITCRASQSI	SSYLNWYQQK	PGKAPKLLIY	AASSLQSGVP	60
SRFSGSGSGT	DFTLTISLQ	PEDFATYYCQ	QSYSTPYTFG	QGTKLEIK		108
M27-B01		HC				
EVQLLES	GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	DYTMWVVRQA	PGKGLEWVSS	ISSSGGITFY 60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARSA	DTAMGGAEDI	WGQGTMTVTS	120
SASTKGPSVF	FLAPSSKS					138
M27-B12		LC				
QYELTQPPAV	SVSPGQTATI	TCSGDKLGDE	YAAWYQQKPG	QSPVLVIYQD	RKRPSGIPER	60
FSGSNFNGTA	TLTITGTQVM	DEADYYCQAW	GKRNWVFGGG	TKLTVL		106
M27-B12		HC				
EVQLLES	GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	WYQMMWVRQA	PGKGLEWVSS	ISPSGGITEY 60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARDR	SSGWYYYGMD	VWGQGTMTVTV	120
SSASTKGPSV	FPLAPSSKS					139
M27-E03		LC				
QDIQMTQSPS	SLSASVGDV	TITCRASQSI	SSYLNWYQQK	PGKAPKLLIY	AASSLQSGVP	60
SRFSGSGSGT	DFTLTISLQ	PEDFATYYCQ	QSYSTPRTFG	QGTKVEIK		108
M27-E03		HC				
EVQLLES	GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	SYMMHWVRQA	PGKGLEWVSG	IYPSGGWTDY 60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TATYYCARLV	AGLDAFDIWG	QGTMTVTVSSA	120
STKGPSVFPL	APSSKS					136
M27-F04		LC				
QDIQMTQSPS	SLSASVGDV	TITCRASQSI	SSYLNWYQQK	PGKAPKLLIY	AASSLQSGVP	60
SRFSGSGSGT	DFTLTISLQ	PEDFATYYCQ	QSYSTPPTFG	QGTKVEIK		108
M27-F04		HC				
EVQLLES	GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	WYPMTWVRQA	PGKGLEWVSS	IGPSGGQTIY 60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCTTEY	GDYGGGFDPW	GQGTTLTVTVSS	120
ASTKGPSVFP	LAPSSKS					137
M27-F11		LC				
QDIQMTQSPS	FLSASVGDV	TITCRASQGI	SSYLAWYQQK	PGKAPKLLIY	AASSLQSGVP	60
SRFSGSGSGT	DFTLTISLQ	PEDFATYYCQ	QSYNTLRTEG	PGTKVDLK		108
M27-F11		HC				
EVQLLES	GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	SYHMMWVRQA	PGKGLEWVSS	IYPSGGATMY 60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAMYYCARDG	YHYGDYTYFQ	HWGQGTTLTVTV	120
SSASTKGPSV	FPLAPSSKS					139

ES 2 905 545 T3

M27-G01		LC				
QDIQMTQSPS	SLSASVGDRV	TITCRASQSI	STYLNWYQQK	PGKAPKLLIY	GASSLQSGVP	60
SRFSGSGSGT	DFTLTISLQ	PEDFTIYYCQ	QSYSDPYTFG	QGTKLDIK		108
M27-G01		HC				
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	LYRMFWVRQA	PGKGLEWVSS	IWSSGGPTMY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAREY	PSTYYFDYWG	QGTLVTVSSA	120
STKGPSVFPL	APSSKS					136
M27-G04		LC				
QDIQMTQSPS	SLSASVGDRV	TITCRASQRI	SYYLTWYQQK	PGKVPKLLIY	AASSLESGVP	60
SRFSGSGSGT	DFTLTISNLQ	PEDFATYYCQ	QAFSTPFTFG	GGTKVEIK		108
M27-G04		HC				
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	AYYMWVVRQA	PGKGLEWVSY	ISPSGGQTQY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAREA	ISSSSFYDWG	QGTLVTVSSA	120
STKGPSVFPL	APSSKS					136
M27-G09		LC				
QDIQMTQSPS	SVSASVGDRI	TITCRTRQSI	SNYLNWYQQK	PGEPPKLLIF	AASSLQSGVP	60
SRFSGSGTGT	EFTLTISLQ	PEDLAIYYCQ	QSYDIPFTFG	QGTKLEIK		108
M27-G09		HC				
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	EYDMAWVRQA	PGKGLEWVSY	IVSSGGFTSY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCTTWA	GWIAAADYWG	QGTLVTVSSA	120
STKGPSVFPL	APSSKS					136
M27-H10		LC				
QDIQMTQSPS	SLSASVGDRV	TITCRASQSI	SNYLNWYQQK	PGKAPKFLIY	AASSLQSGVP	60
SRFSGSGSGT	DFTLSISLQ	PEDFATYYCQ	QSYSTPQTFG	QGTKVEMK		108
M27-H10		HC				
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	AYQMAWVRQA	PGKGLEWVSV	IYSSGGYTDY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARHN	WNDGAFDIWG	QGTMTVTVSSA	120
STKGPSVFPL	APSSKS					136
M28-A01		LC				
QDIQMTQSPS	SLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSYLNWYQQK	PGKAPKLLIY	AASSLQSGVP	60
SRFSGSGSGT	DFTLTISLQ	PEDFATYYCQ	QSYSTLTFGG	GTKVEIK		107
M28-A01		HC				
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	WYAMHWVRQA	PGKGLEWVSG	IYSSGGYTKY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARDL	SNGDDVFDIW	GQGTMTVTSS	120
ASTKGPSVFPL	LAPSSKS					137
M28-C03		LC				
QDIQMTQSPS	SLSASVGDRV	TITCRASQSI	NFYLNWYQQK	PGKAPKLLIY	VASSLESGVP	60
SRFSGSASGT	EFTLTISLQ	PEDFATYYCL	QSYSAPYTFG	QGTKVEIT		108
M28-C03		HC				
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	YYQMGWVRQA	PGKGLEWVSS	IYPSGGMTDY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCTRGS	PWGDDAFDIW	GQGTMTVTSS	120
ASTKGPSVFPL	LAPSSKS					137
M28-D02		LC				
QDIQMTQSPS	SLSASEGDMV	TITCRTSRRI	GTYNWYQQK	PGKAPKLLIY	GASSLQSGVP	60
SRFSGSGSGT	DFTLTVSSLQ	PEDVGTYCYQ	QSFSPWTFG	PGTKVEIK		108

ES 2 905 545 T3

M28-D02	HC					
EVQLLES GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	WYPMQWVRQA	PGKGLEWVS Y	IYPSGGGTDY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TATYYCATSS	GWLGDAFDIW	GQGTMTVTSS	120
ASTKGPSVFP	LAPSSKS					137
M28-D12	LC					
QDIQMTQSPS	SLSASVGDRV	TITCRASQSI	ATYLNWYQQK	PGRAPKLLIY	AASSLQSGVP	60
SRFVGGSGSG	GTHFTLTISS	LQPEDFATYY	CQSYSTRET	FGQGTKVEIK		110
M28-D12	HC					
EVQLLES GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	WYTMHWVRQA	PGKGLEWVS V	IYPSGGPTS Y	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TATYYCARDG	SGSYLGFDYW	GQGLTVTVSS	120
ASTKGPSVFP	LAPSSKS					137
M28-E01	LC					
QDIQMTQSPS	SLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSYLNWYQQK	PGKAPKLLIY	AASSLQSGVP	60
SKFSGSGSGT	DYTLTISSLQ	PEDFATYYCQ	QTYTTPWTFG	QGTKVEIK		108
M28-E01	HC					
EVQLLES GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	SYPMGWVRQA	PGKGLEWVS R	ISSSGGMTIY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARD D	WNVGMDVWGQ	GTTVTVSSAS	120
TKGPSVFPLA	PSSKS					135
M28-E11	LC					
QDIQMTQSPS	SVSASVGDRV	TINCRASQDI	SNWLAWYQQK	PGKAPNLLIY	AASSLQTGAP	60
SRFSGSGSGT	DFTLTIISSLQ	PEDFGTYVCQ	QSYSLPWTFG	LGTKVEVR		108
M28-E11	HC					
EVQLLES GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	LYDMTWVRQA	PGKGLEWVS G	ISSSGGVTIY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARTY	YYDSSGYADA	FDIWGQGT MV	120
TVSSASTKGP	SVFPLAPSSK	S				141
M28-F01	LC					
QDIQMTQSPS	SLSASVGDRV	TITCRASQSI	NTYLNWYQQK	PGKAPKVL I H	AASTLES GVP	60
SRFSGSGSGT	DFTLTIISSLQ	PEDFATYYCQ	QSYSTPPTFG	QGTKVEIK		108
M28-F01	HC					
EVQLLES GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	VYLMHWVRQA	PGKGLEWVS G	ISPSGGYTQY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARPG	GLDAFDIWGQ	GTMVTVSSAS	120
TKGPSVFPLA	PSSKS					135
M28-F05	LC					
QDIQMTQSPS	SLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSYLNWYQQK	PGKAPKLLIY	AASSLQSGVP	60
SRFSGSGSGT	DFTLTIISSLQ	PEDFATYYCQ	QSYSTPLTFG	GGTKVEIK		108
M28-F05	HC					
EVQLLES GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	RYIMWVVRQA	PGKGLEWVS G	IYSSGGYTQY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAMYCCAREL	EGLGGFDYWG	QGLTVTVSSA	120
STKGPSVFPL	APSSKS					136
M28-F07	LC					
QDIQMTQSPS	SVSASVGDRV	TITCRASQGI	SSWLAWYQQK	PGKAPKLLIY	ATSGLQSGVP	60
SRFSGSGSGT	DFTLTIISSLQ	PEDFATYYCQ	QAKSFPLTFG	GGTRVEIK		108
M28-F07	HC					
EVQLLES GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	DYTMWVVRQA	PGKGLEWVS S	IVPSGGHTLY	60

ES 2 905 545 T3

ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAKDH	LSSWYGGFFD	YWQGGLTVTV	120
SSASTKGPSV	FPLAPSSKS					139
M29-C07		LC				
QDIQMTQSPS	SLSASVGRV	TITCRASQSI	SSYLNWYQQK	PGKAPKLLIY	AASSLQSGVP	60
SRFSGSGSGT	DFTLTISLQ	PEDFATYYCQ	QSYSTRYTFG	QGTKLEIK		108
M29-C07		HC				
EVQLLES GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	GYDMMWVRQA	PGKGLEWVSV	ISSSGGNTAY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARES	SGLYYFDYWG	QGTLVTVSSA	120
STKGPSVFPL	APSSKS					136
M29-D10		LC				
QDIQMTQSPS	SLSASVGRV	TITCRASQSI	TIYLNWYQHK	PGKAPNLLIY	GASNLHSGVP	60
SRFSGSGSGT	DFTLTISLQ	PEDFATYYCQ	QSYDTPLTFG	GGTKVEIK		108
M29-D10		HC				
EVQLLES GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	WYPMYWVRQA	PGKGLEWVSS	IGSSGGPTPY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARWA	DYGGSLDYWG	QGTLVTVSSA	120
STKGPSVFPL	APSSKS					136
M29-E02		LC				
QSVLTQPPSV	SEAPRQRVTI	SCSGSSSNIG	NNAVSWYQQL	PGKAPKLLIY	YDDLPSGVS	60
DRFSGSGSGT	SASLAISGLR	SEDEADYYCA	AWDDSLNGFV	FGTGTKVTVL		110
M29-E02		HC				
EVQLLES GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	RYPMMWVRQA	PGKGLEWVSV	IYPSGGDTFY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCASGD	DYLWEAAVYW	QGTLVTVSS	120
ASTKGPSVFPL	LAPSSKS					137
M29-G08		LC				
QDIQMTQSPA	TLSASPGETV	TLSCRASQNI	GNDVAWYRQR	PGQAPRLLIH	HASTRAYGIP	60
ARLRGSGSAT	EFTLTITSLE	PEDFAIYYCQ	QFYDWPATF	ALGTRLEIKR		110
M29-G08		HC				
EVQLLES GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	YYHMMWVRQA	PGKGLEWVSG	ISPSGGFTFY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARDY	YYDSSGYSPL	GYWGQGLTVT	120
VSSASTKGPS	VFPLAPSSKS					140
M29-G10		LC				
QDIQMTQSPS	SLSSSVGDSA	TITCRASQSI	SIYLNWYQQK	PGKAPKILIY	GASQLESGVP	60
SRFSGSGSGT	DFTLTVSGLQ	PEDFATYWCQ	QSYNVPYTFG	QGTKLEIK		108
M29-G10		HC				
EVQLLES GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	FYKMIWVRQA	PGKGLEWVSS	ISSSGGSTQY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARDR	VDLGYLDYWG	QGTLVTVSSA	120
STKGPSVFPL	APSSKS					136
M74-A07		LC				
QDIQMTQSPS	SLSASVRDRV	TITCRTSQNI	NTYLNWYQA	PGRAPKLLIF	GVSSLHRGVS	60
SRFSGSGDGT	EFTLTISLQ	PEDIGTYFCQ	QSYSSPWTFG	QGTKVEIK		108
M74-A07		HC				
EVQLLES GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	QYLMWVRQA	PGKGLEWVSS	IYPSGGYTSY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARVS	TAVADNDYWG	QGTLVTVSSA	120
STKGPSVFPL	APSSKS					136

M76-F02		LC				
QDIQMTQSPS	SLSASVGDRV	TITCRASQTI	DNYLHWYQQK	PGKAPKVLII	DASSLQSGVP	60
PRFSGSGSGT	DFTLTISSLQ	PEDFATYYCQ	QSYDTPQYTF	QGQTKLEIK		109
M76-F02		HC				
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	LYDMNWVRQA	PGKGLEWVSG	ISPSGGQTMY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARQP	MISAFDIWGQ	GTMTVTSSAS	120
TKGPSVFPLA	PSSKS					135
M76-G02		LC				
QDIQMTQSPS	SLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSYLNWYQQK	PGKAPKLLIY	AASSLQSGVP	60
SRFSGSGSGT	DFTLTISSLQ	PEDFATYYCQ	QSYSTPPWTF	QGQTKVEIK		109
M76-G02		HC				
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	LYAMWWVRQA	PGKGLEWVSY	ISSSGGFTSY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARYR	VGVAATDYWG	QGTTLVTVSSA	120
STKGPSVFPL	APSSKS					136
M76-G06		LC				
QDIQMTQSPS	SLSASVRDRV	TITCRASQSI	STYLNWYQQK	PGEAPKLLVF	AASSLQSGVP	60
SRFSGSGSGT	DFTLSISSLQ	PEDFATYYCQ	QSYSTPHTFG	QGAKVEIK		108
M76-G06		HC				
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	GYIMHWVRQA	PGKGLEWVSW	IYPSGGWTEY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARD	PGVGAIIDYWG	QGTTLVTVSSA	120
STKGPSVFPL	APSSKS					136
M76-H02		LC				
QDIQMTQSPS	SLSASEGDRV	TITCRASQDI	SVYLNWYQMK	SGKAPKLLIY	GGASLQSGVP	60
ARFSGSGGYGT	DFTLTITDLR	PEDFATYYCQ	QSYSLPFTFG	GGTKVEIK		108
M76-H02		HC				
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	MYWMQWVRQA	PGKGLEWVSY	IYPSGGPTKY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARPS	GSYGDAFDIW	QGQTMVTVSS	120
ASTKGPSVFPL	LAPSSKS					137
M77-C07		LC				
QDIQMTQSPS	TLSASVGDRV	TITCRASQNI	SSYLNWYQQK	PGKAPKLLIY	AASSLQSGVP	60
SRFSGSGSGT	DFTLTISSLQ	PEDFATYSCQ	QSYSTPRTFG	QGQTKVEIK		108
M77-C07		HC				
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	LYIMGWVRQA	PGKGLEWVSG	IYPSGGFTMY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARES	SGVAAPDIWG	QGTTLVTVSSA	120
STKGPSVFPL	APSSKS					136
M77-H04		LC				
QDIQMTQSPL	SLPVTPEGPA	SISCRSSQSL	LHSRGYNYLD	WYLQKPGQSP	QLLIYLGSNR	60
ASGVDPDRFSG	SGSGTDFTLK	ISRVEAEDVG	VYYCMQALQR	RTFGQGQTKLE	IK	112
M77-H04		HC				
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	YYTMIWVRQA	PGKGLEWVSG	IRSSGGGTRY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAKDG	SRYSYGSIIY	YGMDAWGQG	120
TTVTVSSAST	KGPSVEPLAP	SSKS				141

EJEMPLO 2: Inhibidores de partida de anticuerpos

Se seleccionaron anticuerpos como inhibidores de partida de caliceína plasmática basándose en la constante de inhibición aparente ($K_{i,ap}$), especificidad con respecto a la ausencia de inhibición de otras serina proteasas, inhibición de la generación de bradiquinina y ausencia de unión a precaliceína plasmática (**Tabla 3**). La caliceína plasmática circula en el plasma como un zimógeno inactivo (precaliceína) a una concentración de aproximadamente 500 nM. Los anticuerpos que se unieron a precaliceína se pueden volver inaccesibles hacia la inhibición de caliceína plasmática activa y podrían aumentar sustancialmente la dosis *in vivo* requerida para la eficacia. Por tanto, se usó un ensayo de resonancia de plasmones superficiales (SPR) para identificar anticuerpos que no se unen a precaliceína (datos no mostrados). Específicamente, se capturaron IgG humanas (X81-B01, M162-A04 (R84-H05); M160-G12 (R84-D02); y M142-H08) en un chip CM5 usando una superficie anti-Fc humana y 100 nM de caliceína plasmática o precaliceína 100 nM o 500 nM. La precaliceína se trató con aprotinina-Sepharose para retirar la caliceína plasmática activa. La precaliceína usada para X81-B01 se cambió de tampón en la preparación exacta de tampón de electroforesis SPR (solución salina tamponada con HEPES) para evitar el desplazamiento del índice de refracción que se observó con los otros tres anticuerpos que se probaron: M162-A04 (R84-H05); M160-G12 (R84-D02); y M142-H08.

De los anticuerpos enumerados en la **Tabla 3**, solo M142-H08 inhibe la calicreína plasmática humana con una $K_{i,ap}$ subnanomolar. Sin embargo, cuando M142-H08 se produjo como una IgG, se encontró que se escindió en la CDR3 de la cadena pesada. Por consiguiente, los presentes inventores decidieron realizar dos enfoques para mejorar la afinidad: 1) maduración por afinidad de M162-A04 y M160-G12 usando una novedosa forma de barajado de cadenas ligeras denominado ROLIC (optimización rápida de cadenas ligeras, por la expresión inglesa Rapid Optimizacion of Light Chains) (véanse, por ejemplo, los documentos WO 2009/102927 y US 2009-0215119); y 2) optimización de secuencias de M142-H08 con el fin de prevenir la escisión de la IgG que ocurre mientras que se retiene las propiedades de unión e inhibitoras de M142-H08.

Tabla 3. Inhibidores de anticuerpos de alto rango de pCal antes de la maduración por afinidad u optimización de secuencias

Criterios	M162-A04	M160-G12	M142-H08 ^a
$K_{i,ap}$ de pCal humana	2 nM (como una IgG)	5,6 nM (como una IgG)	0,6 nM (como un Fab)
$K_{i,ap}$ de pCal de roedor	2 nM (ratón y rata)	<1 nM (ratón)	~ 1 nM (ratón y rata)
¿Se une a precalicreína?	No	No	No
Inhibidor específico con respecto a fXIa, plasmina y tripsina	Sí	Sí	Sí
Inhibe la generación de bradiquinina	Sí	Sí	Sí

^aCuando M142-H08 se produjo como una IgG se determinó que se escindía en la CDR3 de su cadena pesada (GGLLLWFR-ELKSNYFDY).

EJEMPLO 3: Secuencia Optimización de M142-H08

De los anticuerpos enumerados en la **Tabla 3**, solo M142-H08 inhibe pCal humana con una $K_{i,ap}$ subnanomolar. Sin embargo, cuando M142-H08 se produjo como una IgG, se encontró que se escindía en la CDR3 de la cadena pesada. Se encontró por espectrometría de masas que M142-H08 se escindía después de la arginina en la secuencia "WFR" de la secuencia de HC-CDR3 (GGLLLWFRELKSNYFDY). Esta escisión sugiere que una proteasa de las células usadas para expresar el anticuerpo (tanto células CHO como 293T de riñón humano) escinde enzimáticamente el anticuerpo en un único sitio específico. Los presentes inventores mutaron la secuencia de HC-CDR3 de M142-H08 con el fin de identificar sustituciones de aminoácidos que previnieran la escisión de la IgG que ocurre mientras se retiene las propiedades de unión e inhibitoras de M142-H08. Experiencia previa con anticuerpos similarmente "acortados" sugirieron que centrarse simplemente en la posición P1 original (subsitio 1 de proteasa, véase la **Tabla 4**) puede no ser suficiente para identificar anticuerpos que retienen potente inhibición de la enzima diana mientras que no se acortan por una proteasa de la célula hospedadora. Por tanto, los presentes inventores crearon una pequeña biblioteca de mutaciones puntuales individuales en la región alrededor del sitio de escisión con el fin de identificar variantes de M142-H08 que no son acortadas, pero son todavía potentes inhibidores de pCal. Los presentes inventores se refieren a esta biblioteca como la biblioteca "CDR3 por diseño". La pequeña biblioteca se construyó usando un cebador de PCR que contiene el codón aleatorizado NNK en cualquiera del sitio P3, P2, P1 o P1'. Esto da como resultado una pequeña biblioteca donde cada una de las 4 posiciones puede contener cualquiera de los 20 aminoácidos (20 + 20 + 20 + 20 = 80 miembros). Usando PCR, esta biblioteca se clonó en la secuencia de Fab de M142-H08 en el vector pMid21, que es un vector de fagémido patrón.

Tabla 4. Secuencias de cebadores

Nombre del cebador	Secuencia	N
	P3 P2 P1 P1' P2'	
	G G L L L W F R E L K S N Y	
559A.P1.top	GGC GGT CTA TTA CTA TGG TTC NNK GAG CTG AAG TCT AAC TAC	20

(continuación)

Nombre del cebador	Secuencia	N
559A.P2.top	GGC GGT CTA TTA CTA TGG NNK AGG GAG CTG AAG TCT AAC TAC	20
559A.P3.top	GGC GGT CTA TTA CTA NNK TTC AGG GAG CTG AAG TCT AAC TAC	20
559A.P1p.top	GGC GGT CTA TTA CTA TGG TTC AGG NNK CTG AAG TCT AAC TAC	20

Por secuenciación de ADN, los presentes inventores recuperaron 61 de los posibles 80 anticuerpos (**Tabla 5**). Estos anticuerpos se produjeron como fragmentos Fab en pequeña escala (~20 µg) y se probaron para la inhibición contra pCal humana en un ensayo de escisión por proteasa *in vitro* usando Pro-Phe-Arg-aminometilcumarina como el sustrato de péptido sintético. Los Fab que se encontró que eran inhibidores de pCal humana se subclonaron en el vector pBRHf de los presentes inventores (un vector para la expresión transitoria de IgG en células 293T) para la conversión en anticuerpos IgG1 humana de longitud completa. Entonces se expresaron cinco anticuerpos en células 293T y se purificaron por cromatografía en proteína A Sepharose. Los anticuerpos se analizaron por SDS-PAGE para determinar que los mutantes inhibidores no se escinden por la(s) proteasa(s) de la célula hospedadora (datos no mostrados). Los anticuerpos escindidos (559A-X67-G05, 559A-X67-H01, 559A-X67-G09) tuvieron una banda adicional que migró entre el marcador de 38 y 49 kDa de peso molecular. Esta banda está ausente en los anticuerpos 559A-X67-H04 y 559A-X67-D03, que indica que estos anticuerpos están intactos.

Se determinaron valores de $K_{i,ap}$ por cinética enzimática de estado estacionario para aquellos que se mostró por SDS-PAGE que no se habían escindido (**Tabla 5**). De forma interesante, la posición P2 fue la única posición donde las sustituciones de aminoácidos dieron inhibidores de anticuerpos intactos de pCal. De las 14 mutaciones diferentes que se recuperaron en la posición P3 (**Tabla 5**), solo se encontró que un mutante (W a L) era un inhibidor de pCal como un Fab, pero posteriormente se mostró que estaba acortado como una IgG. Ninguna de las 16 mutaciones diferentes en la posición P1 (**Tabla 5**) se encontró que fuera inhibidores de pCal. Se encontró que ocho de las 15 mutaciones diferentes en la posición P1' eran inhibidores de pCal como un Fab, pero todas se acortaron como una IgG. Por consiguiente, solo las mutaciones en la posición P2 condujeron a inhibidores de anticuerpo, que no se acortaron durante expresión. De las 16 mutaciones diferentes que se recuperaron en la posición P2 (**Tabla 5**), se encontró que ocho mutantes eran un inhibidor de pCal como un Fab, pero se mostró posteriormente que se acortaron como una IgG. Se encontró que cuatro mutantes en la posición P2 tenían valores de $K_{i,ap}$ subnanomolares: X67-G04 (F a A), X67-C03 (F a M), X67-F01 (F a Q) y X67-D03 (F a N). El anticuerpo con la mayor potencia es X67-D03 ($K_{i,ap} = 0,1$ nM). Los dos anticuerpos mostrados en la **Tabla 6** no se escindieron cuando se expresaron como IgG y se encontró que inhibieron pCal con una $K_{i,ap}$ subnanomolar.

Se muestran en las **FIGURAS 4 y 5**, respectivamente, el ADN y el alineamiento de secuencias de aminoácidos de las cadenas ligeras de las versiones no retromutadas a la línea germinal (X63-G06) y optimizadas en codones retromutadas a la línea germinal (X81-B01) del mismo anticuerpo usando maduración por afinidad ROLIC. Se muestran en las **FIGURAS 6 y 7**, respectivamente, el ADN y el alineamiento de secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas de las versiones no retromutadas a la línea germinal (X63-G06) y optimizadas en codones retromutadas a la línea germinal (X81-B01) del mismo anticuerpo usando maduración por afinidad ROLIC.

Tabla 5. Secuencias de HV-CDR3 obtenidas de la biblioteca "CDR3 por diseño" *

Sitio de mutación	I.D. de anticuerpo	HV-CDR3	¿Inhiben como un Fab?	¿Intactas como una IgG?	$K_{i,ap}$ como una IgG (nM)
Parental	X69-C09	GGLLLWFRELKSNFYDY	Sí	No	0,2
P3	X68-E07	GGLLLAFRELKSNFYDY	No	n/a	n/a
P3	X68-E12	GGLLLCFRELKSNFYDY	No	n/a	n/a
P3	X68-A03	GGLLLDFRELKSNFYDY	No	n/a	n/a
P3	X68-E03	GGLLLEFRELKSNFYDY	No	n/a	n/a
P3	X68-A12	GGLLLGFRELKSNFYDY	No	n/a	n/a

(continuación)

Sitio de mutación	I.D. de anticuerpo	HV-CDR3	¿Inhiben como un Fab?	¿Intactas como una IgG?	Ki,ap como una IgG (nM)
P3	X68-D11	GGLLL K FRELKSNYFDY	No	n/a	n/a
P3	X68-E01	GGLLL L FRELKSNYFDY	Sí	No	n/a
P3	X68-F05	GGLLL M FRELKSNYFDY	No	n/a	n/a
P3	X68-D10	GGLLL P FRELKSNYFDY	No	n/a	n/a
P3	X68-F10	GGLLL Q FRELKSNYFDY	No	n/a	n/a
P3	X68-G01	GGLLL R FRELKSNYFDY	No	n/a	n/a
P3	X68-G05	GGLLL S FRELKSNYFDY	No	n/a	n/a
P3	X68-F12	GGLLL T FRELKSNYFDY	No	n/a	n/a
P3	X68-H04	GGLLL V FRELKSNYFDY	No	n/a	n/a
P2	X67-G04	GGLLL W ARELKSNYFDY	Sí	Sí	0,35
P2	X67-G01	GGLLL W CRELKSNYFDY	No	n/a	n/a
P2	X67-E04	GGLLL W DRELKSNYFDY	Sí	Sí	1,3
P2	X67-H04	GGLLL W ERELKSNYFDY	Sí	Sí	3,6
P2	X67-C09	GGLLL W GRELKSNYFDY	Sí	Sí	8,6
P2	X67-B04	GGLLL W KRELKSNYFDY	Sí	No	n/a
P2	X67-G09	GGLLL W LRELKSNYFDY	Sí	No	n/a
P2	X67-C03	GGLLL W MRELKSNYFDY	Sí	Sí	0,7
P2	X67-D03	GGLLL W NRELKSNYFDY	Sí	Sí	0,1
P2	X67-B05	GGLLL W PRELKSNYFDY	No	n/a	n/a
P2	X67-F01	GGLLL W QRELKSNYFDY	Sí	Sí	0,9
P2	X67-G05	GGLLL W RRELKSNYFDY	Sí	No	n/a
P2	X67-B03	GGLLL W SRELKSNYFDY	Sí	Sí	2,1
P2	X67-F10	GGLLL W TRELKSNYFDY	Sí	Sí	1,3
P2	X67-H01	GGLLL W WRELKSNYFDY	Sí	No	n/a
P2	X67-F08	GGLLL W YRELKSNYFDY	Sí	No	n/a
P1	X66-E09	GGLLL W F A ELKSNYFDY	No	n/a	n/a
P1	X66-B05	GGLLL W F C ELKSNYFDY	No	n/a	n/a
P1	X66-D03	GGLLL W F E ELKSNYFDY	No	n/a	n/a
P1	X66-H04	GGLLL W F F ELKSNYFDY	No	n/a	n/a
P1	X66-H02	GGLLL W F G ELKSNYFDY	No	n/a	n/a
P1	X66-C11	GGLLL W F H ELKSNYFDY	No	n/a	n/a
P1	X66-A07	GGLLL W F K ELKSNYFDY	No	n/a	n/a
P1	X66-C03	GGLLL W F L ELKSNYFDY	No	n/a	n/a

(continuación)

Sitio de mutación	I.D. de anticuerpo	HV-CDR3	¿Inhiben como un Fab?	¿Intactas como una IgG?	Ki,ap como una IgG (nM)
P1	X66-G05	GGLLLWF M ELKSNYFDY	No	n/a	n/a
P1	X66-F10	GGLLLWF P ELKSNYFDY	No	n/a	n/a
P1	X66-E04	GGLLLWF Q ELKSNYFDY	No	n/a	n/a
P1	X66-F01	GGLLLWF S ELKSNYFDY	No	n/a	n/a
P1	X66-H11	GGLLLWF T ELKSNYFDY	No	n/a	n/a
P1	X66-C02	GGLLLWF V ELKSNYFDY	No	n/a	n/a
P1	X66-F09	GGLLLWF W ELKSNYFDY	No	n/a	n/a
P1	X66-G08	GGLLLWF Y ELKSNYFDY	No	n/a	n/a
P1'	X69-D08	GGLLLWFR A LKSNYFDY	No	n/a	n/a
P1'	X69-B02	GGLLLWFR C LKSNYFDY	No	n/a	n/a
P1'	X69-D09	GGLLLWFR G LKSNYFDY	Sí	No	n/a
P1'	X69-D02	GGLLLWFR H LKSNYFDY	No	n/a	n/a
P1'	X69-A12	GGLLLWFR K LKSNYFDY	No	n/a	n/a
P1'	X69-F05	GGLLLWFR L LKSNYFDY	Sí	No	n/a
P1'	X69-B08	GGLLLWFR N LKSNYFDY	Sí	No	n/a
P1'	X69-A10	GGLLLWFR P LKSNYFDY	No	n/a	n/a
P1'	X69-A09	GGLLLWFR Q LKSNYFDY	Sí	No	n/a
P1'	X69-E05	GGLLLWFR R LKSNYFDY	No	n/a	n/a
P1'	X69-F09	GGLLLWFR S LKSNYFDY	Sí	No	n/a
P1'	X69-F01	GGLLLWFR T LKSNYFDY	Sí	No	n/a
P1'	X69-C12	GGLLLWFR V LKSNYFDY	Sí	No	n/a
P1'	X69-E01	GGLLLWFR W LKSNYFDY	Sí	No	n/a
P1'	X69-H10	GGLLLWFR I LKSNYFDY	No	n/a	n/a
*Todos estos anticuerpos son mutaciones puntuales únicas de la secuencia de M142-H08.					

Se muestran a continuación las secuencias de aminoácidos del dominio variable de la cadena ligera (LC) y cadena pesada (HC) de anticuerpos pCal con HC-CDR3 diseñadas.

ES 2 905 545 T3

X68-E07 LC
 QDIQMTQSPS SLSAFVGDRV TITCRASQPI DNYLNWYHQB PGKAPKLLIY AASRLQSGVP 60
 SRLSGSGFGT DFTLTISLQ PEDFGNYCQ QSYTVPYTFG GGTKVEIR 108

X68-E07 HC
 EVQLLESQGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS AYSMIWVRQA PGKGLEWVSF IRPSGGRTTY 60
 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARGG LLLAFRELKS NYFDYWGGGT 120
 LVTVSSASTK GPSVFPLAPS SKS 143

X68-E12 LC
 QDIQMTQSPS SLSAFVGDRV TITCRASQPI DNYLNWYHQB PGKAPKLLIY AASRLQSGVP 60
 SRLSGSGFGT DFTLTISLQ PEDFGNYCQ QSYTVPYTFG GGTKVEIR 108

X68-E12 HC
 EVQLLESQGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS AYSMIWVRQA PGKGLEWVSF IRPSGGRTTY 60
 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARGG LLLCFRELKS NYFDYWGGGT 120
 LVTVSSASTK GPSVFPLAPS SKS 143

X68-A03 LC
 QDIQMTQSPS SLSAFVGDRV TITCRASQPI DNYLNWYHQB PGKAPKLLIY AASRLQSGVP 60
 SRLSGSGFGT DFTLTISLQ PEDFGNYCQ QSYTVPYTFG GGTKVEIR 108

X68-A03 HC
 EVQLLESQGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS AYSMIWVRQA PGKGLEWVSF IRPSGGRTTY 60
 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARGG LLLDFRELKS NYFDYWGGGT 120
 LVTVSSASTK GPSVFPLAPS SKS 143

X68-E03 LC
 QDIQMTQSPS SLSAFVGDRV TITCRASQPI DNYLNWYHQB PGKAPKLLIY AASRLQSGVP 60
 SRLSGSGFGT DFTLTISLQ PEDFGNYCQ QSYTVPYTFG GGTKVEIR 108

X68-E03 HC
 EVQLLESQGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS AYSMIWVRQA PGKGLEWVSF IRPSGGRTTY 60

ES 2 905 545 T3

ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARGG	LLLEFRELKS	NYFDYWGQGT	120
LVTVSSASTK	GPSVFPLAPS	SKS				143
X68-A12 LC						
QDIQMTQSPS	SLSAFVGDRV	TITCRASQPI	DNYLNWYHQK	PGKAPKLLIY	AASRLQSGVP	60
SRLSGSGFGT	DFTLTISLQ	PEDFGNYCQ	QSYTVPYTFG	GGTKVEIR		108
X68-A12 HC						
EVQLLES GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	AYSMIWRQA	PGKGLEWVS Y	IRPSGGRTTY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARGG	LLLGFRELKS	NYFDYWGQGT	120
LVTVSSASTK	GPSVFPLAPS	SKS				143
X68-D11 LC						
QDIQMTQSPS	SLSAFVGDRV	TITCRASQPI	DNYLNWYHQK	PGKAPKLLIY	AASRLQSGVP	60
SRLSGSGFGT	DFTLTISLQ	PEDFGNYCQ	QSYTVPYTFG	GGTKVEIR		108
X68-D11 HC						
EVQLLES GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	AYSMIWRQA	PGKGLEWVS Y	IRPSGGRTTY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARGG	LLLKFRELKS	NYFDYWGQGT	120
LVTVSSASTK	GPSVFPLAPS	SKS				143
X68-E01 LC						
QDIQMTQSPS	SLSAFVGDRV	TITCRASQPI	DNYLNWYHQK	PGKAPKLLIY	AASRLQSGVP	60
SRLSGSGFGT	DFTLTISLQ	PEDFGNYCQ	QSYTVPYTFG	GGTKVEIR		108
X68-E01 HC						
EVQLLES GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	AYSMIWRQA	PGKGLEWVS Y	IRPSGGRTTY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARGG	LLLLFRELKS	NYFDYWGQGT	120
LVTVSSASTK	GPSVFPLAPS	SKS				143
X68-F05 LC						
QDIQMTQSPS	SLSAFVGDRV	TITCRASQPI	DNYLNWYHQK	PGKAPKLLIY	AASRLQSGVP	60
SRLSGSGFGT	DFTLTISLQ	PEDFGNYCQ	QSYTVPYTFG	GGTKVEIR		108
X68-F05 HC						
EVQLLES GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	AYSMIWRQA	PGKGLEWVS Y	IRPSGGRTTY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARGG	LLLMFRELKS	NYFDYWGQGT	120
LVTVSSASTK	GPSVFPLAPS	SKS				143
X68-D10 LC						
QDIQMTQSPS	SLSAFVGDRV	TITCRASQPI	DNYLNWYHQK	PGKAPKLLIY	AASRLQSGVP	60
SRLSGSGFGT	DFTLTISLQ	PEDFGNYCQ	QSYTVPYTFG	GGTKVEIR		108
X68-D10 HC						
EVQLLES GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	AYSMIWRQA	PGKGLEWVS Y	IRPSGGRTTY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARGG	LLLPFRELKS	NYFDYWGQGT	120
LVTVSSASTK	GPSVFPLAPS	SKS				143
X68-F10 LC						
QDIQMTQSPS	SLSAFVGDRV	TITCRASQPI	DNYLNWYHQK	PGKAPKLLIY	AASRLQSGVP	60
SRLSGSGFGT	DFTLTISLQ	PEDFGNYCQ	QSYTVPYTFG	GGTKVEIR		108
X68-F10 HC						
EVQLLES GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	AYSMIWRQA	PGKGLEWVS Y	IRPSGGRTTY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARGG	LLLQFRELKS	NYFDYWGQGT	120
LVTVSSASTK	GPSVFPLAPS	SKS				143

ES 2 905 545 T3

X68-G01 LC						
QDIQMTQSPS	SLSAFVGDRV	TITCRASQPI	DNYLNWYHQK	PGKAPKLLIY	AASRLQSGVP	60
SRLSGSGFGT	DFTLTISLQ	PEDFGNYCQ	QSYTVPYTFG	GGTKVEIR		108
X68-G01 HC						
EVQLLES GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	AYSMIWRQA	PGKGLEWVS Y	IRPSGGRTTY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARGG	LLLRFRELKS	NYFDYWGGT	120
LVTVSSASTK	GPSVFPLAPS	SKS				143
X68-G05 LC						
QDIQMTQSPS	SLSAFVGDRV	TITCRASQPI	DNYLNWYHQK	PGKAPKLLIY	AASRLQSGVP	60
SRLSGSGFGT	DFTLTISLQ	PEDFGNYCQ	QSYTVPYTFG	GGTKVEIR		108
X68-G05 HC						
EVQLLES GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	AYSMIWRQA	PGKGLEWVS Y	IRPSGGRTTY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARGG	LLLSFRELKS	NYFDYWGGT	120
LVTVSSASTK	GPSVFPLAPS	SKS				143
X68-F12 LC						
QDIQMTQSPS	SLSAFVGDRV	TITCRASQPI	DNYLNWYHQK	PGKAPKLLIY	AASRLQSGVP	60
SRLSGSGFGT	DFTLTISLQ	PEDFGNYCQ	QSYTVPYTFG	GGTKVEIR		108
X68-F12 HC						
EVQLLES GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	AYSMIWRQA	PGKGLEWVS Y	IRPSGGRTTY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARGG	LLLTRELKS	NYFDYWGGT	120
LVTVSSASTK	GPSVFPLAPS	SKS				143
X68-H04 LC						
QDIQMTQSPS	SLSAFVGDRV	TITCRASQPI	DNYLNWYHQK	PGKAPKLLIY	AASRLQSGVP	60
SRLSGSGFGT	DFTLTISLQ	PEDFGNYCQ	QSYTVPYTFG	GGTKVEIR		108
X68-H04 HC						
EVQLLES GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	AYSMIWRQA	PGKGLEWVS Y	IRPSGGRTTY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARGG	LLLVRELKS	NYFDYWGGT	120
LVTVSSASTK	GPSVFPLAPS	SKS				143
X67-G04 LC						
QDIQMTQSPS	SLSAFVGDRV	TITCRASQPI	DNYLNWYHQK	PGKAPKLLIY	AASRLQSGVP	60
SRLSGSGFGT	DFTLTISLQ	PEDFGNYCQ	QSYTVPYTFG	GGTKVEIR		108
X67-G04 HC						
EVQLLES GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	AYSMIWRQA	PGKGLEWVS Y	IRPSGGRTTY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARGG	LLLWARELKS	NYFDYWGGT	120
LVTVSSASTK	GPSVFPLAPS	SKS				143
X67-G01 LC						
QDIQMTQSPS	SLSAFVGDRV	TITCRASQPI	DNYLNWYHQK	PGKAPKLLIY	AASRLQSGVP	60
SRLSGSGFGT	DFTLTISLQ	PEDFGNYCQ	QSYTVPYTFG	GGTKVEIR		108
X67-G01 HC						
EVQLLES GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	AYSMIWRQA	PGKGLEWVS Y	IRPSGGRTTY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARGG	LLLWCRELKS	NYFDYWGGT	120
LVTVSSASTK	GPSVFPLAPS	SKS				143
X67-E04 LC						
QDIQMTQSPS	SLSAFVGDRV	TITCRASQPI	DNYLNWYHQK	PGKAPKLLIY	AASRLQSGVP	60
SRLSGSGFGT	DFTLTISLQ	PEDFGNYCQ	QSYTVPYTFG	GGTKVEIR		108

ES 2 905 545 T3

X67-E04 HC						
EVQLLES	GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	AYSMIWVRQA	PGKGLEWVSY	IRPSGGRTTY 60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARGG	LLLWDRELKS	NYFDYWGGGT	120
LVTVSSASTK	GPSVFPLAPS	SKS				143
X67-H04 LC						
QDIQMTQSPS	SLSAFVGDRV	TITCRASQPI	DNYLNWYHQK	PGKAPKLLIY	AASRLQSGVP	60
SRLSGSGFGT	DFTLTISLQ	PEDFGNYCQ	QSYTVPYTFG	GGTKVEIR		108
X67-H04 HC						
EVQLLES	GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	AYSMIWVRQA	PGKGLEWVSY	IRPSGGRTTY 60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARGG	LLLWERELKS	NYFDYWGGGT	120
LVTVSSASTK	GPSVFPLAPS	SKS				143
X66-E09 LC						
QDIQMTQSPS	SLSAFVGDRV	TITCRASQPI	DNYLNWYHQK	PGKAPKLLIY	AASRLQSGVP	60
SRLSGSGFGT	DFTLTISLQ	PEDFGNYCQ	QSYTVPYTFG	GGTKVEIR		108
X66-E09 HC						
EVQLLES	GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	AYSMIWVRQA	PGKGLEWVSY	IRPSGGRTTY 60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARGG	LLLWFAELKS	NYFDYWGGGT	120
LVTVSSASTK	GPSVFPLAPS	SKS				143
X66-B05 LC						
QDIQMTQSPS	SLSAFVGDRV	TITCRASQPI	DNYLNWYHQK	PGKAPKLLIY	AASRLQSGVP	60
SRLSGSGFGT	DFTLTISLQ	PEDFGNYCQ	QSYTVPYTFG	GGTKVEIR		108
X66-B05 HC						
EVQLLES	GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	AYSMIWVRQA	PGKGLEWVSY	IRPSGGRTTY 60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARGG	LLLWFCELKS	NYFDYWGGGT	120
LVTVSSASTK	GPSVFPLAPS	SKS				143
X66-D03 LC						
QDIQMTQSPS	SLSAFVGDRV	TITCRASQPI	DNYLNWYHQK	PGKAPKLLIY	AASRLQSGVP	60
SRLSGSGFGT	DFTLTISLQ	PEDFGNYCQ	QSYTVPYTFG	GGTKVEIR		108
X66-D03 HC						
EVQLLES	GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	AYSMIWVRQA	PGKGLEWVSY	IRPSGGRTTY 60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARGG	LLLWFEELKS	NYFDYWGGGT	120
LVTVSSASTK	GPSVFPLAPS	SKS				143
X66-H04 LC						
QDIQMTQSPS	SLSAFVGDRV	TITCRASQPI	DNYLNWYHQK	PGKAPKLLIY	AASRLQSGVP	60
SRLSGSGFGT	DFTLTISLQ	PEDFGNYCQ	QSYTVPYTFG	GGTKVEIR		108
X66-H04 HC						
EVQLLES	GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	AYSMIWVRQA	PGKGLEWVSY	IRPSGGRTTY 60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARGG	LLLWFFELKS	NYFDYWGGGT	120
LVTVSSASTK	GPSVFPLAPS	SKS				143
X66-H02 LC						
QDIQMTQSPS	SLSAFVGDRV	TITCRASQPI	DNYLNWYHQK	PGKAPKLLIY	AASRLQSGVP	60
SRLSGSGFGT	DFTLTISLQ	PEDFGNYCQ	QSYTVPYTFG	GGTKVEIR		108
X66-H02 HC						
EVQLLES	GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	AYSMIWVRQA	PGKGLEWVSY	IRPSGGRTTY 60

ES 2 905 545 T3

ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMHSRAED	TAVYYCARGG	LLLWFGEKLS	NYFDYWGQGT	120
LVTVSSASTK	GPSVFPLAPS	SKS				143
X66-C11 LC						
QDIQMTQSPS	SLSAFVGDV	TITCRASQPI	DNYLNWYHQK	PGKAPKLLIY	AASRLQSGVP	60
SRLSGSGFGT	DFTLTISLQ	PEDFGNYCQ	QSYTVPYTFG	GGTKVEIR		108
X66-C11 HC						
EVQLLESQGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	AYSMIWRQA	PGKGLEWVS	IRPSGGRTTY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSRAED	TAVYYCARGG	LLLWFHEKLS	NYFDYWGQGT	120
LVTVSSASTK	GPSVFPLAPS	SKS				143
X66-A07 LC						
QDIQMTQSPS	SLSAFVGDV	TITCRASQPI	DNYLNWYHQK	PGKAPKLLIY	AASRLQSGVP	60
SRLSGSGFGT	DFTLTISLQ	PEDFGNYCQ	QSYTVPYTFG	GGTKVEIR		108
X66-A07 HC						
EVQLLESQGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	AYSMIWRQA	PGKGLEWVS	IRPSGGRTTY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSRAED	TAVYYCARGG	LLLWFHEKLS	NYFDYWGQGT	120
LVTVSSASTK	GPSVFPLAPS	SKS				143
X66-C03 LC						
QDIQMTQSPS	SLSAFVGDV	TITCRASQPI	DNYLNWYHQK	PGKAPKLLIY	AASRLQSGVP	60
SRLSGSGFGT	DFTLTISLQ	PEDFGNYCQ	QSYTVPYTFG	GGTKVEIR		108
X66-C03 HC						
EVQLLESQGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	AYSMIWRQA	PGKGLEWVS	IRPSGGRTTY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSRAED	TAVYYCARGG	LLLWFHEKLS	NYFDYWGQGT	120
LVTVSSASTK	GPSVFPLAPS	SKS				143
X66-G05 LC						
QDIQMTQSPS	SLSAFVGDV	TITCRASQPI	DNYLNWYHQK	PGKAPKLLIY	AASRLQSGVP	60
SRLSGSGFGT	DFTLTISLQ	PEDFGNYCQ	QSYTVPYTFG	GGTKVEIR		108
X66-G05 HC						
EVQLLESQGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	AYSMIWRQA	PGKGLEWVS	IRPSGGRTTY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSRAED	TAVYYCARGG	LLLWFHEKLS	NYFDYWGQGT	120
LVTVSSASTK	GPSVFPLAPS	SKS				143
X66-F10 LC						
QDIQMTQSPS	SLSAFVGDV	TITCRASQPI	DNYLNWYHQK	PGKAPKLLIY	AASRLQSGVP	60
SRLSGSGFGT	DFTLTISLQ	PEDFGNYCQ	QSYTVPYTFG	GGTKVEIR		108
X66-F10 HC						
EVQLLESQGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	AYSMIWRQA	PGKGLEWVS	IRPSGGRTTY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSRAED	TAVYYCARGG	LLLWFHEKLS	NYFDYWGQGT	120
LVTVSSASTK	GPSVFPLAPS	SKS				143
X66-E04 LC						
QDIQMTQSPS	SLSAFVGDV	TITCRASQPI	DNYLNWYHQK	PGKAPKLLIY	AASRLQSGVP	60
SRLSGSGFGT	DFTLTISLQ	PEDFGNYCQ	QSYTVPYTFG	GGTKVEIR		108
X66-E04 HC						
EVQLLESQGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	AYSMIWRQA	PGKGLEWVS	IRPSGGRTTY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSRAED	TAVYYCARGG	LLLWFHEKLS	NYFDYWGQGT	120
LVTVSSASTK	GPSVFPLAPS	SKS				143

ES 2 905 545 T3

X69-D08 LC						
QDIQMTQSPS	SLSAFVGDRV	TITCRASQPI	DNYLNWYHQK	PGKAPKLLIY	AASRLQSGVP	60
SRLSGSGFGT	DFTLTISLQ	PEDFGNYCQ	QSYTVPYTFG	GGTKVEIR		108
X69-D08 HC						
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	AYSMIWVRQA	PGKGLEWVSY	IRPSGGRTTY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARGG	LLLWFRALKS	NYFDYWGGGT	120
LVTVSSASTK	GPSVFPLAPS	SKS				143
X69-B02 LC						
QDIQMTQSPS	SLSAFVGDRV	TITCRASQPI	DNYLNWYHQK	PGKAPKLLIY	AASRLQSGVP	60
SRLSGSGFGT	DFTLTISLQ	PEDFGNYCQ	QSYTVPYTFG	GGTKVEIR		108
X69-B02 HC						
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	AYSMIWVRQA	PGKGLEWVSY	IRPSGGRTTY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARGG	LLLWFRCLKS	NYFDYWGGGT	120
LVTVSSASTK	GPSVFPLAPS	SKS				143
X69-C09 LC						
QDIQMTQSPS	SLSAFVGDRV	TITCRASQPI	DNYLNWYHQK	PGKAPKLLIY	AASRLQSGVP	60
SRLSGSGFGT	DFTLTISLQ	PEDFGNYCQ	QSYTVPYTFG	GGTKVEIR		108
X69-C09 HC						
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	AYSMIWVRQA	PGKGLEWVSY	IRPSGGRTTY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARGG	LLLWFRELKS	NYFDYWGGGT	120
LVTVSSASTK	GPSVFPLAPS	SKS				143
X69-D09 LC						
QDIQMTQSPS	SLSAFVGDRV	TITCRASQPI	DNYLNWYHQK	PGKAPKLLIY	AASRLQSGVP	60
SRLSGSGFGT	DFTLTISLQ	PEDFGNYCQ	QSYTVPYTFG	GGTKVEIR		108
X69-D09 HC						
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	AYSMIWVRQA	PGKGLEWVSY	IRPSGGRTTY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARGG	LLLWFRGLKS	NYFDYWGGGT	120
LVTVSSASTK	GPSVFPLAPS	SKS				143
X69-D02 LC						
QDIQMTQSPS	SLSAFVGDRV	TITCRASQPI	DNYLNWYHQK	PGKAPKLLIY	AASRLQSGVP	60
SRLSGSGFGT	DFTLTISLQ	PEDFGNYCQ	QSYTVPYTFG	GGTKVEIR		108
X69-D02 HC						
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	AYSMIWVRQA	PGKGLEWVSY	IRPSGGRTTY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARGG	LLLWFRHLKS	NYFDYWGGGT	120
LVTVSSASTK	GPSVFPLAPS	SKS				143
X69-A12 LC						
QDIQMTQSPS	SLSAFVGDRV	TITCRASQPI	DNYLNWYHQK	PGKAPKLLIY	AASRLQSGVP	60
SRLSGSGFGT	DFTLTISLQ	PEDFGNYCQ	QSYTVPYTFG	GGTKVEIR		108
X69-A12 HC						
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	AYSMIWVRQA	PGKGLEWVSY	IRPSGGRTTY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARGG	LLLWFRKLKS	NYFDYWGGGT	120
LVTVSSASTK	GPSVFPLAPS	SKS				143
X69-F05 LC						
QDIQMTQSPS	SLSAFVGDRV	TITCRASQPI	DNYLNWYHQK	PGKAPKLLIY	AASRLQSGVP	60
SRLSGSGFGT	DFTLTISLQ	PEDFGNYCQ	QSYTVPYTFG	GGTKVEIR		108

ES 2 905 545 T3

X69-F05 HC						
EVQLLES	GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	AYSMIWVRQA	PGKGLEWVSY	IRPSGGRTTY 60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARGG	LLLWFRLLKS	NYFDYWGGGT	120
LVTVSSASTK	GPSVFPLAPS	SKS				143
X69-B08 LC						
QDIQMTQSPS	SLSAFVGDRV	TITCRASQPI	DNYLNWYHQK	PGKAPKLLIY	AASRLQSGVP	60
SRLSGSGFGT	DFTLTISLQ	PEDFGNYCYQ	QSYTVPYTFG	GGTKVEIR		108
X69-B08 HC						
EVQLLES	GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	AYSMIWVRQA	PGKGLEWVSY	IRPSGGRTTY 60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARGG	LLLWFRNLKS	NYFDYWGGGT	120
LVTVSSASTK	GPSVFPLAPS	SKS				143
X69-A10 LC						
QDIQMTQSPS	SLSAFVGDRV	TITCRASQPI	DNYLNWYHQK	PGKAPKLLIY	AASRLQSGVP	60
SRLSGSGFGT	DFTLTISLQ	PEDFGNYCYQ	QSYTVPYTFG	GGTKVEIR		108
X69-A10 HC						
EVQLLES	GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	AYSMIWVRQA	PGKGLEWVSY	IRPSGGRTTY 60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARGG	LLLWFRPLKS	NYFDYWGGGT	120
LVTVSSASTK	GPSVFPLAPS	SKS				143
X69-A09 LC						
QDIQMTQSPS	SLSAFVGDRV	TITCRASQPI	DNYLNWYHQK	PGKAPKLLIY	AASRLQSGVP	60
SRLSGSGFGT	DFTLTISLQ	PEDFGNYCYQ	QSYTVPYTFG	GGTKVEIR		108
X69-A09 HC						
EVQLLES	GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	AYSMIWVRQA	PGKGLEWVSY	IRPSGGRTTY 60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARGG	LLLWFRQLKS	NYFDYWGGGT	120
LVTVSSASTK	GPSVFPLAPS	SKS				143
X69-E05 LC						
QDIQMTQSPS	SLSAFVGDRV	TITCRASQPI	DNYLNWYHQK	PGKAPKLLIY	AASRLQSGVP	60
SRLSGSGFGT	DFTLTISLQ	PEDFGNYCYQ	QSYTVPYTFG	GGTKVEIR		108
X69-E05 HC						
EVQLLES	GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	AYSMIWVRQA	PGKGLEWVSY	IRPSGGRTTY 60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARGG	LLLWFRLLKS	NYFDYWGGGT	120
LVTVSSASTK	GPSVFPLAPS	SKS				143
X69-F09 LC						
QDIQMTQSPS	SLSAFVGDRV	TITCRASQPI	DNYLNWYHQK	PGKAPKLLIY	AASRLQSGVP	60
SRLSGSGFGT	DFTLTISLQ	PEDFGNYCYQ	QSYTVPYTFG	GGTKVEIR		108
X69-F09 HC						
EVQLLES	GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	AYSMIWVRQA	PGKGLEWVSY	IRPSGGRTTY 60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARGG	LLLWFRSLKS	NYFDYWGGGT	120
LVTVSSASTK	GPSVFPLAPS	SKS				143
X69-F01 LC						
QDIQMTQSPS	SLSAFVGDRV	TITCRASQPI	DNYLNWYHQK	PGKAPKLLIY	AASRLQSGVP	60
SRLSGSGFGT	DFTLTISLQ	PEDFGNYCYQ	QSYTVPYTFG	GGTKVEIR		108
X69-F01 HC						
EVQLLES	GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	AYSMIWVRQA	PGKGLEWVSY	IRPSGGRTTY 60

ES 2 905 545 T3

ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARGG	LLLWFRTLKS	NYFDYWGQGT	120
LVTVSSASTK	GPSVFPLAPS	SKS				143
X69-C12 LC						
QDIQMTQSPS	SLSAFVGDRV	TITCRASQPI	DNYLNWYHQK	PGKAPKLLIY	AASRLQSGVP	60
SRLSGSGFGT	DFTLTISLQ	PEDFGNYCQ	QSYTVPYTFG	GGTKVEIR		108
X69-C12 HC						
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	AYSMIWVRQA	PGKGLEWVSY	IRPSGGRTTY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARGG	LLLWFRVLKS	NYFDYWGQGT	120
LVTVSSASTK	GPSVFPLAPS	SKS				143
X69-E01 LC						
QDIQMTQSPS	SLSAFVGDRV	TITCRASQPI	DNYLNWYHQK	PGKAPKLLIY	AASRLQSGVP	60
SRLSGSGFGT	DFTLTISLQ	PEDFGNYCQ	QSYTVPYTFG	GGTKVEIR		108
X69-E01 HC						
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	AYSMIWVRQA	PGKGLEWVSY	IRPSGGRTTY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARGG	LLLWFRVLKS	NYFDYWGQGT	120
LVTVSSASTK	GPSVFPLAPS	SKS				143
X69-H10 LC						
QDIQMTQSPS	SLSAFVGDRV	TITCRASQPI	DNYLNWYHQK	PGKAPKLLIY	AASRLQSGVP	60
SRLSGSGFGT	DFTLTISLQ	PEDFGNYCQ	QSYTVPYTFG	GGTKVEIR		108
X69-H10 HC						
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	AYSMIWVRQA	PGKGLEWVSY	IRPSGGRTTY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARGG	LLLWFRVLKS	NYFDYWGQGT	120
LVTVSSASTK	GPSVFPLAPS	SKS				143
X66-F01 LC						
QDIQMTQSPS	SLSAFVGDRV	TITCRASQPI	DNYLNWYHQK	PGKAPKLLIY	AASRLQSGVP	60
SRLSGSGFGT	DFTLTISLQ	PEDFGNYCQ	QSYTVPYTFG	GGTKVEIR		108
X66-F01 HC						
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	AYSMIWVRQA	PGKGLEWVSY	IRPSGGRTTY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARGG	LLWFSELKS	NYFDYWGQGT	120
LVTVSSASTK	GPSVFPLAPS	SKS				143
X66-H11 LC						
QDIQMTQSPS	SLSAFVGDRV	TITCRASQPI	DNYLNWYHQK	PGKAPKLLIY	AASRLQSGVP	60
SRLSGSGFGT	DFTLTISLQ	PEDFGNYCQ	QSYTVPYTFG	GGTKVEIR		108
X66-H11 HC						
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	AYSMIWVRQA	PGKGLEWVSY	IRPSGGRTTY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARGG	LLWFTELKS	NYFDYWGQGT	120
LVTVSSASTK	GPSVFPLAPS	SKS				143
X66-C02 LC						
QDIQMTQSPS	SLSAFVGDRV	TITCRASQPI	DNYLNWYHQK	PGKAPKLLIY	AASRLQSGVP	60
SRLSGSGFGT	DFTLTISLQ	PEDFGNYCQ	QSYTVPYTFG	GGTKVEIR		108
X66-C02 HC						
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	AYSMIWVRQA	PGKGLEWVSY	IRPSGGRTTY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARGG	LLWFVELKS	NYFDYWGQGT	120
LVTVSSASTK	GPSVFPLAPS	SKS				143

ES 2 905 545 T3

X66-F09 LC						
QDIQMTQSPS	SLSAFVGDRV	TITCRASQPI	DNYLNWYHQB	PGKAPKLLIY	AASRLQSGVP	60
SRLSGSGFGT	DFTLTISLQ	PEDFGNYCQ	QSYTVPYTFG	GGTKVEIR		108
X66-F09 HC						
EVQLLESQGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	AYSIMWVRQA	PGKGLEWVSF	IRPSGGRTTY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARGG	LLLWFWEKLS	NYFDYWGQGT	120
LVTVSSASTK	GPSVFPLAPS	SKS				143
X66-G08 LC						
QDIQMTQSPS	SLSAFVGDRV	TITCRASQPI	DNYLNWYHQB	PGKAPKLLIY	AASRLQSGVP	60
SRLSGSGFGT	DFTLTISLQ	PEDFGNYCQ	QSYTVPYTFG	GGTKVEIR		108
X66-G08 HC						
EVQLLESQGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	AYSIMWVRQA	PGKGLEWVSF	IRPSGGRTTY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARGG	LLLWFWEKLS	NYFDYWGQGT	120
LVTVSSASTK	GPSVFPLAPS	SKS				143
X67-C09 LC						
QDIQMTQSPS	SLSAFVGDRV	TITCRASQPI	DNYLNWYHQB	PGKAPKLLIY	AASRLQSGVP	60
SRLSGSGFGT	DFTLTISLQ	PEDFGNYCQ	QSYTVPYTFG	GGTKVEIR		108
X67-C09 HC						
EVQLLESQGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	AYSIMWVRQA	PGKGLEWVSF	IRPSGGRTTY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARGG	LLLWGRELKS	NYFDYWGQGT	120
LVTVSSASTK	GPSVFPLAPS	SKS				143
X67-B04 LC						
QDIQMTQSPS	SLSAFVGDRV	TITCRASQPI	DNYLNWYHQB	PGKAPKLLIY	AASRLQSGVP	60
SRLSGSGFGT	DFTLTISLQ	PEDFGNYCQ	QSYTVPYTFG	GGTKVEIR		108
X67-B04 HC						
EVQLLESQGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	AYSIMWVRQA	PGKGLEWVSF	IRPSGGRTTY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARGG	LLLWKRELKS	NYFDYWGQGT	120
LVTVSSASTK	GPSVFPLAPS	SKS				143
X67-G09 LC						
QDIQMTQSPS	SLSAFVGDRV	TITCRASQPI	DNYLNWYHQB	PGKAPKLLIY	AASRLQSGVP	60
SRLSGSGFGT	DFTLTISLQ	PEDFGNYCQ	QSYTVPYTFG	GGTKVEIR		108
X67-G09 HC						
EVQLLESQGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	AYSIMWVRQA	PGKGLEWVSF	IRPSGGRTTY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARGG	LLLWLRELKS	NYFDYWGQGT	120
LVTVSSASTK	GPSVFPLAPS	SKS				143
X67-C03 LC						
QDIQMTQSPS	SLSAFVGDRV	TITCRASQPI	DNYLNWYHQB	PGKAPKLLIY	AASRLQSGVP	60
SRLSGSGFGT	DFTLTISLQ	PEDFGNYCQ	QSYTVPYTFG	GGTKVEIR		108
X67-C03 HC						
EVQLLESQGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	AYSIMWVRQA	PGKGLEWVSF	IRPSGGRTTY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARGG	LLLWMRELKS	NYFDYWGQGT	120
LVTVSSASTK	GPSVFPLAPS	SKS				143
X67-D03 LC						
QDIQMTQSPS	SLSAFVGDRV	TITCRASQPI	DNYLNWYHQB	PGKAPKLLIY	AASRLQSGVP	60
SRLSGSGFGT	DFTLTISLQ	PEDFGNYCQ	QSYTVPYTFG	GGTKVEIR		108

ES 2 905 545 T3

X67-D03 HC						
EVQLLES	GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	AYSMIWVRQA	PGKGLEWVS	IRPSGGRTTY 60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARGG	LLLWNRELKS	NYFDYWGGGT	120
LVTVSSASTK	GPSVFPLAPS	SKS				143
X67-B05 LC						
QDIQMTQSPS	SLSAFVGDRV	TITCRASQPI	DNYLNWYHQK	PGKAPKLLIY	AASRLQSGVP	60
SRLSGSGFGT	DFTLTISLQ	PEDFGNYCQ	QSYTVPYTFG	GGTKVEIR		108
X67-B05 HC						
EVQLLES	GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	AYSMIWVRQA	PGKGLEWVS	IRPSGGRTTY 60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARGG	LLLWPRELKS	NYFDYWGGGT	120
LVTVSSASTK	GPSVFPLAPS	SKS				143
X67-F01 LC						
QDIQMTQSPS	SLSAFVGDRV	TITCRASQPI	DNYLNWYHQK	PGKAPKLLIY	AASRLQSGVP	60
SRLSGSGFGT	DFTLTISLQ	PEDFGNYCQ	QSYTVPYTFG	GGTKVEIR		108
X67-F01 HC						
EVQLLES	GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	AYSMIWVRQA	PGKGLEWVS	IRPSGGRTTY 60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARGG	LLLWQRELKS	NYFDYWGGGT	120
LVTVSSASTK	GPSVFPLAPS	SKS				143
X67-G05 LC						
QDIQMTQSPS	SLSAFVGDRV	TITCRASQPI	DNYLNWYHQK	PGKAPKLLIY	AASRLQSGVP	60
SRLSGSGFGT	DFTLTISLQ	PEDFGNYCQ	QSYTVPYTFG	GGTKVEIR		108
X67-G05 HC						
EVQLLES	GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	AYSMIWVRQA	PGKGLEWVS	IRPSGGRTTY 60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARGG	LLLWRRELKS	NYFDYWGGGT	120
LVTVSSASTK	GPSVFPLAPS	SKS				143
X67-B03 LC						
QDIQMTQSPS	SLSAFVGDRV	TITCRASQPI	DNYLNWYHQK	PGKAPKLLIY	AASRLQSGVP	60
SRLSGSGFGT	DFTLTISLQ	PEDFGNYCQ	QSYTVPYTFG	GGTKVEIR		108
X67-B03 HC						
EVQLLES	GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	AYSMIWVRQA	PGKGLEWVS	IRPSGGRTTY 60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARGG	LLLWSRELKS	NYFDYWGGGT	120
LVTVSSASTK	GPSVFPLAPS	SKS				143
X67-F10 LC						
QDIQMTQSPS	SLSAFVGDRV	TITCRASQPI	DNYLNWYHQK	PGKAPKLLIY	AASRLQSGVP	60
SRLSGSGFGT	DFTLTISLQ	PEDFGNYCQ	QSYTVPYTFG	GGTKVEIR		108
X67-F10 HC						
EVQLLES	GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	AYSMIWVRQA	PGKGLEWVS	IRPSGGRTTY 60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARGG	LLLWTRELKS	NYFDYWGGGT	120
LVTVSSASTK	GPSVFPLAPS	SKS				143
X67-H01 LC						
QDIQMTQSPS	SLSAFVGDRV	TITCRASQPI	DNYLNWYHQK	PGKAPKLLIY	AASRLQSGVP	60
SRLSGSGFGT	DFTLTISLQ	PEDFGNYCQ	QSYTVPYTFG	GGTKVEIR		108
X67-H01 HC						
EVQLLES	GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	AYSMIWVRQA	PGKGLEWVS	IRPSGGRTTY 60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARGG	LLLWWRELKS	NYFDYWGGGT	120
LVTVSSASTK	GPSVFPLAPS	SKS				143
X67-F08 LC						
QDIQMTQSPS	SLSAFVGDRV	TITCRASQPI	DNYLNWYHQK	PGKAPKLLIY	AASRLQSGVP	60
SRLSGSGFGT	DFTLTISLQ	PEDFGNYCQ	QSYTVPYTFG	GGTKVEIR		108
X67-F08 HC						
EVQLLES	GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	AYSMIWVRQA	PGKGLEWVS	IRPSGGRTTY 60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARGG	LLLWYRELKS	NYFDYWGGGT	120
LVTVSSASTK	GPSVFPLAPS	SKS				143

Tabla 6. Secuencias de aminoácidos de CDR de inhibidor de anticuerpos optimizado de pCal basado en M142-H08

Nombre inicial	Ki,ap (nM) de IgG	LV-CDR1	LV-CDR2	LV-CDR3	HV-CDR1	HV-CDR2	HV-CDR3 ^a
X67-D03	0,1	RASQPIDNYLN	AASRLQS	QQSYTVPYT	AYSMI	YIRPSGGRTTYADSVKG	GGLLLNRELKSNYF DY
X67-G04	0,35	RASQPIDNYLN	AASRLQS	QQSYTVPYT	AYSMI	YIRPSGGRTTYADSVKG	GGLLWARELKSNYF DY

^aLa sustitución de F a N (en negrita) en la CDR3 de M142-H08 de X67-D03, una IgG que no se escinde durante la expresión y es un potente inhibidor de humano. Similarmente, la sustitución de F a A da X67-G04, que tampoco se escinde.

Tabla 7. CDR Secuencias de aminoácidos de inhibidores de anticuerpo madurado por afinidad de pCal descubiertos usando ROLIC

Nombre inicial	Ki,ap (nM)	LV-CDR1	LV-CDR2	LV-CDR3	HV-CDR1	HV-CDR2	HV-CDR3
X59-C07	6,1	RAGRSISTYVN	AASSLOS	QQSQSTPYT	HYLMT	YISPSGGHTIYADSVKG	VARGIAAARSRTSYFDY
X60-D01	2,0	RASQIVSSRYLA	GAASRAT	QQTYSPPFT	HYLMT	YISPSGGHTIYADSVKG	VARGIAAARSRTSYFDY
X63-G10	9,0	RASQISISNYLN	AASSLOS	QQSYTSPYT	HYLMT	YISPSGGHTIYADSVKG	VARGIAAARSRTSYFDY
X64-F04	1,9	RASQIVSSNYLA	GASNRAT	QQSFNIPYT	HYLMT	YISPSGGHTIYADSVKG	VARGIAAARSRTSYFDY
X63-G06	0,4 (Fab)	RTSQFVNSNYLA	GASSRAT	QQSRTPWWT	HYLMT	YISPSGGHTIYADSVKG	VARGIAAARSRTSYFDY
X81-B01 ^a	0,2 (IgG)	RTSQFVNSNYLA	GASSRAT	QQSSRTPWWT	HYLMT	YISPSGGHTIYADSVKG	VARGIAAARSRTSYFDY

^aX81-B01 es la versión optimizada en codones y retromutada a la línea germinal de X63-G06 como una IgG humana de longitud completa producida en células HEK 293T.

Se muestran a continuación las secuencias de aminoácidos del dominio variable de la cadena ligera (LC) y cadena pesada (HC) de inhibidores de anticuerpos madurados por afinidad de pCal descubiertos usando ROLIC

X59-C07 LC
QDIQMTQSPS SLSASVGDV TVTCRAGRSI STYVNWYQQK PGKAPKLLIY AASSLQSGVP 60
SRFSGSGSGT DFTLTISLQ PEDFATYYCQ QSQSTPYTFG QGKLEVK 108

X59-C07 HC
EVQLLESQGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS HYLMTWVRQA PGKGLEWVSY ISPSGGHTIY 60
ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARVA RGIAARSRTS YFDYWGQGT 120
VTVSSASTKG PSVFPLAPSS KS 142

X60-D01 LC
QDIQMTQSPG TSLSPGERA TLSCRASQIV SSRYLAWYQQ RFGQAPRLLI YGAASRATGI 60
PDRFSGSGSGT TDFTLTISLQ QAEDFATYYC QQTYSSPFTF GQGTKMEIK 109

X60-D01 HC
EVQLLESQGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS HYLMTWVRQA PGKGLEWVSY ISPSGGHTIY 60
ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARVA RGIAARSRTS YFDYWGQGT 120
VTVSSASTKG PSVFPLAPSS KS 142

X63-G06 LC
QDIQMTQSPG TSLSPGERA TLSCRTSQFV NSNYLAWYQQ TPGQAPRLLI YGASSRATGI 60
PDRFSGTGYG TDFTLTISRL EPEDYGTYYC QQSRTFPWTF GQGTRVEIK 109

X63-G06 HC
EVQLLESQGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS HYLMTWVRQA PGKGLEWVSY ISPSGGHTIY 60
ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARVA RGIAARSRTS YFDYWGQGT 120
VTVSSASTKG PSVFPLAPSS KS 142

X63-G10 LC
QDIQMTQSPD SLSASVGDV TITCRASQSI SNYLNWYQQK PGKAPKLLIY AASSLQSGVP 60
SRFSGSGSGT DFTLTISGLQ PEDFASYCQ QSYSPTYTFV QGKLEIKRT 110

X63-G10 HC
EVQLLESQGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS HYLMTWVRQA PGKGLEWVSY ISPSGGHTIY 60
ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARVA RGIAARSRTS YFDYWGQGT 120
VTVSSASTKG PSVFPLAPSS KS 142

X64-F04 LC
QDIQMTQSPA TSLSPGERA TLSCRASQIV SSNYLAWYQQ KPGQAPRLLI YGASNRATGI 60
PDRFSGSGSGT TEFTLTISLQ QSEDFAIYYC QQSFNIPYTF GQGTRVDIK 109

X64-F04 HC
EVQLLESQGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS HYLMTWVRQA PGKGLEWVSY ISPSGGHTIY 60
ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARVA RGIAARSRTS YFDYWGQGT 120
VTVSSASTKG PSVFPLAPSS KS 142

- 5 X81-B01 es la IgG retromutada a la línea germinal producida en la versión de células HEK 293T del Fab X63-G06, como se indica anteriormente.

X101-A01 (también denominado DX-2922) es la IgG retromutada a la línea germinal producida en la versión de células CHO del Fab X63-G06

EJEMPLO 4: Maduración por afinidad

- 10 Además de optimizar la secuencia del anticuerpo acortado (M142-H08), los presentes inventores también realizaron maduración por afinidad en dos de los anticuerpos identificados por presentación en fagos (M162-A04 y M160-G12). Ambos de estos anticuerpos inhiben pCal humana con potencia nanomolar de un solo dígito, parecen específicos para pCal y no se unen a precalicreína (**Tabla 3**). Los presentes inventores realizaron en primer lugar una novedosa forma de barajado de cadenas ligeras denominado ROLIC (optimización rápida de cadenas ligeras, por la expresión
- 15 inglesa Rapid Optimización of Light Chains) en M162-A04 y M160-G12 (véanse, por ejemplo, los documentos WO 2009/102927 y US 2009-0215119). A partir del cribado de los anticuerpos descubierto por ROLIC, los presentes inventores identificaron un anticuerpo con potencia subnanomolar (X63-G06) que compartió la misma cadena pesada que M160-G12. Los presentes inventores construyeron entonces bibliotecas de maduración por afinidad enriquecidas en HV-CDR3 basadas en las secuencias de CDR3 en M162-A04 y X63-G06 (descritas a continuación).
- 20 Maduración por afinidad por ROLIC. Los presentes inventores usaron ROLIC para madurar por afinidad los dos ejemplos de la Tabla 3 que no se escindieron (M162-A04 y M160-G12). Este proceso identificó un anticuerpo que inhibe pCal con una $K_{i,ap}$ subnanomolar (**Tabla 7**). X63-G06 inhibe pCal con una $K_{i,ap}$ de aproximadamente 0,4 nM

como un fragmento Fab. Cuando este anticuerpo se convirtió en una IgG que se retromuta a la línea germinal y se optimizó en la secuencia para la expresión de células CHO (X81-B01), se encontró que inhibía pCal con una $K_{i,ap}$ de aproximadamente 0,2 nM.

EJEMPLO 5: Maduración por afinidad de CDR1/2 y CDR3 de la cadena pesada

- 5 Los presentes inventores usaron dos estrategias adicionales de maduración por afinidad para identificar anticuerpos altamente potentes basándose en dos ejemplos de inhibidores parentales de anticuerpos diferentes: M162-A04 y X63-G06. Un enfoque era generar bibliotecas que barajaron las CDR1/2 de HC de dos ejemplos de inhibidores parentales de anticuerpo diferentes (M162-A04 y X63-G06) contra la diversidad adicional de CDR1/2. Otro enfoque fue crear bibliotecas enriquecidas en CDR3 de la cadena pesada basándose en estos ejemplos.
- 10 Los 82 anticuerpos que se descubrieron basándose en mejoras en M162-A04 debido a modificaciones en cualquiera de la región CDR1/2 y CDR3 se muestran en la **Tabla 8**. El cribado de inhibición con anticuerpo 10 nM (como fragmentos Fab) reveló que hubo 33 anticuerpos que inhibieron la actividad de pCal más de 90 %. Se mostró que varios anticuerpos eran inhibidores subnanomolares de pCal humana.
- 15 Los 62 anticuerpos que se descubrieron basados en mejoras en X63-G06 debido a modificaciones en cualquiera de la región CDR1/2 y CDR3 se muestran en la **Tabla 9**. El cribado de inhibición con anticuerpo 10 nM (como fragmentos Fab) reveló que hubo 24 anticuerpos que inhibieron la actividad de pCal más de 90 %. Se mostró que varios anticuerpos eran inhibidores subnanomolares de pCal humana.

Tabla 8. Secuencias de anticuerpos obtenidos de bibliotecas de maduración por afinidad enriquecidas en CDR1/2 y CDR3 basadas en M162-A04

I.D. de anticuerpo	% de inhibición a 10 nM	Ki,ap de pCal humana (nM)	LV-CDR1	LV-CDR2	LV-CDR3	HV-CDR1	HV-CDR2	HV-CDR3
M202-A12	97,5	0,2	RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	HYIMM	GIYSSGGITVYADSVKG	QRTGVPRRDSFNI
M196-C06	97,2	0,1	RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	IYSMH	SIYPSRGMWYADSVKG	RRTGIPRRDAFDI
M198-F09	96,9	0,2	RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	VYNMH	SIYPSGGMTYADSVKG	RRTGIPRRDAFDI
M199-A08	96,4	0,06	RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	HYIMM	GIYSSGGITVYADSVKG	RIIGVPRRDEFDI
M202-C01	96,3	0,1	RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	HYIMM	GIYSSGGITVYADSVKG	RRTGVPRWDDFDI
M198-A06	96,1	0,4	RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	IYSMH	SIYSSGGPTKYADSVKG	RRTGIPRRDAFDI
M200-D03	95,9	0,1	RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	HYIMM	GIYSSGGITVYADSVKG	RIIGVPRRDSFDM
M202-H03	95,7	0,1	RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	HYIMM	GIYSSGGITVYADSVKG	RRTGVPRWDDFDI
M201-A07	95,7	0,1	RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	HYIMM	GIYSSGGITVYADSVKG	RRTGVPRRDEFDI
M197-A01	95,3		RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	IYDMI	SIYPSGGNTSYADSVKG	RRTGIPRRDAFDI
M202-D09	95,0	0,4	RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	HYIMM	GIYSSGGITVYADSVKG	RIIGVPRRDSFDI
M197-A09	94,9	0,6	RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	VYNMH	SIYPSGGMTTYADSVKG	RRTGIPRRDAFDI
M198-G07	94,9		RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	IYDMT	SIYPSGGQTYADSVKG	RRTGIPRRDAFDI
M200-A10	94,3	0,3	RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	HYIMM	GIYSSGGITVYADSVKG	RRTGVPRRDSFDI
M197-H10	94,1		RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	SYNMH	SIYPSGGKTYADSVKG	RRTGIPRRDAFDI
M196-D12	94,1	0,2	RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	RYSMR	VIYPSGGQTYADSVKG	RRTGIPRRDAFDI
M197-A08	93,7		RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	IYSMQ	SIGSSGGKTLTYADSVKG	RRTGIPRRDAFDI
M198-B09	93,5		RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	VYSMT	SIGSSGGSTTYADSVKG	RRTGIPRRDAFDI
M198-E09	93,1		RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	IYDMN	SIYPSGGRTYADSVKG	RRTGIPRRDAFDI
M202-B03	93,1	0,3	RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	HYIMM	GIYSSGGITVYADSVKG	RRTGVPRRDDFDI
M198-C10	93,0		RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	HYMGMN	SIYPSGGWTQYADSVKG	RRTGIPRRDAFDI

I.D. de anticuerpo	% de inhibición a 10 nM	Ki.ap de pCal humana (nM)	LV-CDR1	LV-CDR2	LV-CDR3	HV-CDR1	HV-CDR2	HV-CDR3
M197-E12	93,0		RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	TYTMR	SIYPSGGKTQYADSVKG	RRTGIPRRDAFDI
M198-F04	92,9		RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	IYDMW	SIRPSGGITKYADSVKG	RRTGIPRRDAFDI
M197-H11	92,9		RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	IYNMI	SIYPSGGWTTYADSVKG	RRTGIPRRDAFDI
M197-F01	92,6		RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	IYHMY	SIGPSGGPTGYADSVKG	RRTGIPRRDAFDI
M198-E11	92,5		RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	TYSMY	SIYPSGGLTWYADSVKG	RRTGIPRRDAFDI
M202-C09	92,3	0,3	RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	HYIMM	GIYSSGGITVYADSVKG	RRIGVPRRDDFDI
M198-H08	92,3		RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	IYDMY	SIGPSGGPTAYADSVKG	RRTGIPRRDAFDI
M198-F08	91,8		RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	VYSMW	SISSSGGMTEYADSVKG	RRTGIPRRDAFDI
M202-E06	91,5		RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	HYIMM	GIYSSGGITVYADSVKG	RRRGVPRRDDFDI
M195-D12	90,8		RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	IYGMF	GIGPSGGPTKYADSVKG	RRTGIPRRDAFDI
M197-F03	90,7		RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	IYSMF	SIGPSGGVTHYADSVKG	RRTGIPRRDAFDI
M198-E02	90,3		RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	IYSMY	YIRPSGGNTKYADSVKG	RRTGIPRRDAFDI
M198-A02	89,1		RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	RYSMI	SIWSSGGATEYADSVKG	RRTGIPRRDAFDI
M202-A01	88,9		RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	HYIMM	GIYSSGGITVYADSVKG	RRIGVPRRRDAFDI
M202-G03	88,3		RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	HYIMM	GIYSSGGITVYADSVKG	RRTGVPRRRDSFEI
M195-B12	87,7		RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	KYWMY	YIRPSGGQTTYADSVKG	RRTGIPRRDAFDI
M198-A07	86,1		RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	RYQMIH	WISPSGGITGYADSVKG	RRTGIPRRDAFDI
M198-H02	85,8		RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	PYNMY	WIVPGGVTKYADSVKG	RRTGIPRRDAFDI
M200-H07	85,4		RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	HYIMM	GIYSSGGITVYADSVKG	RRTGVPRRNAFDN
M201-H06	84,6		RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	HYIMM	GIYSSGGITVYADSVKG	RRTGVPRRRDAFDI
M202-F06	84,2		RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	HYIMM	GIYSSGGITVYADSVKG	RRTGVPRWDAFDI
M195-C12	84,2		RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	MYQMF	SISPGGGTQYADSVKG	RRTGIPRRDAFDI
M202-H05	84,0		RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	HYIMM	GIYSSGGITVYADSVKG	RRTGVPRRDVFDI
M198-C05	83,9		RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	RYKMY	VIGPSGGATFYADSVKG	RRTGIPRRDAFDI
M196-H03	83,9		RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	RYVMW	SISPSGDTHYADSVKG	RRTGIPRRDAFDI

I.D. de anticuerpo	% de inhibición a 10 nM	Ki.ap de pCal humana (nM)	LV-CDR1	LV-CDR2	LV-CDR3	HV-CDR1	HV-CDR2	HV-CDR3
M200-E11	83,2		RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	HYIMM	GIYSSGGITVYADSVKVG	RRTGVPRRDAFDN
M202-B04	81,9		RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	HYIMM	GIYSSGGITVYADSVKVG	RRSGVPRRDDFDI
M202-A04	81,2		RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	HYIMM	GIYSSGGITVYADSVKVG	RRKGIPRRDDFDI
M198-B12	80,7		RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	KYSMA	GIYPSGGRTLYADSVKVG	RRTGIPRRDAFDI
M198-A09	77,3		RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	IYFMS	SIRSSGGPTWYADSVKVG	RRTGIPRRDAFDI
M198-C06	76,5		RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	QYFMH	YIYPSGGMTEYADSVKVG	RRTGIPRRDAFDI
M198-C09	75,4		RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	IYTMV	SISPSGGWTTYADSVKVG	RRTGIPRRDAFDI
M195-B02	75,1		RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	PYLMW	YIGPSGGPTHYADSVKVG	RRTGIPRRDAFDI
M198-F12	74,6		RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	IYTMV	SIWSSGGQTKYADSVKVG	RRTGIPRRDAFDI
M201-H08	74,5		RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	HYIMM	GIYSSGGITVYADSVKVG	RRTGVPRRDALDN
M202-C02	74,3		RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	HYIMM	GIYSSGGITVYADSVKVG	RRPGVPRRDAFDI
M198-C03	72,4		RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	RYSMS	GISPSGGETSYADSVKVG	RRTGIPRRDAFDI
M198-A08	72,3		RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	WYMMQ	RISPSGGTTYADSVKVG	RRTGIPRRDAFDI
M195-A02	71,3		RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	QYMMM	GISSSGGHTDYADSVKVG	RRTGIPRRDAFDI
M197-G10	67,6		RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	VYAMR	SIYPSGGKTYADSVKVG	RRTGIPRRDAFDI
M195-G02	67,5		RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	PYNMM	SIWPSGGTTDYADSVKVG	RRTGIPRRDAFDI
M196-D02	66,2		RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	VYSMH	VIGPSGGITLYADSVKVG	RRTGIPRRDAFDI

I.D. de anticuerpo	% de inhibición a 10 nM	Ki.ap de pCal humana (nM)	LV-CDR1	LV-CDR2	LV-CDR3	HV-CDR1	HV-CDR2	HV-CDR3
M199-A11	65,4		RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	HYIMM	GIYSSGGITVYADSVKG	RRRGIPRRDAFDI
M200-F01	65,1		RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	HYIMM	GIYSSGGITVYADSVKG	RRMGIPRRNAFDI
M198-D12	63,5	0,7	RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	LYVMY	YIVPSGGPTAYADSVKG	RRTGIPRRDAFDI
M197-C12	56,4		RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	PYDML	YIVSSGGGLTKYADSVKG	RRTGIPRRDAFDI
M198-G03	53,8		RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	QYTMV	WIYSSRANYADSVKG	RRTGIPRRDAFDI
M199-B01	53,4		RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	HYIMM	GIYSSGGITVYADSVKG	RRTGIPRRDAFDN
M202-A08	52,9		RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	HYIMM	GIYSSGGITVYADSVKG	RRTGIPRWDAFDI
M195-A12	51,7		RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	PYMMM	GIYPSGGYTVYADSVKG	RRTGIPRRDAFDI
M202-E03	51,4		RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	HYIMM	GIYSSGGITVYADSVKG	RRTGIPRRDAFEI
M196-G12	51,1		RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	NYSMD	RIYSSGGGITVYADSVKG	RRTGIPRRDAFDI
M195-F12	45,5		RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	HYVMM	YIVPSGGVTAYADSVKG	RRTGIPRRDAFDI
M200-B01	42,6		RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	HYIMM	GIYSSGGITVYADSVKG	RRTGIPRRDAFDS
M198-H09	41,1		RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	IYLMY	YIGPSGGPTEYADSVKG	RRTGIPRRDAFDI
M195-E12	38,0		RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	YYIMF	YISPSSGGYTHYADSVKG	RRTGIPRRDAFDI
M201-A06	36,8		RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	HYIMM	GIYSSGGITVYADSVKG	RRTGIPRRDVFDI
M202-A10	36,3		RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	HYIMM	GIYSSGGITVYADSVKG	RRTGIPRRDSFDI
M197-G11	19,2		RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	TYAMV	SIYPSGGITVYADSVKG	RRTGIPRRDAFDI
M201-F11	15,7		RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	HYIMM	GIYSSGGITVYADSVKG	RRSGIPRRDAFDI
M198-A01	13,8		RASQSISSWLA	KASTLES	QQYNTYWT	PYTMV	SISSSSGGMTVPYADSVKG	RRTGIPRRDAFDI

Secuencias de aminoácidos del dominio variable de la cadena ligera (LC) y cadena pesada (HC) de anticuerpos pCal obtenidos de bibliotecas de maduración por afinidad enriquecidas en CDR1/2 y CDR3 basadas en M162-A04

M195-A02		LC							
QDIQMTQSPS	TLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSWLAWYQQK	PGKAPNLLIY	KASTLESGVP	60			
SRFSGSGSGT	EFTLTISLQ	PDDFATYYCQ	QYNTYWTFGQ	GTKVEIK		107			
M195-A02		HC							
EVQLLESQGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	QYMMMWVRQA	PGKGLEWVSG	ISSSGGHTDY	60			
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAYRR	TGIPRRDAFD	IWGQGTMTVTV	120			
SSASTKGPSV	FPLAPSSKS					139			
M195-A12		LC							
QDIQMTQSPS	TLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSWLAWYQQK	PGKAPNLLIY	KASTLESGVP	60			
SRFSGSGSGT	EFTLTISLQ	PDDFATYYCQ	QYNTYWTFGQ	GTKVEIK		107			
M195-A12		HC							
EVQLLESQGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	PYMMMWVRQA	PGKGLEWVSG	IYPSGGYTVY	60			
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAYRR	TGIPRRDAFD	IWGQGTMTVTV	120			
SSASTKGPSV	FPLAPSSKS					139			
M195-B02		LC							
QDIQMTQSPS	TLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSWLAWYQQK	PGKAPNLLIY	KASTLESGVP	60			
SRFSGSGSGT	EFTLTISLQ	PDDFATYYCQ	QYNTYWTFGQ	GTKVEIK		107			
M195-B02		HC							
EVQLLESQGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	PYLMWVRQA	PGKGLEWVSY	IGPSGGPPTHY	60			
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAYRR	TGIPRRDAFD	IWGQGTMTVTV	120			
SSASTKGPSV	FPLAPSSKS					139			
M195-B12		LC							
QDIQMTQSPS	TLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSWLAWYQQK	PGKAPNLLIY	KASTLESGVP	60			
SRFSGSGSGT	EFTLTISLQ	PDDFATYYCQ	QYNTYWTFGQ	GTKVEIK		107			
M195-B12		HC							
EVQLLESQGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	KYWMYVVRQA	PGKGLEWVSY	IRPSGGQTYT	60			
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAYRR	TGIPRRDAFD	IWGQGTMTVTV	120			
SSASTKGPSV	FPLAPSSKS					139			
M195-C12		LC							
QDIQMTQSPS	TLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSWLAWYQQK	PGKAPNLLIY	KASTLESGVP	60			
SRFSGSGSGT	EFTLTISLQ	PDDFATYYCQ	QYNTYWTFGQ	GTKVEIK		107			
M195-C12		HC							
EVQLLESQGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	MYQMFVVRQA	PGKGLEWVSS	ISPGGGTQYA	60			
DSVKGRFTIS	RDNSKNTLYL	QMNSLRAEDT	AVYYCAYRRT	GIPRRDAFDI	WGQGTMTVTVS	120			
SASTKGPSVF	PLAPSSKS					138			
M195-D12		LC							
QDIQMTQSPS	TLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSWLAWYQQK	PGKAPNLLIY	KASTLESGVP	60			
SRFSGSGSGT	EFTLTISLQ	PDDFATYYCQ	QYNTYWTFGQ	GTKVEIK		107			

ES 2 905 545 T3

M195-D12		HC			
EVQLLES	GGG	LVQPGG	SLRL	SCAASG	FTFS
ADSVKGR	FTI	SRDNSK	NTRY	LQMNSL	RAED
SSASTKG	PSV	FPLAPSS	SKS		
				60	
				120	
				139	
M195-E12		LC			
QDIQMTQ	SPS	TLSASV	GDRV	TITCRAS	QSI
SRFSGSG	SGT	EFTLTIS	SLQ	PDDFATY	YCQ
				60	
				107	
M195-E12		HC			
EVQLLES	GGG	LVQPGG	SLRL	SCAASG	FTFS
ADSVKGR	FTI	SRDNSK	NTRY	LQMNSL	RAED
SSASTKG	PSV	FPLAPSS	SKS		
				60	
				120	
				139	
M195-F12		LC			
QDIQMTQ	SPS	TLSASV	GDRV	TITCRAS	QSI
SRFSGSG	SGT	EFTLTIS	SLQ	PDDFATY	YCQ
				60	
				107	
M195-F12		HC			
EVQLLES	GGG	LVQPGG	SLRL	SCAASG	FTFS
ADSVKGR	FTI	SRDNSK	NTRY	LQMNSL	RAED
SSASTKG	PSV	FPLAPSS	SKS		
				60	
				120	
				139	
M0195-G02		LC			
QDIQMTQ	SPS	TLSASV	GDRV	TITCRAS	QSI
SRFSGSG	SGT	EFTLTIS	SLQ	PDDFATY	YCQ
				60	
				107	
M195-G02		HC			
EVQLLES	GGG	LVQPGG	SLRL	SCAASG	FTFS
ADSVKGR	FTI	SRDNSK	NTRY	LQMNSL	RAED
SSASTKG	PSV	FPLAPSS	SKS		
				60	
				120	
				139	
M196-C06		LC			
QDIQMTQ	SPS	TLSASV	GDRV	TITCRAS	QSI
SRFSGSG	SGT	EFTLTIS	SLQ	PDDFATY	YCQ
				60	
				107	
M196-C06		HC			
EVQLLES	GGG	LVQPGG	SLRL	SCAASG	FTFS
ADSVKGR	FTI	SRDNSK	NTRY	LQMNSL	RAED
SSASTKG	PSV	FPLAPSS	SKS		
				60	
				120	
				139	
M196-D02		LC			
QDIQMTQ	SPS	TLSASV	GDRV	TITCRAS	QSI
SRFSGSG	SGT	EFTLTIS	SLQ	PDDFATY	YCQ
				60	
				107	
M196-D02		HC			
EVQLLES	GGG	LVQPGG	SLRL	SCAASG	FTFS
ADSVKGR	FTI	SRDNSK	NTRY	LQMNSL	RAED
SSASTKG	PSV	FPLAPSS	SKS		
				60	
				120	
				139	
M196-D12		LC			
QDIQMTQ	SPS	TLSASV	GDRV	TITCRAS	QSI
SRFSGSG	SGT	EFTLTIS	SLQ	PDDFATY	YCQ
				60	
				107	

ES 2 905 545 T3

M196-D12	HC					
EVQLLES GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	RYSMRWVRQA	PGKGLEWVSV	IYPSGGQTY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAYRR	TGIPRRDAFD	IWGQGTMTV	120
SSASTKGPSV	FPLAPSSKS					139
M196-G12	LC					
QDIQMTQSPS	TLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSWLAWYQQK	PGKAPNLLIY	KASTLESGVP	60
SRFSGSGSGT	EFTLTISLQ	PDDFATYYCQ	QYNTYWTFGQ	GTKVEIK		107
M196-G12	HC					
EVQLLES GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	NYSMDWVRQA	PGKGLEWVSR	IYSSGGGTIY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAYRR	TGIPRRDAFD	IWGQGTMTV	120
SSASTKGPSV	FPLAPSSKS					139
M196-H03	LC					
QDIQMTQSPS	TLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSWLAWYQQK	PGKAPNLLIY	KASTLESGVP	60
SRFSGSGSGT	EFTLTISLQ	PDDFATYYCQ	QYNTYWTFGQ	GTKVEIK		107
M196-H03	HC					
EVQLLES GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	RYVMWVRQA	PGKGLEWVSS	ISPSGDTHYA	60
DSVKGRFTIS	RDNSKNTLYL	QMNLSRAEDT	AVYYCAYRRT	GIPRRDAFDI	WGQGTMTVTS	120
SASTKGPSVF	PLAPSSKS					138
M197-A01	LC					
QDIQMTQSPS	TLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSWLAWYQQK	PGKAPNLLIY	KASTLESGVP	60
SRFSGSGSGT	EFTLTISLQ	PDDFATYYCQ	QYNTYWTFGQ	GTKVEIK		107
M197-A01	HC					
EVQLLES GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	IYDMIWVRQA	PGKGLEWVSS	IYPSGGNTSY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAYRR	TGIPRRDAFD	IWGQGTMTV	120
SSASTKGPSV	FPLAPSSKS					139
M197-A08	LC					
QDIQMTQSPS	TLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSWLAWYQQK	PGKAPNLLIY	KASTLESGVP	60
SRFSGSGSGT	EFTLTISLQ	PDDFATYYCQ	QYNTYWTFGQ	GTKVEIK		107
M197-A08	HC					
EVQLLES GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	IYSMQWVRQA	PGKGLEWVSS	IGSSGGKTLY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAYRR	TGIPRRDAFD	IWGQGTMTV	120
SSASTKGPSV	FPLAPSSKS					139
M197-A09	LC					
QDIQMTQSPS	TLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSWLAWYQQK	PGKAPNLLIY	KASTLESGVP	60
SRFSGSGSGT	EFTLTISLQ	PDDFATYYCQ	QYNTYWTFGQ	GTKVEIK		107
M197-A09	HC					
EVQLLES GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	VYNMHWVRQA	PGKGLEWVSS	IYPSGGMTTY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAYRR	TGIPRRDAFD	IWGQGTMTV	120
SSASTKGPSV	FPLAPSSKS					139
M197-C12	LC					
QDIQMTQSPS	TLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSWLAWYQQK	PGKAPNLLIY	KASTLESGVP	60
SRFSGSGSGT	EFTLTISLQ	PDDFATYYCQ	QYNTYWTFGQ	GTKVEIK		107
M197-C12	HC					
EVQLLES GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	PYDMLWVRQA	PGKGLEWVSY	IVSSGGLTKY	60

ES 2 905 545 T3

ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAYRR	TGIPRRDAFD	IWQGGMVTV	120
SSASTKGPSV	FPLAPSSKS					139
M197-E12		LC				
QDIQMTQSPS	TLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSWLAWYQQK	PGKAPNLLIY	KASTLESGVP	60
SRFSGSGSGT	EFTLTISLQ	PDDFATYYCQ	QYNTYWTFGQ	GTKVEIK		107
M197-E12		HC				
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	TYTMRWVRQA	PGKGLEWVSS	IYPSGGKTQY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAYRR	TGIPRRDAFD	IWQGGMVTV	120
SSASTKGPSV	FPLAPSSKS					139
M197-F01		LC				
QDIQMTQSPS	TLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSWLAWYQQK	PGKAPNLLIY	KASTLESGVP	60
SRFSGSGSGT	EFTLTISLQ	PDDFATYYCQ	QYNTYWTFGQ	GTKVEIK		107
M197-F01		HC				
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	IYHMYWVRQA	PGKGLEWVSS	IGPSGGPTGY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAYRR	TGIPRRDAFD	IWQGGMVTV	120
SSASTKGPSV	FPLAPSSKS					139
M197-F03		LC				
QDIQMTQSPS	TLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSWLAWYQQK	PGKAPNLLIY	KASTLESGVP	60
SRFSGSGSGT	EFTLTISLQ	PDDFATYYCQ	QYNTYWTFGQ	GTKVEIK		107
M197-F03		HC				
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	IYSMFVRQA	PGKGLEWVSS	IGPSGGVTHY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAYRR	TGIPRRDAFD	IWQGGMVTV	120
SSASTKGPSV	FPLAPSSKS					139
M197-G10		LC				
QDIQMTQSPS	TLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSWLAWYQQK	PGKAPNLLIY	KASTLESGVP	60
SRFSGSGSGT	EFTLTISLQ	PDDFATYYCQ	QYNTYWTFGQ	GTKVEIK		107
M197-G10		HC				
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	VYAMRWVRQA	PGKGLEWVSS	IYPSGGKTWY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAYRR	TGIPRRDAFD	IWQGGMVTV	120
SSASTKGPSV	FPLAPSSKS					139
M197-G11		LC				
QDIQMTQSPS	TLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSWLAWYQQK	PGKAPNLLIY	KASTLESGVP	60
SRFSGSGSGT	EFTLTISLQ	PDDFATYYCQ	QYNTYWTFGQ	GTKVEIK		107
M197-G11		HC				
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	TYAMVWVRQA	PGKGLEWVSS	IYPSGGITTY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAYRR	TGIPRRDAFD	IWQGGMVTV	120
SSASTKGPSV	FPLAPSSKS					139
M197-H10		LC				
QDIQMTQSPS	TLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSWLAWYQQK	PGKAPNLLIY	KASTLESGVP	60
SRFSGSGSGT	EFTLTISLQ	PDDFATYYCQ	QYNTYWTFGQ	GTKVEIK		107
M197-H10		HC				
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	SYNMHWVRQA	PGKGLEWVSS	IVPSGGKTNV	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAYRR	TGIPRRDAFD	IWQGGMVTV	120

ES 2 905 545 T3

SSASTKGPSV	FPLAPSSKS						139
M197-H11		LC					
QDIQMTQSPS	TLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSWLAWYQQK	PGKAPNLLIY	KASTLESGVP	60	
SRFSGSGSGT	EFTLTIISSLO	PDDFATYYCQ	QYNTYWTFGQ	GTKVEIK		107	
M197-H11		HC					
EVQLLESFGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	IYNMIWVRQA	PGKGLEWVSS	IYPSGGWTTY	60	
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAYRR	TGIPRRDAFD	IWGQGTMTVTV	120	
SSASTKGPSV	FPLAPSSKS					139	
M198-A01		LC					
QDIQMTQSPS	TLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSWLAWYQQK	PGKAPNLLIY	KASTLESGVP	60	
SRFSGSGSGT	EFTLTIISSLO	PDDFATYYCQ	QYNTYWTFGQ	GTKVEIK		107	
M198-A01		HC					
EVQLLESFGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	PYTMWVRQA	PGKGLEWVSS	ISSSGGMTPT	60	
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAYRR	TGIPRRDAFD	IWGQGTMTVTV	120	
SSASTKGPSV	FPLAPSSKS					139	
M198-A02		LC					
QDIQMTQSPS	TLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSWLAWYQQK	PGKAPNLLIY	KASTLESGVP	60	
SRFSGSGSGT	EFTLTIISSLO	PDDFATYYCQ	QYNTYWTFGQ	GTKVEIK		107	
M198-A02		HC					
EVQLLESFGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	RYSMIWVRQA	PGKGLEWVSS	IWSSGGATEY	60	
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAYRR	TGIPRRDAFD	IWGQGTMTVTV	120	
SSASTKGPSV	FPLAPSSKS					139	
M198-A06		LC					
QDIQMTQSPS	TLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSWLAWYQQK	PGKAPNLLIY	KASTLESGVP	60	
SRFSGSGSGT	EFTLTIISSLO	PDDFATYYCQ	QYNTYWTFGQ	GTKVEIK		107	
M198-A06		HC					
EVQLLESFGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	IYSMHWVRQA	PGKGLEWVSS	IYSSGGPTKY	60	
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAYRR	TGIPRRDAFD	IWGQGTMTVTV	120	
SSASTKGPSV	FPLAPSSKS					139	
M198-A07		LC					
QDIQMTQSPS	TLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSWLAWYQQK	PGKAPNLLIY	KASTLESGVP	60	
SRFSGSGSGT	EFTLTIISSLO	PDDFATYYCQ	QYNTYWTFGQ	GTKVEIK		107	
M198-A07		HC					
EVQLLESFGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	RYQMHWVRQA	PGKGLEWVSW	ISPSGGITGY	60	
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAYRR	TGIPRRDAFD	IWGQGTMTVTV	120	
SSASTKGPSV	FPLAPSSKS					139	
M198-A08		LC					
QDIQMTQSPS	TLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSWLAWYQQK	PGKAPNLLIY	KASTLESGVP	60	
SRFSGSGSGT	EFTLTIISSLO	PDDFATYYCQ	QYNTYWTFGQ	GTKVEIK		107	
M198-A08		HC					
EVQLLESFGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	WYMMQWVRQA	PGKGLEWVSR	ISPSGGTTYA	60	
DSVKGRFTIS	RDNSKNTLYL	QMNSLRAEDT	AVYYCAYRRT	GIPRRDAFDI	WGQGTMTVTVS	120	
SASTKGPSVF	PLAPSSKS					138	
M198-A09		LC					

ES 2 905 545 T3

QDIQMTQSPS	TLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSWLAWYQQK	PGKAPNLLIY	KASTLESGVP	60
SRFSGSGSGT	EFTLTISLQ	PDDFATYYCQ	QYNTYWTFGQ	GTKVEIK		107
M198-A09 HC						
EVQLLESQGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	IYFMSWVRQA	PGKGLEWVSS	IRSSGGPTWY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAYRR	TGIPRRDAFD	IWGQGTMTVTV	120
SSASTKGPSV	FPLAPSSKS					139
M198-B09 LC						
QDIQMTQSPS	TLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSWLAWYQQK	PGKAPNLLIY	KASTLESGVP	60
SRFSGSGSGT	EFTLTISLQ	PDDFATYYCQ	QYNTYWTFGQ	GTKVEIK		107
M198-B09 HC						
EVQLLESQGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	VYSMTWVRQA	PGKGLEWVSS	IGSSGGSTTY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAYRR	TGIPRRDAFD	IWGQGTMTVTV	120
SSASTKGPSV	FPLAPSSKS					139
M198-B12 LC						
QDIQMTQSPS	TLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSWLAWYQQK	PGKAPNLLIY	KASTLESGVP	60
SRFSGSGSGT	EFTLTISLQ	PDDFATYYCQ	QYNTYWTFGQ	GTKVEIK		107
M198-B12 HC						
EVQLLESQGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	KYSMAWVRQA	PGKGLEWVSG	IYPSGGRTLY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAYRR	TGIPRRDAFD	IWGQGTMTVTV	120
SSASTKGPSV	FPLAPSSKS					139
M198-C03 LC						
QDIQMTQSPS	TLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSWLAWYQQK	PGKAPNLLIY	KASTLESGVP	60
SRFSGSGSGT	EFTLTISLQ	PDDFATYYCQ	QYNTYWTFGQ	GTKVEIK		107
M198-C03 HC						
EVQLLESQGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	RYSMSWVRQA	PGKGLEWVSG	ISPSGGGETSY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAYRR	TGIPRRDAFD	IWGQGTMTVTV	120
SSASTKGPSV	FPLAPSSKS					139
M198-C05 LC						
QDIQMTQSPS	TLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSWLAWYQQK	PGKAPNLLIY	KASTLESGVP	60
SRFSGSGSGT	EFTLTISLQ	PDDFATYYCQ	QYNTYWTFGQ	GTKVEIK		107
M198-C05 HC						
EVQLLESQGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	RYKMYWVRQA	PGKGLEWVSV	IGPSGGATFY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAYRR	TGIPRRDAFD	IWGQGTMTVTV	120
SSASTKGPSV	FPLAPSSKS					139
M198-C06 LC						
QDIQMTQSPS	TLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSWLAWYQQK	PGKAPNLLIY	KASTLESGVP	60
SRFSGSGSGT	EFTLTISLQ	PDDFATYYCQ	QYNTYWTFGQ	GTKVEIK		107
M198-C06 HC						
EVQLLESQGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	QYFMHWVRQA	PGKGLEWVSY	IYPSGGMTEY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAYRR	TGIPRRDAFD	IWGQGTMTVTV	120
SSASTKGPSV	FPLAPSSKS					139
M198-C09 LC						
QDIQMTQSPS	TLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSWLAWYQQK	PGKAPNLLIY	KASTLESGVP	60
SRFSGSGSGT	EFTLTISLQ	PDDFATYYCQ	QYNTYWTFGQ	GTKVEIK		107

ES 2 905 545 T3

M198-C09		HC				
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	IYTMYWVRQA	PGKGLEWVSS	ISPSGGWTTY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAYRR	TGIPRRDAFD	IWGQGTMTVT	120
SSASTKGPSV	FPLAPSSKS					139
M198-C10		LC				
QDIQMTQSPS	TLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSWLAWYQQK	PGKAPNLLIY	KASTLESGVP	60
SRFSGSGSGT	EFTLTISLQ	PDDFATYYCQ	QYNTYWTFGQ	GTKVEIK		107
M198-C10		HC				
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	HYMGMNWVRQ	APGKGLEWVS	SIVPSGGWTQ	60
YADSVKGRFT	ISRDNSKNTL	YLQMNSLRAE	DTAVYYCAYR	RTGIPRRDAF	DIWGQGTMTV	120
VSSASTKGPS	VFPLAPSSKS					140
M198-D12		LC				
QDIQMTQSPS	TLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSWLAWYQQK	PGKAPNLLIY	KASTLESGVP	60
SRFSGSGSGT	EFTLTISLQ	PDDFATYYCQ	QYNTYWTFGQ	GTKVEIK		107
M198-D12		HC				
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	LYVMYWVRQA	PGKGLEWVS	IVPSGGPTAY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAYRR	TGIPRRDAFD	IWGQGTMTVT	120
SSASTKGPSV	FPLAPSSKS					139
M198-E02		LC				
QDIQMTQSPS	TLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSWLAWYQQK	PGKAPNLLIY	KASTLESGVP	60
SRFSGSGSGT	EFTLTISLQ	PDDFATYYCQ	QYNTYWTFGQ	GTKVEIK		107
M198-E02		HC				
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	IYSMYWVRQA	PGKGLEWVS	IRPSGGNTKY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAYRR	TGIPRRDAFD	IWGQGTMTVT	120
SSASTKGPSV	FPLAPSSKS					139
M198-E09		LC				
QDIQMTQSPS	TLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSWLAWYQQK	PGKAPNLLIY	KASTLESGVP	60
SRFSGSGSGT	EFTLTISLQ	PDDFATYYCQ	QYNTYWTFGQ	GTKVEIK		107
M198-E09		HC				
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	IYDMNWVRQA	PGKGLEWVSS	IYPSGGRTY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAYRR	TGIPRRDAFD	IWGQGTMTVT	120
SSASTKGPSV	FPLAPSSKS					139
M198-E11		LC				
QDIQMTQSPS	TLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSWLAWYQQK	PGKAPNLLIY	KASTLESGVP	60
SRFSGSGSGT	EFTLTISLQ	PDDFATYYCQ	QYNTYWTFGQ	GTKVEIK		107
M198-E11		HC				
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	TYSMYWVRQA	PGKGLEWVSS	IYPSGGTLTY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAYRR	TGIPRRDAFD	IWGQGTMTVT	120
SSASTKGPSV	FPLAPSSKS					139
M198-F04		LC				
QDIQMTQSPS	TLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSWLAWYQQK	PGKAPNLLIY	KASTLESGVP	60
SRFSGSGSGT	EFTLTISLQ	PDDFATYYCQ	QYNTYWTFGQ	GTKVEIK		107
M198-F04		HC				
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	IYDMWWVRQA	PGKGLEWVSS	IRPSGGITKY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAYRR	TGIPRRDAFD	IWGQGTMTVT	120
SSASTKGPSV	FPLAPSSKS					139

ES 2 905 545 T3

SSASTKGPSV	FPLAPSSKS						139
M198-F08		LC					
QDIQMTQSPS	TLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSWLAWYQQK	PGKAPNLLIY	KASTLESGVP		60
SRFSGSGSGT	EFTLTISSLQ	PDDFATYYCQ	QYNTYWTFGQ	GTKVEIK			107
M198-F08		HC					
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	VYSMWVVRQA	PGKGLEWVSS	ISSSGGMTEY		60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAYRR	TGIPRRDAFD	IWQGQTMVTV		120
SSASTKGPSV	FPLAPSSKS						139
M198-F09		LC					
QDIQMTQSPS	TLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSWLAWYQQK	PGKAPNLLIY	KASTLESGVP		60
SRFSGSGSGT	EFTLTISSLQ	PDDFATYYCQ	QYNTYWTFGQ	GTKVEIK			107
M198-F09		HC					
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	VYNMHVVRQA	PGKGLEWVSS	IYPSGGMTYY		60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAYRR	TGIPRRDAFD	IWQGQTMVTV		120
SSASTKGPSV	FPLAPSSKS						139
M198-F12		LC					
QDIQMTQSPS	TLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSWLAWYQQK	PGKAPNLLIY	KASTLESGVP		60
SRFSGSGSGT	EFTLTISSLQ	PDDFATYYCQ	QYNTYWTFGQ	GTKVEIK			107
M198-F12		HC					
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	IYTMWVVRQA	PGKGLEWVSS	IWSSGGQTKY		60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAYRR	TGIPRRDAFD	IWQGQTMVTV		120
SSASTKGPSV	FPLAPSSKS						139
M198-G03		LC					
QDIQMTQSPS	TLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSWLAWYQQK	PGKAPNLLIY	KASTLESGVP		60
SRFSGSGSGT	EFTLTISSLQ	PDDFATYYCQ	QYNTYWTFGQ	GTKVEIK			107
M198-G03		HC					
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	QYTMWVVRQA	PGKGLEWVSW	IYSSRANYAD		60
ADSVKGRFTISR	DNSKNTLYLQ	MNSLRAEDTA	VYYCAYRRTG	IPRRDAFDIW	GQGTMTVTVSS		120
ASTKGPSVFP	LAPSSKS						137
M198-G07		LC					
QDIQMTQSPS	TLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSWLAWYQQK	PGKAPNLLIY	KASTLESGVP		60
SRFSGSGSGT	EFTLTISSLQ	PDDFATYYCQ	QYNTYWTFGQ	GTKVEIK			107
M198-G07		HC					
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	IYDMTWVRQA	PGKGLEWVSS	IYPSGGQTIY		60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAYRR	TGIPRRDAFD	IWQGQTMVTV		120
SSASTKGPSV	FPLAPSSKS						139
M198-H02		LC					
QDIQMTQSPS	TLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSWLAWYQQK	PGKAPNLLIY	KASTLESGVP		60
SRFSGSGSGT	EFTLTISSLQ	PDDFATYYCQ	QYNTYWTFGQ	GTKVEIK			107
M198-H02		HC					
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	PYNMYVVRQA	PGKGLEWVSW	IVPGGVTKYA		60
DSVKGRFTIS	RDNSKNTLYL	QMNSLRAEDT	AVYYCAYRRT	GIPRRDAFDI	WGQGTMTVTVS		120
SSASTKGPSV	FPLAPSSKS						138

ES 2 905 545 T3

M198-H08		LC				
QDIQMTQSPS	TLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSWLAWYQQK	PGKAPNLLIY	KASTLESGVP	60
SRFSGSGSGT	EFTLTISSLQ	PDDFATYYCQ	QYNTYWTFGQ	GTKVEIK		107
M198-H08		HC				
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	IYDMYWVRQA	PGKGLEWVSS	IGPSGGPTAY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAYRR	TGIPRRDAFD	IWGQGTMTVT	120
SSASTKGPSV	FPLAPSSKS					139
M198-H09		LC				
QDIQMTQSPS	TLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSWLAWYQQK	PGKAPNLLIY	KASTLESGVP	60
SRFSGSGSGT	EFTLTISSLQ	PDDFATYYCQ	QYNTYWTFGQ	GTKVEIK		107
M198-H09		HC				
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	IYLMIWVRQA	PGKGLEWVSY	IGPSGGPTEY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAYRR	TGIPRRDAFD	IWGQGTMTVT	120
SSASTKGPSV	FPLAPSSKS					139
M199-A08		LC				
QDIQMTQSPS	TLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSWLAWYQQK	PGKAPNLLIY	KASTLESGVP	60
SRFSGSGSGT	EFTLTISSLQ	PDDFATYYCQ	QYNTYWTFGQ	GTKVEIK		107
M199-A08		HC				
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	HYIMMWVRQA	PGKGLEWVSG	IYSSGGITVY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAYRR	IGVPRRDEFD	IWGQGTMTVT	120
SSASTKGPSV	FPLAPSSKS					139
M199-A11		LC				
QDIQMTQSPS	TLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSWLAWYQQK	PGKAPNLLIY	KASTLESGVP	60
SRFSGSGSGT	EFTLTISSLQ	PDDFATYYCQ	QYNTYWTFGQ	GTKVEIK		107
M199-A11		HC				
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	HYIMMWVRQA	PGKGLEWVSG	IYSSGGITVY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAYRR	RGIPRRDAFD	IWGQGTMTVT	120
SSASTKGPSV	FPLAPSSKS					139
M199-B01		LC				
QDIQMTQSPS	TLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSWLAWYQQK	PGKAPNLLIY	KASTLESGVP	60
SRFSGSGSGT	EFTLTISSLQ	PDDFATYYCQ	QYNTYWTFGQ	GTKVEIK		107
M199-B01		HC				
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	HYIMMWVRQA	PGKGLEWVSG	IYSSGGITVY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAFRR	TGIPRRDAFD	NWGQGTMTVT	120
SSASTKGPSV	FPLAPSSKS					139
M200-A10		LC				
QDIQMTQSPS	TLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSWLAWYQQK	PGKAPNLLIY	KASTLESGVP	60
SRFSGSGSGT	EFTLTISSLQ	PDDFATYYCQ	QYNTYWTFGQ	GTKVEIK		107
M200-A10		HC				
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	HYIMMWVRQA	PGKGLEWVSG	IYSSGGITVY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAYRR	TGVPRRDSFD	IWGQGTMTVT	120
SSASTKGPSV	FPLAPSSKS					139
M200-B01		LC				
QDIQMTQSPS	TLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSWLAWYQQK	PGKAPNLLIY	KASTLESGVP	60
SRFSGSGSGT	EFTLTISSLQ	PDDFATYYCQ	QYNTYWTFGQ	GTKVEIK		107

ES 2 905 545 T3

M200-B01	HC					
EVQLLES GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	HYIMMWVRQA	PGKGLEWVSG	IYSSGGITVY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAYRR	TGIPRRDAFD	SWGQGTMTVTV	120
SSASTKGPSV	FPLAPSSKS					139
M200-D03	LC					
QDIQMTQSPS	TLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSWLAWYQQK	PGKAPNLLIY	KASTLESGVP	60
SRFSGSGSGT	EFTLTISLQ	PDDFATYYCQ	QYNTYWTFGQ	GTKVEIK		107
M200-D03	HC					
EVQLLES GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	HYIMMWVRQA	PGKGLEWVSG	IYSSGGITVY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAWRR	IGVPRRDSFD	MWGQGTMTVTV	120
SSASTKGPSV	FPLAPSSKS					139
M200-E11	LC					
QDIQMTQSPS	TLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSWLAWYQQK	PGKAPNLLIY	KASTLESGVP	60
SRFSGSGSGT	EFTLTISLQ	PDDFATYYCQ	QYNTYWTFGQ	GTKVEIK		107
M200-E11	HC					
EVQLLES GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	HYIMMWVRQA	PGKGLEWVSG	IYSSGGITVY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAYRR	TGVPRRDAFD	NWGQGTMTVTV	120
SSASTKGPSV	FPLAPSSKS					139
M200-F01	LC					
QDIQMTQSPS	TLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSWLAWYQQK	PGKAPNLLIY	KASTLESGVP	60
SRFSGSGSGT	EFTLTISLQ	PDDFATYYCQ	QYNTYWTFGQ	GTKVEIK		107
M200-F01	HC					
EVQLLES GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	HYIMMWVRQA	PGKGLEWVSG	IYSSGGITVY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAYRR	MGIPRRNAFD	IWGQGTMTVTV	120
SSASTKGPSV	FPLAPSSKS					139
M200-H07	LC					
QDIQMTQSPS	TLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSWLAWYQQK	PGKAPNLLIY	KASTLESGVP	60
SRFSGSGSGT	EFTLTISLQ	PDDFATYYCQ	QYNTYWTFGQ	GTKVEIK		107
M200-H07	HC					
EVQLLES GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	HYIMMWVRQA	PGKGLEWVSG	IYSSGGITVY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAYRR	TGVPRRDAFD	NWGQGTMTVTV	120
SSASTKGPSV	FPLAPSSKS					139
M201-A06	LC					
QDIQMTQSPS	TLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSWLAWYQQK	PGKAPNLLIY	KASTLESGVP	60
SRFSGSGSGT	EFTLTISLQ	PDDFATYYCQ	QYNTYWTFGQ	GTKVEIK		107
M201-A06	HC					
EVQLLES GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	HYIMMWVRQA	PGKGLEWVSG	IYSSGGITVY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAYRR	TGIPRRDVFD	IWGQGTMTVTV	120
SSASTKGPSV	FPLAPSSKS					139
M201-A07	LC					
QDIQMTQSPS	TLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSWLAWYQQK	PGKAPNLLIY	KASTLESGVP	60
SRFSGSGSGT	EFTLTISLQ	PDDFATYYCQ	QYNTYWTFGQ	GTKVEIK		107
M201-A07	HC					

ES 2 905 545 T3

EVQLLES	GGG	LVQPGG	SLRL	SCAASG	FTFS	HYIMMW	VVRQA	PGKGLE	WVSG	IYSSGG	ITVY	60
ADSVKGR	FTI	SRDNSK	NTRY	LQMNSL	RAED	TAVYYC	AYRR	TGVPRR	DEFD	IWGQGT	MVTV	120
SSASTKG	PSV	FPLAPSS	SKS									139
M201-F11 LC												
QDIQMTQ	SPS	TLSASV	GDRV	TITCRAS	QSI	SSWLAW	YQQK	PGKAPN	LLIY	KASTLES	GVP	60
SRFSGSG	SGT	EFTLT	ISSLO	PDDFAT	YYCQ	QYNTY	WTFGQ	GTKVEI	K			107
M201-F11 HC												
EVQLLES	GGG	LVQPGG	SLRL	SCAASG	FTFS	HYIMMW	VVRQA	PGKGLE	WVSG	IYSSGG	ITVY	60
ADSVKGR	FTI	SRDNSK	NTRY	LQMNSL	RAED	TAVYYC	AYRR	SGIPRR	DAFD	IWGQGT	MVTV	120
SSASTKG	PSV	FPLAPSS	SKS									139
M201-H06 LC												
QDIQMTQ	SPS	TLSASV	GDRV	TITCRAS	QSI	SSWLAW	YQQK	PGKAPN	LLIY	KASTLES	GVP	60
SRFSGSG	SGT	EFTLT	ISSLO	PDDFAT	YYCQ	QYNTY	WTFGQ	GTKVEI	K			107
M201-H06 HC												
EVQLLES	GGG	LVQPGG	SLRL	SCAASG	FTFS	HYIMMW	VVRQA	PGKGLE	WVSG	IYSSGG	ITVY	60
ADSVKGR	FTI	SRDNSK	NTRY	LQMNSL	RAED	TAVYYC	AYRR	TGVPRR	DAFD	IWGQGT	MVTV	120
SSASTKG	PSV	FPLAPSS	SKS									139
M201-H08 LC												
QDIQMTQ	SPS	TLSASV	GDRV	TITCRAS	QSI	SSWLAW	YQQK	PGKAPN	LLIY	KASTLES	GVP	60
SRFSGSG	SGT	EFTLT	ISSLO	PDDFAT	YYCQ	QYNTY	WTFGQ	GTKVEI	K			107
M201-H08 HC												
EVQLLES	GGG	LVQPGG	SLRL	SCAASG	FTFS	HYIMMW	VVRQA	PGKGLE	WVSG	IYSSGG	ITVY	60
ADSVKGR	FTI	SRDNSK	NTRY	LQMNSL	RAED	TAVYYC	AYRR	TGVPRR	DALD	NWGQGT	MVTV	120
SSASTKG	PSV	FPLAPSS	SKS									139
M202-A01 LC												
QDIQMTQ	SPS	TLSASV	GDRV	TITCRAS	QSI	SSWLAW	YQQK	PGKAPN	LLIY	KASTLES	GVP	60
SRFSGSG	SGT	EFTLT	ISSLO	PDDFAT	YYCQ	QYNTY	WTFGQ	GTKVEI	K			107
M202-A01 HC												
EVQLLES	GGG	LVQPGG	SLRL	SCAASG	FTFS	HYIMMW	VVRQA	PGKGLE	WVSG	IYSSGG	ITVY	60
ADSVKGR	FTI	SRDNSK	NTRY	LQMNSL	RAED	TAVYYC	AYRR	IGVPRR	DAFD	IWGQGT	MVTV	120
SSASTKG	PSV	FPLAPSS	SKS									139
M202-A04 LC												
QDIQMTQ	SPS	TLSASV	GDRV	TITCRAS	QSI	SSWLAW	YQQK	PGKAPN	LLIY	KASTLES	GVP	60
SRFSGSG	SGT	EFTLT	ISSLO	PDDFAT	YYCQ	QYNTY	WTFGQ	GTKVEI	K			107
M202-A04 HC												
EVQLLES	GGG	LVQPGG	SLRL	SCAASG	FTFS	HYIMMW	VVRQA	PGKGLE	WVSG	IYSSGG	ITVY	60
ADSVKGR	FTI	SRDNSK	NTRY	LQMNSL	RAED	TAVYYC	AYRR	KGIPRR	DDFD	IWGQGT	MVTV	120
SSASTKG	PSV	FPLAPSS	SKS									139
M202-A08 LC												
QDIQMTQ	SPS	TLSASV	GDRV	TITCRAS	QSI	SSWLAW	YQQK	PGKAPN	LLIY	KASTLES	GVP	60
SRFSGSG	SGT	EFTLT	ISSLO	PDDFAT	YYCQ	QYNTY	WTFGQ	GTKVEI	K			107
M202-A08 HC												
EVQLLES	GGG	LVQPGG	SLRL	SCAASG	FTFS	HYIMMW	VVRQA	PGKGLE	WVSG	IYSSGG	ITVY	60
ADSVKGR	FTI	SRDNSK	NTRY	LQMNSL	RAED	TAVYYC	AYRR	TGIPRW	DAFD	IWGQGT	MVTV	120
SSASTKG	PSV	FPLAPSS	SKS									139

ES 2 905 545 T3

M202-A10	LC					
QDIQMTQSPS	TLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSWLAWYQQK	PGKAPNLLIY	KASTLESGVP	60
SRFSGSGSGT	EFTLTISSLQ	PDDFATYYCQ	QYNTYWTFGQ	GTKVEIK		107
M202-A10	HC					
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	HYIMMWVRQA	PGKGLEWVSG	IYSSGGITVY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAFRR	TGIPRRDSFD	IWGQGTMTVT	120
SSASTKGPSV	FPLAPSSKS					139
M202-A12	LC					
QDIQMTQSPS	TLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSWLAWYQQK	PGKAPNLLIY	KASTLESGVP	60
SRFSGSGSGT	EFTLTISSLQ	PDDFATYYCQ	QYNTYWTFGQ	GTKVEIK		107
M202-A12	HC					
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	HYIMMWVRQA	PGKGLEWVSG	IYSSGGITVY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAYQR	TGVPRRDSFN	IWGQGTMTVT	120
SSASTKGPSV	FPLAPSSKS					139
M202-B03	LC					
QDIQMTQSPS	TLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSWLAWYQQK	PGKAPNLLIY	KASTLESGVP	60
SRFSGSGSGT	EFTLTISSLQ	PDDFATYYCQ	QYNTYWTFGQ	GTKVEIK		107
M202-B03	HC					
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	HYIMMWVRQA	PGKGLEWVSG	IYSSGGITVY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAYRR	TGVPRRDDFD	IWGQGTMTVT	120
SSASTKGPSV	FPLAPSSKS					139
M202-B04	LC					
QDIQMTQSPS	TLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSWLAWYQQK	PGKAPNLLIY	KASTLESGVP	60
SRFSGSGSGT	EFTLTISSLQ	PDDFATYYCQ	QYNTYWTFGQ	GTKVEIK		107
M202-B04	HC					
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	HYIMMWVRQA	PGKGLEWVSG	IYSSGGITVY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAYRR	SGVPRRDDFD	IWGQGTMTVT	120
SSASTKGPSV	FPLAPSSKS					139
M202-C01	LC					
QDIQMTQSPS	TLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSWLAWYQQK	PGKAPNLLIY	KASTLESGVP	60
SRFSGSGSGT	EFTLTISSLQ	PDDFATYYCQ	QYNTYWTFGQ	GTKVEIK		107
M202-C01	HC					
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	HYIMMWVRQA	PGKGLEWVSG	IYSSGGITVY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAYRR	TGVPRWDDFD	IWGQGTMTVT	120
SSASTKGPSV	FPLAPSSKS					139
M202-C02	LC					
QDIQMTQSPS	TLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSWLAWYQQK	PGKAPNLLIY	KASTLESGVP	60
SRFSGSGSGT	EFTLTISSLQ	PDDFATYYCQ	QYNTYWTFGQ	GTKVEIK		107
M202-C02	HC					
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	HYIMMWVRQA	PGKGLEWVSG	IYSSGGITVY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAYRR	PGVPRRDAFD	IWGQGTMTVT	120
SSASTKGPSV	FPLAPSSKS					139
M202-C09	LC					
QDIQMTQSPS	TLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSWLAWYQQK	PGKAPNLLIY	KASTLESGVP	60

ES 2 905 545 T3

SRFSGSGSGT	EFTLTISLQ	PDDFATYYCQ	QYNTYWTFGQ	GTKVEIK		107
M202-C09		HC				
EVQLLESQGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	HYIMMWVRQA	PGKGLEWVSG	IYSSGGITVY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAYRR	IGVPRRDDFD	IWGQGTMTVTV	120
SSASTKGPSV	FPLAPSSKS					139
M202-D09		LC				
QDIQMTQSPS	TLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSWLAWYQQK	PGKAPNLLIY	KASTLESGVP	60
SRFSGSGSGT	EFTLTISLQ	PDDFATYYCQ	QYNTYWTFGQ	GTKVEIK		107
M202-D09		HC				
EVQLLESQGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	HYIMMWVRQA	PGKGLEWVSG	IYSSGGITVY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAYRR	IGVPRRDSFD	IWGQGTMTVTV	120
SSASTKGPSV	FPLAPSSKS					139
M202-E03		LC				
QDIQMTQSPS	TLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSWLAWYQQK	PGKAPNLLIY	KASTLESGVP	60
SRFSGSGSGT	EFTLTISLQ	PDDFATYYCQ	QYNTYWTFGQ	GTKVEIK		107
M202-E03		HC				
EVQLLESQGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	HYIMMWVRQA	PGKGLEWVSG	IYSSGGITVY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAYRR	TGIPRRDAFE	IWGQGTMTVTV	120
SSASTKGPSV	FPLAPSSKS					139
M202-E06		LC				
QDIQMTQSPS	TLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSWLAWYQQK	PGKAPNLLIY	KASTLESGVP	60
SRFSGSGSGT	EFTLTISLQ	PDDFATYYCQ	QYNTYWTFGQ	GTKVEIK		107
M202-E06		HC				
EVQLLESQGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	HYIMMWVRQA	PGKGLEWVSG	IYSSGGITVY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAYRR	RGVPRRDDFD	IWGQGTMTVTV	120
SSASTKGPSV	FPLAPSSKS					139
M202-F06		LC				
QDIQMTQSPS	TLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSWLAWYQQK	PGKAPNLLIY	KASTLESGVP	60
SRFSGSGSGT	EFTLTISLQ	PDDFATYYCQ	QYNTYWTFGQ	GTKVEIK		107
M202-F06		HC				
EVQLLESQGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	HYIMMWVRQA	PGKGLEWVSG	IYSSGGITVY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAYRR	TGVPRWDAFD	IWGQGTMTVTV	120
SSASTKGPSV	FPLAPSSKS					139
M202-G03		LC				
QDIQMTQSPS	TLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSWLAWYQQK	PGKAPNLLIY	KASTLESGVP	60
SRFSGSGSGT	EFTLTISLQ	PDDFATYYCQ	QYNTYWTFGQ	GTKVEIK		107
M202-G03		HC				
EVQLLESQGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	HYIMMWVRQA	PGKGLEWVSG	IYSSGGITVY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAFRR	TGVPRRDSFE	IWGQGTMTVTV	120
SSASTKGPSV	FPLAPSSKS					139
M202-H03		LC				
QDIQMTQSPS	TLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSWLAWYQQK	PGKAPNLLIY	KASTLESGVP	60
SRFSGSGSGT	EFTLTISLQ	PDDFATYYCQ	QYNTYWTFGQ	GTKVEIK		107
M202-H03		HC				
EVQLLESQGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	HYIMMWVRQA	PGKGLEWVSG	IYSSGGITVY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAFRR	TGVPRWDDFD	IWGQGTMTVTV	120
SSASTKGPSV	FPLAPSSKS					139
M202-H05		LC				
QDIQMTQSPS	TLSASVGDRV	TITCRASQSI	SSWLAWYQQK	PGKAPNLLIY	KASTLESGVP	60
SRFSGSGSGT	EFTLTISLQ	PDDFATYYCQ	QYNTYWTFGQ	GTKVEIK		107
M202-H05		HC				
EVQLLESQGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	HYIMMWVRQA	PGKGLEWVSG	IYSSGGITVY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAFRR	TGVPRRDVFD	IWGQGTMTVTV	120
SSASTKGPSV	FPLAPSSKS					139

Tabla 9. Secuencias de anticuerpos obtenidos de bibliotecas de maduración por afinidad enriquecidas en CDR1/2 y CDR3 basadas en X63-G06

I.D. de anticuerpo	% de inhibición a 10 nM	Ki,ap de pCal humana (nM)	LV-CDR1	LV-CDR2	LV-CDR3	HV-CDR1	HV-CDR2	HV-CDR3
M209-F04	97,6	0,09	RTSQFVNSNYLA	GASSRAT	QQSSRTPWT	HYLMT	YISPSGGHTIYADSVKG	VARGIAARSRTSYLDq
M209-C11	96,2	0,14	RTSQFVNSNYLA	GASSRAT	QQSSRTPWT	HYLMT	YISPSGGHTIYADSVKG	VGGIGRGRSRTSYFAq
M206-H08	96,0	0,17	RTSQFVNSNYLA	GASSRAT	QQSSRTPWT	DYMMMA	SIVPSGGHTIYADSVKG	VARGIAARSRTSYFDY
M210-C12	95,6	0,16	RTSQFVNSNYLA	GASSRAT	QQSSRTPWT	HYLMT	YISPSGGHTIYADSVKG	VAOGIAARSRTSSVDq
M208-F04	95,4	0,2	RTSQFVNSNYLA	GASSRAT	QQSSRTPWT	HYLMT	YISPSGGHTIYADSVKG	VARGIAARSRTSFFDY
M206-B10	94,7	0,3	RTSQFVNSNYLA	GASSRAT	QQSSRTPWT	qYLMMA	SIYPSGGWTKYADSVKG	VARGIAARSRTSYFDY
M208-H02	94,4	0,2	RTSQFVNSNYLA	GASSRAT	QQSSRTPWT	HYLMT	YISPSGGHTIYADSVKG	VARGIASRSTRYCDY
M210-G04	94,2	0,3	RTSQFVNSNYLA	GASSRAT	QQSSRTPWT	HYLMT	YISPSGGHTIYADSVKG	VATGIVARSRTRYFDq
M210-H06	93,8	0,2	RTSQFVNSNYLA	GASSRAT	QQSSRTPWT	HYLMT	YISPSGGHTIYADSVKG	VARGIAARSRTRYFDY
M208-E10	93,7	0,09	RTSQFVNSNYLA	GASSRAT	QQSSRTPWT	HYLMT	YISPSGGHTIYADSVKG	VAQGISARSRTSYFDY
M209-B09	93,5	0,2	RTSQFVNSNYLA	GASSRAT	QQSSRTPWT	HYLMT	YISPSGGHTIYADSVKG	VAQGVARSRTSYLHq
M209-C12	93,4		RTSQFVNSNYLA	GASSRAT	QQSSRTPWT	HYLMT	YISPSGGHTIYADSVKG	VGRGIAARSRTSqLDY
M208-G03	93,4	0,3	RTSQFVNSNYLA	GASSRAT	QQSSRTPWT	HYLMT	YISPSGGHTIYADSVKG	VARGIAARSRTSYLDY
M206-A06	93,0		RTSQFVNSNYLA	GASSRAT	QQSSRTPWT	NYMMG	SISPSGGLTKYADSVKG	VARGIAARSRTSYFDY
M210-H07	92,8	0,4	RTSQFVNSNYLA	GASSRAT	QQSSRTPWT	HYLMT	YISPSGGHTIYADSVKG	VARGIAARSRTRYFDq
M206-F01	92,6	0,2	RTSQFVNSNYLA	GASSRAT	QQSSRTPWT	GYMMV	RISPSGGPTIYADSVKG	VARGIAARSRTSYFDY
M208-F10	92,5	0,2	RTSQFVNSNYLA	GASSRAT	QQSSRTPWT	HYLMT	YISPSGGHTIYADSVKG	VARGIAARSRTSYFDq
M209-E02	92,4	0,3	RTSQFVNSNYLA	GASSRAT	QQSSRTPWT	HYLMT	YISPSGGHTIYADSVKG	VARGIAARSRTILLDq
M208-C06	91,7	0,4	RTSQFVNSNYLA	GASSRAT	QQSSRTPWT	HYLMT	YISPSGGHTIYADSVKG	VARGIAARSRTSFIDY
M205-D04	91,5	0,4	RTSQFVNSNYLA	GASSRAT	QQSSRTPWT	TYKMq	SISPSGGPTNYADSVKG	VARGIAARSRTSYFDY
M210-G10	91,2	0,4	RTSQFVNSNYLA	GASSRAT	QQSSRTPWT	HYLMT	YISPSGGHTIYADSVKG	VARGIAARSRTSYLDF
M207-A04	90,9		RTSQFVNSNYLA	GASSRAT	QQSSRTPWT	HYLMT	YISPSGGHTIYADSVKG	VARGIAARSRTSFDY
M210-B02	90,9	0,2	RTSQFVNSNYLA	GASSRAT	QQSSRTPWT	HYLMT	YISPSGGHTIYADSVKG	VARGIAARSRTSYFNq

I.D. de anticuerpo	% de inhibición a 10 nM	Ki,ap de pCal humana (nM)	LV-CDR1	LV-CDR2	LV-CDR3	HV-CDR1	HV-CDR2	HV-CDR3
M208-B01	90,1		RTSQFVNSNYLA	GASSRAT	QQSSRTPWT	HYLMT	YISPSGGHTIYADSVKG	VARGIAARSRTSFFDq
M209-G07	89,8		RTSQFVNSNYLA	GASSRAT	QQSSRTPWT	HYLMT	YISPSGGHTIYADSVKG	VARGIAARSRTSYFDI
M204-A02	89,5		RTSQFVNSNYLA	GASSRAT	QQSSRTPWT	DYMMT	YISPSGGLTSYADSVKG	VARGIAARSRTSYFDY
M206-H01	87,6		RTSQFVNSNYLA	GASSRAT	QQSSRTPWT	EYMMV	RISPSGGTTEYADSVKG	VARGIAARSRTSYFDY
M209-B11	87,3		RTSQFVNSNYLA	GASSRAT	QQSSRTPWT	HYLMT	YISPSGGHTIYADSVKG	VARGIAARSRTSYFDq
M206-F09	86,8		RTSQFVNSNYLA	GASSRAT	QQSSRTPWT	VYMMMS	SIVPSGGSTTYADSVKG	VARGIAARSRTSYFDY
M209-C02	86,8		RTSQFVNSNYLA	GASSRAT	QQSSRTPWT	HYLMT	YISPSGGHTIYADSVKG	VARGIAYRRRTSYFDY
M208-G02	86,7		RTSQFVNSNYLA	GASSRAT	QQSSRTPWT	HYLMT	YISPSGGHTIYADSVKG	VARGIADRSRTSYSDY
M205-C11	86,5		RTSQFVNSNYLA	GASSRAT	QQSSRTPWT	QYMMM	RISPSGGSTLYADSVKG	VARGIAARSRTSYFDY
M205-H08	85,9		RTSQFVNSNYLA	GASSRAT	QQSSRTPWT	DYMMM	SIVPSGGHTqYADSVKG	VARGIAARSRTSYFDY
M210-H01	85,5		RTSQFVNSNYLA	GASSRAT	QQSSRTPWT	HYLMT	YISPSGGHTIYADSVKG	VARGIAARSNSqQDY
M209-D12	85,4		RTSQFVNSNYLA	GASSRAT	QQSSRTPWT	HYLMT	YISPSGGHTIYADSVKG	VARGIAARSRTSYFDq
M209-H09	85,3		RTSQFVNSNYLA	GASSRAT	QQSSRTPWT	HYLMT	YISPSGGHTIYADSVKG	VARGIAARSRTVYFDH
M204-E12	84,1		RTSQFVNSNYLA	GASSRAT	QQSSRTPWT	TYMMq	YIGPSGGKTDYADSVKG	VARGIAARSRTSYFDY
M209-H03	82,6		RTSQFVNSNYLA	GASSRAT	QQSSRTPWT	HYLMT	YISPSGGHTIYADSVKG	VAQGIARSRTTqFDY
M206-H05	82,5		RTSQFVNSNYLA	GASSRAT	QQSSRTPWT	GKVMq	SISPSGGITMYADSVKG	VARGIAARSRTSYFDY
M209-D03	80,4		RTSQFVNSNYLA	GASSRAT	QQSSRTPWT	HYLMT	YISPSGGHTIYADSVKG	VGRGIAARSRTSFFDq
M205-A02	80,3		RTSQFVNSNYLA	GASSRAT	QQSSRTPWT	TYLMA	GIVSSGGRTLYADSVKG	VARGIAARSRTSYFDY
M208-A10	78,5		RTSQFVNSNYLA	GASSRAT	QQSSRTPWT	HYLMT	YISPSGGHTIYADSVKG	VARGIAARSRTSqFDH

I.D. de anticuerpo	% de inhibición a 10 nM	Ki,ap de pCal humana (nM)	LV-CDR1	LV-CDR2	LV-CDR3	HV-CDR1	HV-CDR2	HV-CDR3
M205-E11	78,2		RTSQFVNSNYLA	GASSRAT	QQSSRTPWT	NYTMG	SISPSGGKTDYADSVKG	VARGIAARSRTSYFDY
M206-E02	77,6		RTSQFVNSNYLA	GASSRAT	QQSSRTPWT	EYMMM	VISPSGGQTHYADSVKG	VARGIAARSRTSYFDY
M205-H01	77,1		RTSQFVNSNYLA	GASSRAT	QQSSRTPWT	NYTMQ	YISPSGGYTGADSVKG	VARGIAARSRTSYFDY
M207-A02	76,6		RTSQFVNSNYLA	GASSRAT	QQSSRTPWT	HYLMT	YISPSGGHTIYADSVKG	VARGIAARSRTINLDY
M209-H07	76,1		RTSQFVNSNYLA	GASSRAT	QQSSRTPWT	HYLMT	YISPSGGHTIYADSVKG	VARGIAARqRTSYVDY
M209-G01	74,8		RTSQFVNSNYLA	GASSRAT	QQSSRTPWT	HYLMT	YISPSGGHTIYADSVKG	VaQISGRSLSYVDY
M210-A06	74,8		RTSQFVNSNYLA	GASSRAT	QQSSRTPWT	HYLMT	YISPSGGHTIYADSVKG	VARGIAARSRTSqFDY
M209-D02	74,7		RTSQFVNSNYLA	GASSRAT	QQSSRTPWT	HYLMT	YISPSGGHTIYADSVKG	VARGITARSRTSYFDD
M205-B04	71,1		RTSQFVNSNYLA	GASSRAT	QQSSRTPWT	NYDMI	SISSSGGTTKYADSVKG	VARGIAARSRTSYFDY
M203-A03	69,1		RTSQFVNSNYLA	GASSRAT	QQSSRTPWT	VYMMI	SISPSGGQTTYADSVKG	VARGIAARSRTSYFDY
M209-E03	68,8		RTSQFVNSNYLA	GASSRAT	QQSSRTPWT	HYLMT	YISPSGGHTIYADSVKG	qARGIAARSRTSYFDY
M207-A01	67,2		RTSQFVNSNYLA	GASSRAT	QQSSRTPWT	HYLMT	YISPSGGHTIYADSVKG	VARGISARSRTSCFDY
M206-C03	65,5		RTSQFVNSNYLA	GASSRAT	QQSSRTPWT	qYMMV	SIYSSGGNTPYADSVKG	VARGIAARSRTSYFDY
M207-C05	61,4		RTSQFVNSNYLA	GASSRAT	QQSSRTPWT	HYLMT	YISPSGGHTIYADSVKG	VGRGIAARSRTSYFDK
M205-A12	58,8		RTSQFVNSNYLA	GASSRAT	QQSSRTPWT	QYDMI	YISSGGFTRYADSVKG	VARGIAARSRTSYFDY
M205-F03	58,6		RTSQFVNSNYLA	GASSRAT	QQSSRTPWT	SqQMV	YISPSGGNTYYADSVKG	VARGIAARSRTSYFDY
M203-A01	51,4		RTSQFVNSNYLA	GASSRAT	QQSSRTPWT	NYLMA	WIVPSGGYTEYADSVKG	VARGIAARSRTSYFDY
M209-B01	47,0		RTSQFVNSNYLA	GASSRAT	QQSSRTPWT	HYLMT	YISPSGGHTIYADSVKG	VARGIVARSRTSNFdq
M208-D12	43,7		RTSQFVNSNYLA	GASSRAT	QQSSRTPWT	HYLMT	YISPSGGHTIYADSVKG	LARGIAARSRTSYqDI
M206-H04	19,0		RTSQFVNSNYLA	GASSRAT	QQSSRTPWT	SYMMV	SISPSGGYTIqADSVKG	VARGIAARSRTSYFDY

Secuencias de aminoácidos del dominio variable de la cadena ligera (LC) y cadena pesada (HC) de anticuerpos pCa1 obtenidos de bibliotecas de maduración por afinidad enriquecidas en CDR1/2 y CDR3 basadas en X63-G06.

M203-A01		LC					
QDIQMTQSPG	TLSSLSPGERA	TLSCRTSQFV	NSNYLAWYQQ	TPGQAPRLLI	YGASSRATGI	60	
PDRFSGTGYG	TDFTLTISRL	EPEDYGTYYC	QQSSRTPWTF	GQGTRVEIK		109	
M203-A01		HC					
EVQLLES GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	NYLMAWVRQA	PGKGLEWVSW	IVPSGGYTEY	60	
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARVA	RGIAARSRTS	YFDYWGQGT	120	
VTVSSASTKG	PSVFPLAPSS	KS				142	
M203-A03		LC					
QDIQMTQSPG	TLSSLSPGERA	TLSCRTSQFV	NSNYLAWYQQ	TPGQAPRLLI	YGASSRATGI	60	
PDRFSGTGYG	TDFTLTISRL	EPEDYGTYYC	QQSSRTPWTF	GQGTRVEIK		109	
M203-A03		HC					
EVQLLES GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	VYMMIWVRQA	PGKGLEWVSS	ISPSGGQTTY	60	
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARVA	RGIAARSRTS	YFDYWGQGT	120	
VTVSSASTKG	PSVFPLAPSS	KS				142	
M204-A02		LC					
QDIQMTQSPG	TLSSLSPGERA	TLSCRTSQFV	NSNYLAWYQQ	TPGQAPRLLI	YGASSRATGI	60	
PDRFSGTGYG	TDFTLTISRL	EPEDYGTYYC	QQSSRTPWTF	GQGTRVEIK		109	
M204-A02		HC					
EVQLLES GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	DYMMTWVRQA	PGKGLqWVS	ISPSGGLTSY	60	
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARVA	RGIAARSRTS	YFDYWGQGT	120	
VTVSSASTKG	PSVFPLAPSS	KS				142	
M204-E12		LC					
QDIQMTQSPG	TLSSLSPGERA	TLSCRTSQFV	NSNYLAWYQQ	TPGQAPRLLI	YGASSRATGI	60	
PDRFSGTGYG	TDFTLTISRL	EPEDYGTYYC	QQSSRTPWTF	GQGTRVEIK		109	
M204-E12		HC					
EVQLLES GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	TYMMqWVRQA	PGKGLEWVS	IGPSGGKTDY	60	
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARVA	RGIAARSRTS	YFDYWGQGT	120	
VTVSSASTKG	PSVFPLAPSS	KS				142	
M205-A02		LC					
QDIQMTQSPG	TLSSLSPGERA	TLSCRTSQFV	NSNYLAWYQQ	TPGQAPRLLI	YGASSRATGI	60	
PDRFSGTGYG	TDFTLTISRL	EPEDYGTYYC	QQSSRTPWTF	GQGTRVEIK		109	
M205-A02		HC					
EVQLLES GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	TYLMAWVRQA	PGKGLEWVSG	IVSSGGRTLY	60	
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARVA	RGIAARSRTS	YFDYWGQGT	120	
VTVSSASTKG	PSVFPLAPSS	KS				142	
M205-A12		LC					
QDIQMTQSPG	TLSSLSPGERA	TLSCRTSQFV	NSNYLAWYQQ	TPGQAPRLLI	YGASSRATGI	60	
PDRFSGTGYG	TDFTLTISRL	EPEDYGTYYC	QQSSRTPWTF	GQGTRVEIK		109	

ES 2 905 545 T3

M205-A12	HC														
EVQLLES	GGG	LVQPGG	SLRL	SCAASG	FTFS	QYD	MIWVR	QA	PGK	GLEW	VS	Y	ISSSGG	FTRY	60
ADSVKGR	FTI	SRDNSK	NTRY	LQMNSL	RAED	TAVYYC	ARVA	RGIAAR	SRTS	YFDYWG	QG	TL			120
VTVSSAS	TGK	PSVFPL	APSS	KS											142
M205-B04	LC														
QDIQMTQ	SPG	TLSLSP	GERA	TLSCRTS	QFV	NSNYLAWY	QQ	TPGQAP	RLLI	YGASSR	ATGI				60
PDRFSGT	GYG	TDFTLT	ISRL	EPEDYGT	YYC	QQSSRT	PWTF	GQGTRV	EIK						109
M205-B04	HC														
EVQLLES	GGG	LVQPGG	SLRL	SCAASG	FTFS	NYD	MIWVR	QA	PGK	GLEW	VSS	Y	ISSSGG	TTKY	60
ADSVKGR	FTI	SRDNSK	NTRY	LQMNSL	RAED	TAVYYC	ARVA	RGIAAR	SRTS	YFDYWG	QG	TL			120
VTVSSAS	TGK	PSVFPL	APSS	KS											142
M205-C11	LC														
QDIQMTQ	SPG	TLSLSP	GERA	TLSCRTS	QFV	NSNYLAWY	QQ	TPGQAP	RLLI	YGASSR	ATGI				60
PDRFSGT	GYG	TDFTLT	ISRL	EPEDYGT	YYC	QQSSRT	PWTF	GQGTRV	EIK						109
M205-C11	HC														
EVQLLES	GGG	LVQPGG	SLRL	SCAASG	FTFS	QYMMMW	VVRQA	PGK	GLEW	VSR	Y	ISPSGG	STLY		60
ADSVKGR	FTI	SRDNSK	NTRY	LQMNSL	RAED	TAVYYC	ARVA	RGIAAR	SRTS	YFDYWG	QG	TL			120
VTVSSAS	TGK	PSVFPL	APSS	KS											142
M205-D04	LC														
QDIQMTQ	SPG	TLSLSP	GERA	TLSCRTS	QFV	NSNYLAWY	QQ	TPGQAP	RLLI	YGASSR	ATGI				60
PDRFSGT	GYG	TDFTLT	ISRL	EPEDYGT	YYC	QQSSRT	PWTF	GQGTRV	EIK						109
M205-D04	HC														
EVQLLES	GGG	LVQPGG	SLRL	SCAASG	FTFS	TYKMq	VVRQA	PGK	GLEW	VSS	Y	ISPSGG	PPTY		60
ADSVKGR	FTI	SRDNSK	NTRY	LQMNSL	RAED	TAVYYC	ARVA	RGIAAR	SRTS	YFDYWG	QG	TL			120
VTVSSAS	TGK	PSVFPL	APSS	KS											142
M205-E11	LC														
QDIQMTQ	SPG	TLSLSP	GERA	TLSCRTS	QFV	NSNYLAWY	QQ	TPGQAP	RLLI	YGASSR	ATGI				60
PDRFSGT	GYG	TDFTLT	ISRL	EPEDYGT	YYC	QQSSRT	PWTF	GQGTRV	EIK						109
M205-E11	HC														
EVQLLES	GGG	LVQPGG	SLRL	SCAASG	FTFS	NYTMGW	VVRQA	PGK	GLEW	VSS	Y	ISPSGG	KTDY		60
ADSVKGR	FTI	SRDNSK	NTRY	LQMNSL	RAED	TAVYYC	ARVA	RGIAAR	SRTS	YFDYWG	QG	TL			120
VTVSSAS	TGK	PSVFPL	APSS	KS											142
M205-F03	LC														
QDIQMTQ	SPG	TLSLSP	GERA	TLSCRTS	QFV	NSNYLAWY	QQ	TPGQAP	RLLI	YGASSR	ATGI				60
PDRFSGT	GYG	TDFTLT	ISRL	EPEDYGT	YYC	QQSSRT	PWTF	GQGTRV	EIK						109
M205-F03	HC														
EVQLLES	GGG	LVQPGG	SLRL	SCAASG	FTFS	SqQM	VWVRQA	PGK	GLEW	VS	Y	ISPSGG	NTRY		60
ADSVKGR	FTI	SRDNSK	NTRY	LQMNSL	RAED	TAVYYC	ARVA	RGIAAR	SRTS	YFDYWG	QG	TL			120
VTVSSAS	TGK	PSVFPL	APSS	KS											142
M205-H01	LC														
QDIQMTQ	SPG	TLSLSP	GERA	TLSCRTS	QFV	NSNYLAWY	QQ	TPGQAP	RLLI	YGASSR	ATGI				60
PDRFSGT	GYG	TDFTLT	ISRL	EPEDYGT	YYC	QQSSRT	PWTF	GQGTRV	EIK						109
M205-H01	HC														
EVQLLES	GGG	LVQPGG	SLRL	SCAASG	FTFS	NYTMQ	WVRQA	PGKGLq	WVS	Y	ISPSGG	YTG			60
ADSVKGR	FTI	SRDNSK	NTRY	LQMNSL	RAED	TAVYYC	ARVA	RGIAAR	SRTS	YFDYWG	QG	TL			120

ES 2 905 545 T3

VTVSSASTKG	PSVFPLAPSS	KS							142
M205-H08		LC							
QDIQMTQSPG	TLSLSPGERA	TLSCRTSQFV	NSNYLAWYQQ	TPGQAPRLLI	YGASSRATGI	60			
PDRFSGTGYG	TDFTLTISRL	EPEDYGTYYC	QQSSRTPWTF	GQGTRVEIK		109			
M205-H08		HC							
EVQLLESQGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	DYMMMWVRQA	PGKGLEWVSS	IVPSGGHTqY	60			
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARVA	RGIAARSRTS	YFDYWGQGTI	120			
VTVSSASTKG	PSVFPLAPSS	KS				142			
M206-A06		LC							
QDIQMTQSPG	TLSLSPGERA	TLSCRTSQFV	NSNYLAWYQQ	TPGQAPRLLI	YGASSRATGI	60			
PDRFSGTGYG	TDFTLTISRL	EPEDYGTYYC	QQSSRTPWTF	GQGTRVEIK		109			
M206-A06		HC							
EVQLLESQGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	NYMMGWVRQA	PGKGLqWVSS	ISPSGGLTKY	60			
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARVA	RGIAARSRTS	YFDYWGQGTI	120			
VTVSSASTKG	PSVFPLAPSS	KS				142			
M206-B10		LC							
QDIQMTQSPG	TLSLSPGERA	TLSCRTSQFV	NSNYLAWYQQ	TPGQAPRLLI	YGASSRATGI	60			
PDRFSGTGYG	TDFTLTISRL	EPEDYGTYYC	QQSSRTPWTF	GQGTRVEIK		109			
M206-B10		HC							
EVQLLESQGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	qYLMWVRQA	PGKGLEWVSS	IYPSGGWTKY	60			
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARVA	RGIAARSRTS	YFDYWGQGTI	120			
VTVSSASTKG	PSVFPLAPSS	KS				142			
M206-C03		LC							
QDIQMTQSPG	TLSLSPGERA	TLSCRTSQFV	NSNYLAWYQQ	TPGQAPRLLI	YGASSRATGI	60			
PDRFSGTGYG	TDFTLTISRL	EPEDYGTYYC	QQSSRTPWTF	GQGTRVEIK		109			
M206-C03		HC							
EVQLLESQGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	qYMMWVRQA	PGKGLEWVSS	IYSSGGNTPY	60			
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARVA	RGIAARSRTS	YFDYWGQGTI	120			
VTVSSASTKG	PSVFPLAPSS	KS				142			
M206-E02		LC							
QDIQMTQSPG	TLSLSPGERA	TLSCRTSQFV	NSNYLAWYQQ	TPGQAPRLLI	YGASSRATGI	60			
PDRFSGTGYG	TDFTLTISRL	EPEDYGTYYC	QQSSRTPWTF	GQGTRVEIK		109			
M206-E02		HC							
EVQLLESQGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	EYMMWVRQA	PGKGLEWVSV	ISPSGGQTHY	60			
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARVA	RGIAARSRTS	YFDYWGQGTI	120			
VTVSSASTKG	PSVFPLAPSS	KS				142			
M206-F01		LC							
QDIQMTQSPG	TLSLSPGERA	TLSCRTSQFV	NSNYLAWYQQ	TPGQAPRLLI	YGASSRATGI	60			
PDRFSGTGYG	TDFTLTISRL	EPEDYGTYYC	QQSSRTPWTF	GQGTRVEIK		109			
M206-F01		HC							
EVQLLESQGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	GYMMWVRQA	PGKGLEWVSR	ISPSGGPTIY	60			
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARVA	RGIAARSRTS	YFDYWGQGTI	120			
VTVSSASTKG	PSVFPLAPSS	KS				142			
M206-F09		LC							

ES 2 905 545 T3

QDIQMTQSPG	TLSLSPGERA	TLSCRTSQFV	NSNYLAWYQQ	TPGQAPRLLI	YGASSRATGI	60
PDRFSGTGYG	TDFTLTISRL	EPEDYGTYYC	QQSSRTPWTF	GQGTRVEIK		109
M206-F09 HC						
EVQLLES GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	VYMMSWVRQA	PGKGLEWVSS	IVPSGGSTTY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARVA	RGIAARSRTS	YFDYWGQGT	120
VTVSSASTKG	PSVFPLAPSS	KS				142
M206-H01 LC						
QDIQMTQSPG	TLSLSPGERA	TLSCRTSQFV	NSNYLAWYQQ	TPGQAPRLLI	YGASSRATGI	60
PDRFSGTGYG	TDFTLTISRL	EPEDYGTYYC	QQSSRTPWTF	GQGTRVEIK		109
M206-H01 HC						
EVQLLES GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	EYMMVWVRQA	PGKGLEWVSR	ISPSGGTTEY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARVA	RGIAARSRTS	YFDYWGQGT	120
VTVSSASTKG	PSVFPLAPSS	KS				142
M206-H04 LC						
QDIQMTQSPG	TLSLSPGERA	TLSCRTSQFV	NSNYLAWYQQ	TPGQAPRLLI	YGASSRATGI	60
PDRFSGTGYG	TDFTLTISRL	EPEDYGTYYC	QQSSRTPWTF	GQGTRVEIK		109
M206-H04 HC						
EVQLLES GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	SYMMVWVRQA	PGKGLEWVSS	ISPSGGYTIq	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARVA	RGIAARSRTS	YFDYWGQGT	120
VTVSSASTKG	PSVFPLAPSS	KS				142
M206-H05 LC						
QDIQMTQSPG	TLSLSPGERA	TLSCRTSQFV	NSNYLAWYQQ	TPGQAPRLLI	YGASSRATGI	60
PDRFSGTGYG	TDFTLTISRL	EPEDYGTYYC	QQSSRTPWTF	GQGTRVEIK		109
M206-H05 HC						
EVQLLES GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	GYKMqWVRQA	PGKGLEWVSS	ISPSGGITMY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARVA	RGIAARSRTS	YFDYWGQGT	120
VTVSSASTKG	PSVFPLAPSS	KS				142
M206-H08 LC						
QDIQMTQSPG	TLSLSPGERA	TLSCRTSQFV	NSNYLAWYQQ	TPGQAPRLLI	YGASSRATGI	60
PDRFSGTGYG	TDFTLTISRL	EPEDYGTYYC	QQSSRTPWTF	GQGTRVEIK		109
M206-H08 HC						
EVQLLES GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	DYMMAWVRQA	PGKGLEWVSS	IVPSGGHthy	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARVA	RGIAARSRTS	YFDYWGQGT	120
VTVSSASTKG	PSVFPLAPSS	KS				142
M207-A01 LC						
QDIQMTQSPG	TLSLSPGERA	TLSCRTSQFV	NSNYLAWYQQ	TPGQAPRLLI	YGASSRATGI	60
PDRFSGTGYG	TDFTLTISRL	EPEDYGTYYC	QQSSRTPWTF	GQGTRVEIK		109
M207-A01 HC						
EVQLLES GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	HYLMTWVRQA	PGKGLEWVSY	ISPSGGHTIY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARVA	RGISARSRTS	CFDYWGQGT	120
VTVSSASTKG	PSVFPLAPSS	KS				142
M207-A02 LC						
QDIQMTQSPG	TLSLSPGERA	TLSCRTSQFV	NSNYLAWYQQ	TPGQAPRLLI	YGASSRATGI	60
PDRFSGTGYG	TDFTLTISRL	EPEDYGTYYC	QQSSRTPWTF	GQGTRVEIK		109

ES 2 905 545 T3

M207-A02		HC			
EVQLLES	GGG	LVQPGG	SLRL	SCAASGFTFS	HYLMTWVRQA PGKGLEWVS
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TALYYCARVA	RGIAARSRTI	NLDYWGQGT
VTVSSASTKG	PSVFPLAPSS	KS			142
M207-A04		LC			
QDIQMTQSPG	TLSSLSPGERA	TLSCRTSQFV	NSNYLAWYQQ	TPGQAPRLLI	YGASSRATGI
PDRFSGTGYG	TDFTLTISRL	EPEDYGTYYC	QQSSRTPWTF	GQGTRVEIK	
					109
M207-A04		HC			
EVQLLES	GGG	LVQPGG	SLRL	SCAASGFTFS	HYLMTWVRQA PGKGLEWVS
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARVA	RGIAARSRTI	SFDYWGQGT
VTVSSASTKG	PSVFPLAPSS	KS			142
M207-C05		LC			
QDIQMTQSPG	TLSSLSPGERA	TLSCRTSQFV	NSNYLAWYQQ	TPGQAPRLLI	YGASSRATGI
PDRFSGTGYG	TDFTLTISRL	EPEDYGTYYC	QQSSRTPWTF	GQGTRVEIK	
					109
R0121-D02 = M0207-C05		HC			
EVQLLES	GGG	LVQPGG	SLRL	SCAASGFTFS	HYLMTWVRQA PGKGLEWVS
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARVG	RGIAARSRTS	YFDKWGQGT
VTVSSASTKG	PSVFPLAPSS	KS			142
M208-A10		LC			
QDIQMTQSPG	TLSSLSPGERA	TLSCRTSQFV	NSNYLAWYQQ	TPGQAPRLLI	YGASSRATGI
PDRFSGTGYG	TDFTLTISRL	EPEDYGTYYC	QQSSRTPWTF	GQGTRVEIK	
					109
M208-A10		HC			
EVQLLES	GGG	LVQPGG	SLRL	SCAASGFTFS	HYLMTWVRQA PGKGLEWVS
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARVA	RGIAARSRTS	qFDHWGQGT
VTVSSASTKG	PSVFPLAPSS	KS			142
M208-B01		LC			
QDIQMTQSPG	TLSSLSPGERA	TLSCRTSQFV	NSNYLAWYQQ	TPGQAPRLLI	YGASSRATGI
PDRFSGTGYG	TDFTLTISRL	EPEDYGTYYC	QQSSRTPWTF	GQGTRVEIK	
					109
M208-B01		HC			
EVQLLES	GGG	LVQPGG	SLRL	SCAASGFTFS	HYLMTWVRQA PGKGLEWVS
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARVA	RGIAARSRTS	FFDqWGQGT
VTVSSASTKG	PSVFPLAPSS	KS			142
M208-C06		LC			
QDIQMTQSPG	TLSSLSPGERA	TLSCRTSQFV	NSNYLAWYQQ	TPGQAPRLLI	YGASSRATGI
PDRFSGTGYG	TDFTLTISRL	EPEDYGTYYC	QQSSRTPWTF	GQGTRVEIK	
					109
M208-C06		HC			
EVQLLES	GGG	LVQPGG	SLRL	SCAASGFTFS	HYLMTWVRQA PGKGLEWVS
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARVA	RGIAARSRTS	FIDYWGQGT
VTVSSASTKG	PSVFPLAPSS	KS			142
M208-D12		LC			
QDIQMTQSPG	TLSSLSPGERA	TLSCRTSQFV	NSNYLAWYQQ	TPGQAPRLLI	YGASSRATGI
PDRFSGTGYG	TDFTLTISRL	EPEDYGTYYC	QQSSRTPWTF	GQGTRVEIK	
					109
M208-D12		HC			
EVQLLES	GGG	LVQPGG	SLRL	SCAASGFTFS	HYLMTWVRQA PGKGLEWVS
					60

ES 2 905 545 T3

ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARLA	RGIAARSRTS	YqDIWGQGTI	120
VTVSSASTKG	PSVFPLAPSS	KS				142
M208-E10 LC						
QDIQMTQSPG	TLSLSPGERA	TLSCRTSQFV	NSNYLAWYQQ	TPGQAPRLLI	YGASSRATGI	60
PDRFSGTGYG	TDFTLTISRL	EPEDYGTYYC	QQSSRTPWTF	GQGTRVEIK		109
M208-E10 HC						
EVQLLES GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	HYLMTWVRQA	PGKGLEWVSY	ISPSGGHTIY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARVA	QGISARSRTS	YFDYWGQGTI	120
VTVSSASTKG	PSVFPLAPSS	KS				142
M208-F04 LC						
QDIQMTQSPG	TLSLSPGERA	TLSCRTSQFV	NSNYLAWYQQ	TPGQAPRLLI	YGASSRATGI	60
PDRFSGTGYG	TDFTLTISRL	EPEDYGTYYC	QQSSRTPWTF	GQGTRVEIK		109
M208-F04 HC						
EVQLLES GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	HYLMTWVRQA	PGKGLEWVSY	ISPSGGHTIY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARVA	RGIAARSRTS	FFDYWGQGTI	120
VTVSSASTKG	PSVFPLAPSS	KS				142
M208-F10 LC						
QDIQMTQSPG	TLSLSPGERA	TLSCRTSQFV	NSNYLAWYQQ	TPGQAPRLLI	YGASSRATGI	60
PDRFSGTGYG	TDFTLTISRL	EPEDYGTYYC	QQSSRTPWTF	GQGTRVEIK		109
M208-F10 HC						
EVQLLES GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	HYLMTWVRQA	PGKGLEWVSY	ISPSGGHTIY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARVA	RGIAARSRTS	YFDqWGQGTI	120
VTVSSASTKG	PSVFPLAPSS	KS				142
M208-G02 LC						
QDIQMTQSPG	TLSLSPGERA	TLSCRTSQFV	NSNYLAWYQQ	TPGQAPRLLI	YGASSRATGI	60
PDRFSGTGYG	TDFTLTISRL	EPEDYGTYYC	QQSSRTPWTF	GQGTRVEIK		109
M208-G02 HC						
EVQLLES GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	HYLMTWVRQA	PGKGLEWVSY	ISPSGGHTIY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARVA	RGIAADRSRTS	YSDYWGQGTI	120
VTVSSASTKG	PSVFPLAPSS	KS				142
M208-G03 LC						
QDIQMTQSPG	TLSLSPGERA	TLSCRTSQFV	NSNYLAWYQQ	TPGQAPRLLI	YGASSRATGI	60
PDRFSGTGYG	TDFTLTISRL	EPEDYGTYYC	QQSSRTPWTF	GQGTRVEIK		109
M208-G03 HC						
EVQLLES GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	HYLMTWVRQA	PGKGLEWVSY	ISPSGGHTIY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARVA	RGIAARSRTS	YLDYWGQGTI	120
VTVSSASTKG	PSVFPLAPSS	KS				142
M208-H02 LC						
QDIQMTQSPG	TLSLSPGERA	TLSCRTSQFV	NSNYLAWYQQ	TPGQAPRLLI	YGASSRATGI	60
PDRFSGTGYG	TDFTLTISRL	EPEDYGTYYC	QQSSRTPWTF	GQGTRVEIK		109
M208-H02 HC						
EVQLLES GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	HYLMTWVRQA	PGKGLEWVSY	ISPSGGHTIY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARVA	RGIASRSRTR	YCDYWGQGTI	120
VTVSSASTKG	PSVFPLAPSS	KS				142

ES 2 905 545 T3

M209-B01		LC				
QDIQMTQSPG	TLSLSPGERA	TLSCRTSQFV	NSNYLAWYQQ	TPGQAPRLLI	YGASSRATGI	60
PDRFSGTGYG	TDFTLTISRL	EPEDYGTYYC	QSSRTPWTF	GQGTRVEIK		109
M209-B01		HC				
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	HYLMTWVRQA	PGKGLEWVS	ISPSGGHTIY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARVA	RGIVARSRTS	NFDqWGQGT	120
VTVSSASTKG	PSVFPLAPSS	KS				142
M209-B09		LC				
QDIQMTQSPG	TLSLSPGERA	TLSCRTSQFV	NSNYLAWYQQ	TPGQAPRLLI	YGASSRATGI	60
PDRFSGTGYG	TDFTLTISRL	EPEDYGTYYC	QSSRTPWTF	GQGTRVEIK		109
M209-B09		HC				
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	HYLMTWVRQA	PGKGLEWVS	ISPSGGHTIY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARVA	QGIVARSRTS	YLHqWGQGT	120
VTVSSASTKG	PSVFPLAPSS	KS				142
M209-B11		LC				
QDIQMTQSPG	TLSLSPGERA	TLSCRTSQFV	NSNYLAWYQQ	TPGQAPRLLI	YGASSRATGI	60
PDRFSGTGYG	TDFTLTISRL	EPEDYGTYYC	QSSRTPWTF	GQGTRVEIK		109
M209-B11		HC				
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	HYLMTWVRQA	PGKGLEWVS	ISPSGGHTIY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARVA	RGIAARSRT	YIDqWGQGT	120
VTVSSASTKG	PSVFPLAPSS	KS				142
M209-C02		LC				
QDIQMTQSPG	TLSLSPGERA	TLSCRTSQFV	NSNYLAWYQQ	TPGQAPRLLI	YGASSRATGI	60
PDRFSGTGYG	TDFTLTISRL	EPEDYGTYYC	QSSRTPWTF	GQGTRVEIK		109
M209-C02		HC				
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	HYLMTWVRQA	PGKGLEWVS	ISPSGGHTIY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARVA	RGIAARRRTS	YFDYWGQGT	120
VTVSSASTKG	PSVFPLAPSS	KS				142
M209-C11		LC				
QDIQMTQSPG	TLSLSPGERA	TLSCRTSQFV	NSNYLAWYQQ	TPGQAPRLLI	YGASSRATGI	60
PDRFSGTGYG	TDFTLTISRL	EPEDYGTYYC	QSSRTPWTF	GQGTRVEIK		109
M209-C11		HC				
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	HYLMTWVRQA	PGKGLEWVS	ISPSGGHTIY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAMVG	QGIRGRSRTS	YFAqWGQGT	120
VTVSSASTKG	PSVFPLAPSS	KS				142
M209-C12		LC				
QDIQMTQSPG	TLSLSPGERA	TLSCRTSQFV	NSNYLAWYQQ	TPGQAPRLLI	YGASSRATGI	60
PDRFSGTGYG	TDFTLTISRL	EPEDYGTYYC	QSSRTPWTF	GQGTRVEIK		109
M209-C12		HC				
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	HYLMTWVRQA	PGKGLEWVS	ISPSGGHTIY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARVG	RGIAARSRTS	qLDYWGQGT	120
VTVSSASTKG	PSVFPLAPSS	KS				142

ES 2 905 545 T3

M0209-D02	LC					
QDIQMTQSPG	TLSSLSPGERA	TLSCRTSQFV	NSNYLAWYQQ	TPGQAPRLLI	YGASSRATGI	60
PDRFSGTGYG	TDFTLTISRL	EPEDYGTYYC	QQSSRTPWTF	GQGTRVEIK		109
M209-D02	HC					
EVQLLES GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	HYLMTWVRQA	PGKGLEWVSY	ISPSGGHTIY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARVA	RGITARSRTS	YFDDWGQGTL	120
VTVSSASTKG	PSVFPLAPSS	KS				142
M209-D03	LC					
QDIQMTQSPG	TLSSLSPGERA	TLSCRTSQFV	NSNYLAWYQQ	TPGQAPRLLI	YGASSRATGI	60
PDRFSGTGYG	TDFTLTISRL	EPEDYGTYYC	QQSSRTPWTF	GQGTRVEIK		109
M209-D03	HC					
EVQLLES GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	HYLMTWVRQA	PGKGLEWVSY	ISPSGGHTIY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARVG	RGIAARSRTS	FFDqWGQGTL	120
VTVSSASTKG	PSVFPLAPSS	KS				142
M209-D12	LC					
QDIQMTQSPG	TLSSLSPGERA	TLSCRTSQFV	NSNYLAWYQQ	TPGQAPRLLI	YGASSRATGI	60
PDRFSGTGYG	TDFTLTISRL	EPEDYGTYYC	QQSSRTPWTF	GQGTRVEIK		109
M209-D12	HC					
EVQLLES GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	HYLMTWVRQA	PGKGLEWVSY	ISPSGGHTIY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCATVA	RGIAARSRTS	YFDqWGQGTL	120
VTVSSASTKG	PSVFPLAPSS	KS				142
M209-E02	LC					
QDIQMTQSPG	TLSSLSPGERA	TLSCRTSQFV	NSNYLAWYQQ	TPGQAPRLLI	YGASSRATGI	60
PDRFSGTGYG	TDFTLTISRL	EPEDYGTYYC	QQSSRTPWTF	GQGTRVEIK		109
M209-E02	HC					
EVQLLES GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	HYLMTWVRQA	PGKGLEWVSY	ISPSGGHTIY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARVA	RGIAARSRTI	LLDqWGQGTL	120
VTVSSASTKG	PSVFPLAPSS	KS				142
M209-E03	LC					
QDIQMTQSPG	TLSSLSPGERA	TLSCRTSQFV	NSNYLAWYQQ	TPGQAPRLLI	YGASSRATGI	60
PDRFSGTGYG	TDFTLTISRL	EPEDYGTYYC	QQSSRTPWTF	GQGTRVEIK		109
M209-E03	HC					
EVQLLES GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	HYLMTWVRQA	PGKGLEWVSY	ISPSGGHTIY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARqA	RGIAARSRTS	YFDYWGQGTL	120
VTVSSASTKG	PSVFPLAPSS	KS				142
M209-F04	LC					
QDIQMTQSPG	TLSSLSPGERA	TLSCRTSQFV	NSNYLAWYQQ	TPGQAPRLLI	YGASSRATGI	60
PDRFSGTGYG	TDFTLTISRL	EPEDYGTYYC	QQSSRTPWTF	GQGTRVEIK		109
M209-F04	HC					
EVQLLES GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	HYLMTWVRQA	PGKGLEWVSY	ISPSGGHTIY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARVA	RGIAARSRTS	YLDqWSQGTL	120
VTVSSASTKG	PSVFPLAPSS	KS				142
M209-G01	LC					
QDIQMTQSPG	TLSSLSPGERA	TLSCRTSQFV	NSNYLAWYQQ	TPGQAPRLLI	YGASSRATGI	60
PDRFSGTGYG	TDFTLTISRL	EPEDYGTYYC	QQSSRTPWTF	GQGTRVEIK		109

ES 2 905 545 T3

M209-G01	HC								
EVQLLES	GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	HYLMTWVRQA	PGKGLEWVS	Y	ISPSGGHTIY	60	
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARVA	qGISGRSRLS	YVDYWGQGT	L	120		
VTVSSASTKG	PSVFPLAPSS	KS						142	
M209-G07	LC								
QDIQMTQSPG	TLSSLSPGERA	TLSCRTSQFV	NSNYLAWYQQ	TPGQAPRLLI	YGASSRATGI		60		
PDRFSGTGYG	TDFTLTISRL	EPEDYGTYYC	QQSSRTPWTF	GQGTRVEIK				109	
M209-G07	HC								
EVQLLES	GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	HYLMTWVRQA	PGKGLEWVS	Y	ISPSGGHTIY	60	
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARVA	RGIAARSRTS	YFDTWGQGT	L	120		
VTVSSASTKG	PSVFPLAPSS	KS						142	
M209-H03	LC								
QDIQMTQSPG	TLSSLSPGERA	TLSCRTSQFV	NSNYLAWYQQ	TPGQAPRLLI	YGASSRATGI		60		
PDRFSGTGYG	TDFTLTISRL	EPEDYGTYYC	QQSSRTPWTF	GQGTRVEIK				109	
M209-H03	HC								
EVQLLES	GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	HYLMTWVRQA	PGKGLEWVS	Y	ISPSGGHTIY	60	
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARVA	QGIAARSRTT	qFDYWGQGT	L	120		
VTVSSASTKG	PSVFPLAPSS	KS						142	
M209-H07	LC								
QDIQMTQSPG	TLSSLSPGERA	TLSCRTSQFV	NSNYLAWYQQ	TPGQAPRLLI	YGASSRATGI		60		
PDRFSGTGYG	TDFTLTISRL	EPEDYGTYYC	QQSSRTPWTF	GQGTRVEIK				109	
M209-H07	HC								
EVQLLES	GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	HYLMTWVRQA	PGKGLEWVS	Y	ISPSGGHTIY	60	
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARVA	RGIAARqRTS	YYDYWGQGT	L	120		
VTVSSASTKG	PSVFPLAPSS	KS						142	
M209-H09	LC								
QDIQMTQSPG	TLSSLSPGERA	TLSCRTSQFV	NSNYLAWYQQ	TPGQAPRLLI	YGASSRATGI		60		
PDRFSGTGYG	TDFTLTISRL	EPEDYGTYYC	QQSSRTPWTF	GQGTRVEIK				109	
M209-H09	HC								
EVQLLES	GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	HYLMTWVRQA	PGKGLEWVS	Y	ISPSGGHTIY	60	
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARVA	RGIAARSRTV	YFDHWGQGT	L	120		
VTVSSASTKG	PSVFPLAPSS	KS						142	
M210-A06	LC								
QDIQMTQSPG	TLSSLSPGERA	TLSCRTSQFV	NSNYLAWYQQ	TPGQAPRLLI	YGASSRATGI		60		
PDRFSGTGYG	TDFTLTISRL	EPEDYGTYYC	QQSSRTPWTF	GQGTRVEIK				109	
M210-A06	HC								
EVQLLES	GGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	HYLMTWVRQA	PGKGLEWVS	Y	ISPSGGHTIY	60	
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARVA	RGIAARSRTS	qFDYWGQGT	L	120		
VTVSSASTKG	PSVFPLAPSS	KS						142	
M210-B02	LC								
QDIQMTQSPG	TLSSLSPGERA	TLSCRTSQFV	NSNYLAWYQQ	TPGQAPRLLI	YGASSRATGI		60		
PDRFSGTGYG	TDFTLTISRL	EPEDYGTYYC	QQSSRTPWTF	GQGTRVEIK				109	

ES 2 905 545 T3

M210-B02		HC				
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	HYLMTWVRQA	PGKGLEWVSY	ISPSGGHTIY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCASVA	RGIAARSRTS	YFNqWQGTL	120
VTVSSASTKG	PSVFPLAPSS	KS				142
M210-C12		LC				
QDIQMTQSPG	TLSLSPGERA	TLSCRTSQFV	NSNYLAWYQQ	TPGQAPRLLI	YGASSRATGI	60
PDRFSGTGYG	TDFTLTISRL	EPEDYGTYYC	QSSRTPWTF	GQGTRVEIK		109
M210-C12		HC				
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	HYLMTWVRQA	PGKGLEWVSY	ISPSGGHTIY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARVA	QGIAARSRTS	SVDqWQGTL	120
VTVSSASTKG	PSVFPLAPSS	KS				142
M210-G04		LC				
QDIQMTQSPG	TLSLSPGERA	TLSCRTSQFV	NSNYLAWYQQ	TPGQAPRLLI	YGASSRATGI	60
PDRFSGTGYG	TDFTLTISRL	EPEDYGTYYC	QSSRTPWTF	GQGTRVEIK		109
M210-G04		HC				
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	HYLMTWVRQA	PGKGLEWVSY	ISPSGGHTIY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARVA	TGIVARSRTR	YFDqWQGTL	120
VTVSSASTKG	PSVFPLAPSS	KS				142
M210-G10		LC				
QDIQMTQSPG	TLSLSPGERA	TLSCRTSQFV	NSNYLAWYQQ	TPGQAPRLLI	YGASSRATGI	60
PDRFSGTGYG	TDFTLTISRL	EPEDYGTYYC	QSSRTPWTF	GQGTRVEIK		109
M210-G10		HC				
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	HYLMTWVRQA	PGKGLEWVSY	ISPSGGHTIY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARVA	RGIAARSRTS	YLDFWQGTL	120
VTVSSASTKG	PSVFPLAPSS	KS				142
M210-H01		LC				
QDIQMTQSPG	TLSLSPGERA	TLSCRTSQFV	NSNYLAWYQQ	TPGQAPRLLI	YGASSRATGI	60
PDRFSGTGYG	TDFTLTISRL	EPEDYGTYYC	QSSRTPWTF	GQGTRVEIK		109
M210-H01		HC				
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	HYLMTWVRQA	PGKGLEWVSY	ISPSGGHTIY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARVA	RGIAARSRNS	qQDYWQGTL	120
VTVSSASTKG	PSVFPLAPSS	KS				142
M210-H06		LC				
QDIQMTQSPG	TLSLSPGERA	TLSCRTSQFV	NSNYLAWYQQ	TPGQAPRLLI	YGASSRATGI	60
PDRFSGTGYG	TDFTLTISRL	EPEDYGTYYC	QSSRTPWTF	GQGTRVEIK		109
M210-H06		HC				
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	HYLMTWVRQA	PGKGLEWVSY	ISPSGGHTIY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARVA	RGIAARSRTR	YFDYWQGTL	120
VTVSSASTKG	PSVFPLAPSS	KS				142
M210-H07		LC				
QDIQMTQSPG	TLSLSPGERA	TLSCRTSQFV	NSNYLAWYQQ	TPGQAPRLLI	YGASSRATGI	60
PDRFSGTGYG	TDFTLTISRL	EPEDYGTYYC	QSSRTPWTF	GQGTRVEIK		109
M210-H07		HC				
EVQLLESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	HYLMTWVRQA	PGKGLEWVSY	ISPSGGHTIY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARVA	RGIAARSRTR	YFDqWQGTL	120
VTVSSASTKG	PSVFPLAPSS	KS				142

EJEMPLO 6: Prueba *in vivo* de M162-A04 (IgG) y X101-A01

Se han implicado previamente bradiquinina y otras cininas bioactivas en edema inducido por carragenina y dolor inflamatorio (Sharma J.N. et al. (1998) *Inflammopharmacology* 6, 9-17; Asano M. et al. (1997) *Br J Pharmacol* 122, 1436-1440; De Campos R.O. et al. (1996) *Eur J Pharmacol* 316, 277-286). La caliceína plasmática y la caliceína 1 de tejido son las dos cininogenasas primarias en mamíferos (Schmaier A.H. (2008) *Int Immunopharmacol* 8, 161-165). Se probó M162-A04 (M162-A4) (IgG), un inhibidor específico de caliceína plasmática, para determinar si sería eficaz en el edema inducido por carragenina. El diseño del estudio se expone brevemente en la **Tabla 10**. La vía de administración (ROA) para el vehículo (PBS), el anticuerpo y el control positivo (indometacina) era intraperitoneal (IP) y se administró 30 minutos antes de la inyección de carragenina (0.1ml de una disolución al 2 % de

carragenina). Es evidente de la **FIGURA 2** que las dosis de anticuerpo a 10 mg/kg y superiores fueron igualmente de eficaces en reducir el edema inducido por carragenina que el control positivo (indometacina). Sin embargo, el anticuerpo no fue eficaz en reducir la hiperalgesia térmica inducida por carragenina (**FIGURA 3**). El motivo para la disociación entre la eficacia en el edema y la hiperalgesia no son obvios, pero puede ser debido a diferencias en la bioactividad de diferentes metabolitos de cinina. Lys-desArg9-bradiquinina es el agonista más potente del receptor de B1, que se cree que está principalmente implicado en la hipersensibilidad al dolor (Leeb-Lundberg L.M et al. (2005) Pharmacol Rev 57, 27-77). Este metabolito de cinina se genera por la calicreína 1 de tejido, no la calicreína plasmática (Schmaier A.H. (2008) Int Immunopharmacol 8,161-165). Esta diferencia en la generación de cinina y la activación del receptor de bradiquinina resultante puede explicar el inesperado desacoplamiento de edema e hiperalgesia en este modelo.

También se probó otro inhibidor del anticuerpo pCal X101-A01 en el modelo de CPE usando el diseño del estudio mostrado en la Tabla 10B. Los datos obtenidos en la Figura 14 muestran que X101-A01 inhibió el edema de un modo dependiente de la dosis hasta un grado que es comparable al del control positivo (indometacina).

Tabla 10A. Diseño de edema en la pata inducido por carragenina del estudio para probar M162-A04

Grupo Nº	Número de ratas	Tratamiento	Dosis (mg/kg)	ROA	Cronometraje con respecto a carragenina	Volumen de dosis (ml/kg)
1	6	Vehículo	N/A	IP	T -30 minutos	20
2	6	559A-M162-A4	3	IP	T -30 minutos	20
3	6	559A-M162-A4	10	IP	T -30 minutos	20
4	6	559A-M162-A4	30	IP	T -30 minutos	20
5	6	Indometacina	5	IP	T -30 minutos	20

Tabla 10B. Diseño de edema en la pata inducido por carragenina del estudio para probar X101-

Grupo	Tratamiento	n	Dosis (mg/Kg)	ROA	Cronometraje*	Vol (ml/kg)
1	Vehículo	10	N/A	IP	-30 min	20
2	X101-A01	10	1	IP	-30 min	20
3	X101-A01	10	3	IP	-30 min	20
4	X101-A01	10	10	IP	-30 min	20
5	X101-A01	10	30	IP	-30 min	20
6	Indometacina	10	5	IP	-30 min	20

EJEMPLO 7: Evaluación de inhibidores de anticuerpos seleccionados de calicreína plasmática

La evaluación de anticuerpos optimizados seleccionados (X81-B01 y X67-D03) se muestra en la **Tabla 11**. Ningún anticuerpo tiene posible desamidación, isomerización o supuestos sitios de oxidación.

Tabla 11

Criterios	X81-B01 (IgG)	X67-D03 (IgG)
< nM Ki,ap contra pCal humana	0,2 nM	0,1 nM
< nM Ki,ap contra pCal de roedor	ratón - 11 pM rata - 0,14 nM	ratón - 0,7 nM rata - 0,34 nM
union a precalicreína	no	no
Inhibidor específico con respecto a fXla, plasmina y tripsina	Sí	Sí

(continuación)

Criterios	X81-B01 (IgG)	X67-D03 (IgG)
Inhibe la generación de bradiquinina	Sí	Sí
Inhibe pCal en presencia de precalicreína	Sí	Sí
Competición por la unión con aprotinina	Sí	Sí
Estabilidad en suero humano	Sí	nd*
* no hecho; se mostró que una forma parental de este anticuerpo era estable en suero		

EJEMPLO 8: Mapeo de epítopes

Se investigó la región de pCal unida por anticuerpos anti-pCal seleccionados usando varios métodos. En primer lugar, se usaron ensayos de competición para determinar si los anticuerpos compitieron para unirse a pCal con inhibidores dirigidos al sitio activo conocidos. En segundo lugar, los anticuerpos se agruparon según si eran inhibidores o solo agentes de unión a pCal. En tercer lugar, se investigaron epítopes usando péptidos sintéticos y estructuras peptídicas basadas en la secuencia y estructura tridimensional de pCal. Estas estructuras peptídicas se denominan "CLIPS" (péptidos químicamente unidos en armazones) y la prueba se realizó por una empresa de servicios por honorario llamada Pepscan.

En cuarto lugar, se probaron anticuerpos para su capacidad para inhibir pCal de otras especies, además de la humana, donde se ha determinado la secuencia de aminoácidos de pCal con el fin de identificar aminoácidos que pueden explicar las diferencias en inhibición.

Ensayos de competición

Usando un ensayo BIACORE® SPR, se probaron los anticuerpos de interés para la competición con un inhibidor de sitio activo conocido de pCal. EPI-KAL2 es un potente inhibidor de sitios activos ($K_{i,ap} = 0,1$ nM) de pCal y un inhibidor de dominios de Kunitz basado en el primer dominio del inhibidor de la vía de factor tisular (Markland (1996) *Iterative optimization of high-affinity protease inhibitors using phage display*. 2. Plasma kallikrein and thrombin. Biochemistry. 35(24):8058-67). Los dominios de Kunitz son inhibidores de sitios activos conocidos de serina proteasas, tales como pCal.

La secuencia de EPI-KAL2 es:

EAMHSFCAFKADDGPCRAAHPRWFFNIFTRQCEEFSYGGCGGNQNRFESL
EECKKMCTRD

(los aminoácidos en cursiva son los que se diferencian de TFPI)

Como se muestra en las **FIGURAS 8A-8B**, los anticuerpos X81-B01 y X67-D03 compitieron para unirse a pCal en presencia o EPI-KAL2. Este resultado indica que estos anticuerpos o bien se unen en la proximidad del sitio activo o cambios alostéricos en la conformación del complejo pCal-EPI-KAL2 previenen la unión del anticuerpo.

Agentes de unión de anticuerpos frente a inhibidores

Como se muestra en las **Tablas 1 y 2**, todos los anticuerpos únicos descubiertos por la presentación en fagos se caracterizaron como o bien inhibidores de pCal o agentes de unión, pero no inhibidores. Los anticuerpos que inhiben la actividad de pCal o bien se unen cerca del sitio activo e impiden las interacciones de sustratos (inhibidores competitivos), o bien se unen lejos del sitio activo e inducen cambios alostéricos en la estructura del sitio activo (inhibidores no competitivos). Es poco probable que los anticuerpos que se unen, pero no inhiben pCal, se unan cerca del sitio activo y puedan unirse al dominio no catalítico (es decir, el dominio de manzana). La **Tabla 12** clasifica anticuerpos seleccionados como o bien inhibidores o agentes de unión de pCal. También se muestra en la **Tabla 12** para los anticuerpos enumerados, es una demostración de si reaccionan o no de forma cruzada con pCal de ratón como inhibidores y si se unen o no a precalicreína.

Tabla 12. Propiedades de unión de anticuerpos anti-pCal seleccionados

Número	Anticuerpo	Categoría de unión	Ki,ap humana (nM)	Ki,ap de ratón (nM)	Péptido(s) identificados CLIPS
1	M6-A06	1) Agente de unión solo	no	no	C4

(continuación)

Número	Anticuerpo	Categoría de unión	Ki,ap humana (nM)	Ki,ap de ratón (nM)	Péptido(s) identificados CLIPS
2	M6-D09	2) inhibidor, agente de unión de precalicreína, inhibe pCal de ratón y humana	5,9	3,9	C1,C5
3	M8-C04	1) Agente de unión solo	no	no	
4	M8-G09	1) Agente de unión solo	no	no	C1, C4, C6, C7
5	M29-D09	3) inhibidor, no se une a precalicreína, no inhibe la pCal de ratón	0,7	no	C1, C4, C7
6	M35-G04	2) inhibidor, agente de unión de precalicreína, inhibe pCal de ratón y humana	2,9	8	C1, C4
7	M145-D11	3) inhibidor, no se une a precalicreína, inhibidor débil de ratón pCal	0,79	800	C1, C4
8	M160-G12	4) inhibidor de tanto pCal de ratón como humana, no se une a precalicreína	5	0,2	C2
9	X55-F01	4) inhibidor de tanto pCal de ratón como humana, no se une a precalicreína	0,4	2	C2, C3
10	X73-H09	4) inhibidor, no se une a precalicreína, inhibidor débil de pCal humana y de ratón	20	70	C6
11	X81-B01	4) inhibidor de tanto pCal de ratón como humana, no se une a precalicreína	0,1	0,011	C2, C3, C5, C6
12	A2	5) Control negativo, no se une a pCal, se une a estreptavidina	No se une	No se une	No se une

C1-C7: péptidos en pCal identificados por el mapeo de epítopes de CLIPS (véanse las **FIGURAS 9 y 10A-10C**). C1 corresponde a las posiciones 55-67 del dominio catalítico, C2 a las posiciones 81-94, C3 a las posiciones 101-108, C4 a las posiciones 137-151, C5 a las posiciones 162-178, C6 a las posiciones 186-197 y C7 a las posiciones 214-217.

Mapeo de epítopes usando CLIPS

Se probaron los 11 anticuerpos anti-pCal enumerados en la Tabla 12, más un control negativo (A2) para la unión a 5000 CLIPS (péptidos químicamente unidos sobre armazones) sintéticos diferentes por Pepscan como se describe más adelante en las secciones MÉTODOS DE CLIP. Este análisis condujo a la identificación de regiones de péptido en pCal que es probable que sean una parte del epítipo de anticuerpo para cada uno de los anticuerpos probados (**FIGURA 9**).

MÉTODOS DE CLIPS

Se sintetizaron péptidos lineales y CLIPS basándose en la secuencia de aminoácidos de la proteína diana usando química estándar de Fmoc y se desprotegeron usando ácido trifluórico como eliminadores. Los péptidos restringidos se sintetizaron sobre armazones químicos con el fin de la reconstrucción de epítopes conformacionales, usando tecnología de péptidos químicamente unidos sobre armazones (CLIPS) (Timmerman et al. (2007). Por ejemplo, se sintetizaron los péptidos de un solo bucle que contenían una dicisteína, que se cicló tratando con alfa, alfa'-dibromoxileno y se varió el tamaño del bucle introduciendo restos de cisteína a separación variable. Si estaban presentes otras cisteínas aparte de las cisteínas recién introducidas, se sustituyeron por alanina. Las cadenas laterales de las múltiples cisteínas en los péptidos se acoplaron a moldes de CLIPS reaccionando sobre tarjetas de PEPSCAN de polipropileno con formato de tarjeta de crédito (455 formatos de péptido/tarjeta) con una disolución 0,5 mM de molde de CLIPS tal como 1,3-bis(bromometil)benzoceno en bicarbonato de amonio (20 mM, pH 7,9)/acetonitrilo (1:1(v/v)). Las tarjetas se agitaron suavemente en la disolución durante 30 a 60 minutos mientras que se cubrieron completamente en disolución. Finalmente, las tarjetas se lavaron ampliamente con exceso de H₂O

- y se sonicaron en tampón de rotura que contenía 1 por ciento de SDS/0,1 por ciento de beta-mercaptoetanol en PBS (pH 7,2) a 70 °C durante 30 minutos, seguido por sonicación en H₂O durante otros 45 minutos. Se probó la unión de anticuerpo a cada péptido en un ELISA basado en PEPSCAN. Las tarjetas de polipropileno de formato de tarjeta de crédito de 455 pocillos que contenían los péptidos covalentemente unidos se incubaron con disolución de anticuerpo primario, por ejemplo, que consistía en 1 microgramo/ml diluida en disolución de bloqueo llamada SQ (4 % de suero de caballo, 5 % de ovoalbúmina (p/v) en PBS/1 % de Tween o diluida en PBS por ejemplo, 20 % de SQ) durante la noche. Después de lavar, los péptidos se incubaron con una dilución 1/1000 de peroxidasa de conejo anti-anticuerpo humano o peroxidasa de cabra-anti-Fab humano durante una hora a 25 °C. Después de lavar, se añadieron el sustrato de peroxidasa sulfonato de 2,2'-azino-di-3-etilbenzotiazolina (ABTS) y 2 microlitros de 3 por ciento de H₂O₂. Después de una hora, se midió el desarrollo de color. El desarrollo de color se cuantificó con una cámara con dispositivo de carga acoplada (CCD) y un sistema de procesamiento de imágenes (como se describió en primer lugar en Sloodstra et al., 1996).

Cálculo de datos

Datos sin procesar: Densidad óptica (unidades arbitrarias de DO)

- Los datos sin procesar son valores ópticos obtenidos por una cámara de CCD. Los valores varían principalmente desde 0 hasta 3000, una escala logarítmica similar a 1 a 3 de un lector de ELISA estándar de placas de 96 pocillos. Primero, la cámara de CCD hace una foto de la tarjeta antes de la coloración de la peroxidasa y luego otra vez una foto después de la coloración de peroxidasa. Estas dos fotos se restan entre sí dando como resultado los datos que se denominan datos sin procesar. Estos se copian en la base de datos Peplab[™]. Entonces se copian los valores en excel y este archivo se marca como archivo de datos sin procesar. Se permite una manipulación de seguimiento. Algunas veces un pocillo contiene una burbuja de aire dando como resultado un valor positivo falso, las tarjetas se inspeccionan manualmente y cualquier valor causado por una burbuja de aire se puntúa como 0.

- Normalmente, los ensayos no se hacen por duplicado (solo tras petición del cliente). Las pruebas por duplicado son normalmente muy similares. Además, el conjunto de datos de miles de péptidos contiene muchos péptidos que son similares, así los resultados nunca se basan en el reconocimiento de un péptido, sino en familias de péptidos similares. Si uno o algunos péptidos no se unen, o presentan unión más baja, en un experimento duplicado, normalmente no se atribuye a una mapeo de epítopes diferente.

Timmerman et al. (2007). Functional reconstruction and synthetic mimicry of a conformational epitope using CLIPS[™] technology. J. Mol. Recognit. 20:283-99

- Sloodstra et al. (1996). Structural aspects of antibody-antigen interaction revealed through small random peptide libraries, Molecular Diversity, 1, 87-96.

EJEMPLO 9: Análisis de secuencias de pCal de diferentes especies

- Toda las secuencias disponibles de pCal se obtuvieron de bases de datos públicas y se alinearon usando ClustalW y las regiones se resaltaron basándose en la accesibilidad del disolvente, el contacto con un inhibidor de Kunitz de sitio activo y los péptidos identificados por análisis de CLIPS (**FIGURAS 10A-10C**). Se obtuvo plasma citrado de cada una de estas especies y se activó usando un activador de precalicreína comercialmente disponible (de Enzyme Research Laboratories) según las instrucciones del fabricante. Entonces se midió la actividad de la calicreína en cada una de las muestras en presencia o ausencia de X81-B01.

- Se encontró que X81-B01 inhibió pCal de todas las especies, excepto pCal de cerdo. Puesto que el análisis de CLIPS identifica cuatro péptidos de pCal a los que se une X81-B01 - C2 (posiciones 81-94), C3 (posiciones 101-108), C5 (posiciones 162-178) y C6 (posiciones 186-197) - se examinaron las diferencias en la secuencia de pCal de cerdo que corresponden a estos péptidos para identificar posibles cambios de aminoácidos que explican la falta de inhibición de pCal de cerdo por X81-B01. Los péptidos C2 y C3 están próximos en la secuencia y ambos son altamente similares en secuencia entre las diferentes especies. Sin embargo, existe una diferencia en la posición 479. Todas las especies, excepto cerdo, rana y perro, tienen una serina en la posición 479. La secuencia de pCal de rana y perro tiene una alanina y una treonina en la posición 479, respectivamente; ambas de las cuales se consideran sustituciones conservativas para una serina. A diferencia, la secuencia de pCal de cerdo tiene una leucina en la posición 479, que es una sustitución considerablemente menos conservativa para una serina. El péptido C5 en pCal de cerdo es altamente similar a las secuencias de las otras especies. Sin embargo, en la posición 563, solo en la pCal de cerdo está presente una histidina (negrita en la **FIGURA 10C**). Esta posición en todas las otras especies, excepto rana, es una tirosina. En la pCal de rana, que se inhibe por X81-B01, esta posición es una treonina. El péptido C6 en pCal de cerdo es otra vez altamente similar a las otras secuencias. Sin embargo, solo en la secuencia de pCal de cerdo es la posición 585 un glutamato (en negrita en la **FIGURA 10C**). En todas las otras especies, esta posición es un aspartato. Este análisis puede indicar restos posiblemente críticos en pCal que interaccionan con X81-B01.

EJEMPLO 10: Ensayos *in vitro* e *in vivo* para evaluar la eficacia de una proteína de unión a calicreína plasmática.

Unión a precalicreína frente a calicreína: Se puede demostrar experimentalmente la ventaja de un anticuerpo inhibidor de pCal que no se une a precalicreína con respecto a un anticuerpo que se une a precalicreína. Por ejemplo, se puede diseñar un experimento *in vitro* para comparar la potencia de un inhibidor de anticuerpo contra pCal que no se une a precalicreína (por ejemplo, DX-2922) con uno que se une a precalicreína (por ejemplo, M6-D09) usando el ensayo del tiempo de coagulación de plasma tiempo de tromboplastina parcial activado (APTT). El ensayo de APTT induce la coagulación en plasma mediante la adición de un reactivo que activa específicamente el componente del sistema de contacto de la vía de coagulación intrínseca, de la que participa la actividad de pCal. Se conoce bien en la bibliografía que la inhibición de pCal o que una deficiencia genética en pCal conduce a aPTT prolongada (véase, por ejemplo, Morishita, H., et al., Thromb Res, 1994. **73**(3-4): p. 193-204; Wynne Jones, D., et al., Br J Haematol, 2004. **127**(2): p. 220-3). Se puede realizar un experimento *in vitro* para medir el efecto de enriquecer plasma humano citrado con diferentes concentraciones de cualquiera de M6-D09 o DX-2922 sobre los tiempos de coagulación observados inducidos usando reactivos de APTT comercialmente disponibles y un analizador de la coagulación (Tabla 13). Se espera que la CE50 observada para la prolongación de APTT de M6-D09 sea significativamente superior a la de DX-2922 debido a la unión de M6-D09 a la precalicreína de alta concentración (~500 nM) en la muestra de plasma normal. La eficacia del anticuerpo inhibidor de pCal como se demuestra por el prolongado APTT soporta el posible uso terapéutico del anticuerpo en el tratamiento o la prevención de enfermedad cardiovascular asociada a la aberrante formación de coágulos, tal como se puede observar en aterosclerosis, accidente cerebrovascular, vasculitis, aneurisma y pacientes implantados con dispositivos de asistencia ventricular.

Tabla 13: Diseño del estudio para medir el efecto de inhibidores de anticuerpos de pCal sobre APTT

Condición	Efecto observado sobre APTT
Sin tratamiento, solo plasma	Normal
Control de plasma agotado en precalicreína (comercialmente disponible)	Prolongación máxima
M6-D09 a baja concentración	Normal
M6-D09 a media concentración	Normal
M6-D09 a alta concentración	APTT prolongado
DX-2922 a baja concentración	APTT prolongado
DX-2922 a media concentración	APTT prolongado
DX-2922 a alta concentración	Prolongación máxima

Eficacia en un modelo de rata de edema: También se puede realizar un experimento *in vivo* para demostrar el aumento de potencia de un anticuerpo inhibidor de pCal que no se une a precalicreína. El modelo de edema en la pata inducido por carragenina (CPE) de edema en ratas es un modelo de farmacología común. Se tratará un grupo de ratas con dosis crecientes de M6-D09 y DX-2922 por inyección intraperitoneal (IP) antes de inyectar carragenina (por ejemplo 0,1 ml de una disolución al 10 % p/v) en las patas de las ratas (Tabla 14). Se espera que DX-2922 sea más eficaz en reducir la inflamación de la pata observada que M6-D09. La eficacia del anticuerpo respalda el uso terapéutico del anticuerpo en diversas enfermedades inflamatorias que están asociadas con cualquier inflamación (por ejemplo, angioedema hereditario, edema inducido por accidente cerebrovascular, edema cerebral) o inflamación mediada por bradiquinina y dolor (por ejemplo, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria del intestino).

Tabla 14: Diseño del estudio para observar el efecto de inhibidores de anticuerpos sobre CPE

Grupo	Tratamiento	Dosis de ejemplo (mg/kg)	Efecto esperado
1	Vehículo	N/A	Máxima inflamación
2	Indometacina (control positivo)	5	Máxima reducción de la inflamación
3	M6-D09	1	Sin efecto sobre la inflamación
4	M6-D09	3	Sin efecto sobre la inflamación
5	M6-D09	10	Reducción intermedia de la inflamación
6	DX-2922	1	Sin efecto sobre la inflamación

(continuación)

Grupo	Tratamiento	Dosis de ejemplo (mg/kg)	Efecto esperado
7	DX-2922	3	Reducción intermedia de la inflamación
8	DX-2922	10	Máxima reducción de la inflamación

Medición de la semivida: Se determinarán las propiedades farmacocinéticas de DX-2922 en ratas y monos cinomolgos en un diseño del estudio brevemente expuesto en la Tabla 15. El suero se recogerá en los momentos indicados tras la inyección IV de DX-2922. Se determinará la concentración de DX-2922 por ELISA y se representará frente al tiempo con el fin de obtener parámetros farmacocinéticos (eliminación, semivida, volumen de distribución, etc.). Se espera que DX-2922 tenga una semivida superior a 5 días en monos cinomolgos que aumentará a una semivida superior a 7 días en seres humanos.

Tabla 15: Un estudio farmacocinético de inhibidor de calicreína plasmática pCal administrado por las vías intravenosa y subcutánea a monos cinomolgos.

Grupo	Tratamiento	Nivel de dosificación (mg/kg/día)	Vía	Número de animales (sexo)	Recogida de suero
1	pKAL	20	IV	4 (M)	Pre-dosis 0,08, 0,25, 0,5, 1, 4, 24 horas Día 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14
2	pKAL	20	IV	4 (M)	Pre-dosis 0,08, 0,25, 0,5, 1, 4, 24 horas Día 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14

EJEMPLO 11: Mapeo de epítomos usando mutaciones de aminoácidos de pCal

Basándose en los estudios de mapeo de epítomos descritos en el presente documento en el Ejemplo 8, los presentes inventores inspeccionaron el modelo tridimensional publicado en la base de datos de proteínas RCSB (disponible en internet en rcsb.org; pdb code 2ANY) y se identificó una colección de conjuntos aminoácidos en bucles accesibles a la superficie cerca del sitio activo enzimático que los presentes inventores razonaron que podrían interactuar con la unión del anticuerpo dando como resultado la inhibición enzimática. Estos aminoácidos se sustituyeron por alanina y el dominio catalítico de cada uno de los mutantes se expresó en *Pichia pastoris* con una fusión de marca His y se purificó por IMAC. Se sintetizaron cuatro mutantes de pCal mutantes diferentes y se probaron:

Mutante 1: Se mutaron los aminoácidos S478, N481, S525 y K526 de la secuencia de calicreína humana (Nº de acceso NP_00883.2) a alanina. Se determinó que estos aminoácidos estaban implicados en el reconocimiento de sustrato (subsitio S3).

Mutante 2: Se mutaron los restos de aminoácidos R551, Q553, Y555, T558 y R560 de la secuencia de calicreína humana (Nº de acceso NP_00883.2) a alanina. Se determinó que estos restos participaban en el reconocimiento de sustrato de sitio activo (subsitio S1').

Mutante 3: Se mutaron los aminoácidos D572, K575 y D577 de la secuencia de calicreína humana (Nº de acceso NP_00883.2) a alanina. Estos restos de aminoácidos participan en el reconocimiento de sustrato (subsitio S1')

Mutante 4: Se mutaron los aminoácidos N395, S397 y S398 de la secuencia de calicreína humana (Nº de acceso NP_00883.2) a alanina. Estos restos están distales del sitio activo de calicreína plasmática.

Tres de los 4 mutantes (Mutante 1, 2 y 4) tienen actividad similar a la del dominio catalítico no mutante de pCal. Las sustituciones de aminoácidos en el Mutante 3 dieron una proteína inactiva que no fue reconocida en los ensayos de unión SPR (Biacore) por ninguno de los anticuerpos anti-pCal probados.

Los anticuerpos probados para la inhibición de los mutantes 1, 2 y 4 se muestran en el presente documento en la Tabla 16. Basándose en los valores de $K_{i,ap}$ medidos para los anticuerpos en el Grupo 1 (es decir, los anticuerpos que inhiben pCal humana y de ratón, pero no se unen a precalicreína), es evidente que este grupo de anticuerpos se

une al epítipo en pCal que contiene los aminoácidos que se mutaron en el Mutante 2, pero no dependían de restos mutados en los Mutantes 1 o 4. Además, la interacción de proteínas de unión a calicreína plasmática X81-B01/X101-A01/DX-2922 y el derivado madurado por afinidad X115-B07 con calicreína se afecta adversamente por las sustituciones en el Mutante 1. Para un ejemplo de las diferencias en la capacidad de los anticuerpos para unirse a precalicreína, véanse, por ejemplo, la Figura 11^a y 11B, que compara para precalicreína la unión de DX-2922 (Grupo 1) con la de M6-D09 (Grupo 3).

Los anticuerpos en el Grupo 2 (es decir, los que inhiben pCal humana, no pCal de ratón y no se unen a precalicreína) no estuvieron significativamente afectados por los aminoácidos mutados, que indica que hacen contacto con aminoácidos alternativos. Es probable que los anticuerpos del Grupo 2 se unan cerca del sitio activo, ya que fueron incapaces de unirse a pCal complejo con un dominio de Kunitz (EPI-KAL2), que se sabe que se unen en el sitio activo de una serina proteasa. Además, uno de los anticuerpos en el Grupo 2 (M145-D11) es similar a aquellos en el Grupo 1 por que es incapaz de unir pCal en un ensayo de Biacore que se inactiva con el inhibidor suicida AEBSF (clorhidrato de fluoruro de 4-(2-aminoetil)bencenosulfonilo), que es una inhibidor covalente de molécula pequeña de serina proteasas de tipo tripsina (Figura 12). Sin embargo, el otro anticuerpo (M29-D09) asignado al Grupo 2 fue capaz de unirse a pCal inactivada con AEBSF, que indica que se puede unir a un epítipo diferente de M145-D11 a pesar de compartir propiedades de unión similares.

Los anticuerpos en el Grupo 3 inhibieron pCal humana y de ratón, pero se unieron a precalicreína. Uno de estos anticuerpos, M6-D09, fue incapaz de unirse a pCal inactivada por EPI-KAL2 o AEBSF, que indica que este grupo de inhibidores de pCal interacciona con aminoácidos alternativos cerca del sitio activo. La $K_{i,ap}$ para M6-D09 aumentó aproximadamente 5 veces hacia el Mutante 2 (es decir, disminuyó la potencia de M6-D09).

EJEMPLO 12: Maduración por afinidad

Además de la maduración por afinidad descrita en el presente documento en los Ejemplos 4 y 5, que implicó la optimización de la cadena ligera, los presentes inventores intentaron optimizar además la afinidad con bibliotecas que varían los aminoácidos en las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada variable de dos anticuerpos anti-pCal parentales diferentes. Ambos de los anticuerpos seleccionados para la optimización adicional (X63-G06 y M162-A04) presentan propiedades deseables para el desarrollo adicional como inhibidor de anticuerpo terapéutico de calicreína plasmática; incluyendo las propiedades: a) inhibición completa de calicreína plasmática humana y de roedor y b) ninguna unión a precalicreína. En algunas realizaciones, la inhibición completa de pCal humana es esencial para bloquear la actividad de calicreína plasmática en los usos de enfermedad. La inhibición de pCal de roedor facilita el desarrollo preclínico que incluye evaluación de la toxicidad. La falta de unión a precalicreína es una propiedad altamente deseable para un anticuerpo inhibidor de pCal para maximizar la biodisponibilidad del anticuerpo terapéutico hacia la diana de pCal activa y para reducir posiblemente la dosis requerida para la eficacia.

Se realizó maduración por afinidad usando 4 bibliotecas de presentación en fagos diferentes. Para cada anticuerpo parental (por ejemplo, M62-A04), se construyó una biblioteca que contenía posiciones de aminoácidos variadas en tanto CDR1 como CDR2 de la cadena pesada. Se construyó una biblioteca adicional para cada uno de los dos anticuerpos parentales en los que se variaron las posiciones en la CDR3 de la cadena pesada. Cada una de estas 4 bibliotecas de presentación en fagos se seleccionó (inmunopurificó) con cantidades decrecientes de pCal activa en cada ronda posterior con el fin de obtener anticuerpos de alta afinidad. Para minimizar la aparición de unión a precalicreína en el anticuerpo seleccionado, se agotaron inicialmente las bibliotecas de salida en precalicreína inmovilizada. Después de cribar como fragmentos Fab, los presentes inventores descubrieron los anticuerpos madurados por afinidad mostrados en la Tabla 16 (es decir, los anticuerpos con el número de identificación que empieza con "X115").

Se encontró que cuatro anticuerpos descubiertos (X115-B07, X115-D05, X115-E09 y X115-H06) que derivan del anticuerpo parental DX-2922 (también conocido como X63-G06 como un fragmento Fab, X81-B01 como una IgG producida en células 293T, o X101-A01 como una IgG producida en células CHO) eran potentes inhibidores de pCal. Para la comparación, se muestra la secuencia de aminoácidos de DX-2922. Es evidente que tres de los anticuerpos madurados por afinidad (X115-B07, X115-E09 y X115-H06) contienen mutaciones en Hv-CDR3; mientras que X115-D05 tiene Hv-CDR1/CDR2 diferente. Cuatro otros anticuerpos descubiertos (X115-F02, X115-A03, X115-D01 y X115-G04) derivan del anticuerpo parental M162-A04. Los 8 anticuerpos madurados por afinidad no se unen a precalicreína.

Tabla 16: Resumen de las constantes de inhibición de anticuerpos anti-pCal madurados por afinidad (K_{i,ap}) en el dominio catalítico de pCal no mutante y los Mutantes 1, 2 y 4^a

Aislado (nM)	K _{i,ap} de dominio cat. WT (nM)	K _{i,ap} de Mutante 1 (nM)	K _{i,ap} de Mutante 2 (nM)	K _{i,ap} de Mutante 4 (nM)	Compite con AEBSF	Compite por epi-kal2	Características
DX-2922	0,22	14	20	0,25	sí	sí	inhibe pCal humana y de ratón; no se une a precalicreína
559A-X115-B07 (mad por af; X101-A01 parental)	0,13	4,7	47	0,14	sí	nd	inhibe pCal humana y de ratón; no se une a precalicreína
559A-X115-D05 (mad por af; X101-A01 parental)	nd	nd	nd	nd	sí	nd	inhibe pCal humana y de ratón; no se une a precalicreína
559A-X115-E09 (mad por af; X101-A01 parental)	nd	nd	nd	nd	sí	nd	inhibe pCal humana y de ratón; no se une a precalicreína
559A-X115-H06 (mad por af; X101-A01 parental)	nd	nd	nd	nd	sí	nd	inhibe pCal humana y de ratón; no se une a precalicreína
559A-X115-A03 (mad por af; M162-A04 parental)	0,16	0,23	3,7	0,13	sí	nd	inhibe pCal humana y de ratón; no se une a precalicreína
559A-X115-D01 (mad por af; M162-A04 parental)	0,18	0,26	2,5	0,12	sí	nd	inhibe pCal humana y de ratón; no se une a precalicreína
559A-X115-F02 (mad por af; M162-A04 parental)	0,09	0,14	5,9	0,1	sí	sí	inhibe pCal humana y de ratón; no se une a precalicreína
559A-X115-G04 (mad por af; M162-A04 parental)	0,3	0,4	2,2	0,3	sí	sí	inhibe pCal humana y de ratón; no se une a precalicreína

(continuación)

Aislado (nM)	Ki,ap de dominio cat. WT (nM)	Ki,ap de Mutante 1 (nM)	Ki,ap de Mutante 2 (nM)	Ki,ap de Mutante 4 (nM)	Compite con AEBSF	Compite por epi-kal2	Características
559A-M29-D09 (sFab))	0,24	0,27	0,34	0,39	nd	sí	inhibe pCal humana y de ratón; no inhibe pCal de ratón; no se une a precalicreína
559A-M145-D11 (sFab)	0,16	0,23	0,1	0,21	sí	sí	inhibe pCal humana y de ratón; inhibe débilmente pCal de ratón; no se une a precalicreína
559A-M06-D09	2,5	3,4	13,5	2,9	sí	sí	inhibe pCal humana y de ratón; se une a precalicreína
559A-M35-G04	0,8	0,09	1,1	0,8	nd	nd	inhibe pCal humana y de ratón; se une a precalicreína
^a Los anticuerpos se obtuvieron de maduración por afinidad de HV-CDR1/2 y HV-CDR3, se purificaron y se probaron para la inhibición de cualquier dominio catalítico de pCal no mutante (Nota, los anticuerpos inhibieron pCal no mutante de longitud completa aproximadamente igual que el dominio catalítico no mutante).							

Tabla 17

Población	LV-CDR1	LV-CDR2	LV-CDR3	HV-CDR1	HV-CDR2	HV-CDR3	Ki.ap de pCal de longitud compl (nM)	Ki.ap de dominio cat. WT (nM)	Ki.ap de Muta nte 1 (nM)	Ki.ap de Muta nte 2 (nM)	Ki.ap de Muta nte 4 (nM)	Comp ite con AEBS F	Comp ite por epi-kal2	gru po
DX-2922	RTSQFVNS NYLA	GASSR AT	QSSRT PWT	HYLM T	YIPSGGHTIYA DSVKG	VARGIAARSRTS YFDY	0,2	0,22	14	20	0,25	sí	sí	1
X115-B07	RTSQFVNS NYLA	GASSR AT	QSSRT PWT	HYLM T	YIPSGGHTIYA DSVKG	VGGIGRRSRTS YFAQ	0,33		4,7	47	0,14	sí	nd	1
X115-D05	RTSQFVNS NYLA	GASSR AT	QSSRT PWT	DYM MA	SIVPSGGHTHY ADSVKG	VARGIAARSRTS YFDY	0,25	nd	nd	nd	nd	sí	nd	1
X115-E09	RTSQFVNS NYLA	GASSR AT	QSSRT PWT	HYLM T	YIPSGGHTIYA DSVKG	VAGGIAARSRTS SVDQ	0,34	nd	nd	nd	nd	sí	nd	1
X115-H06	RTSQFVNS NYLA	GASSR AT	QSSRT PWT	HYLM T	YIPSGGHTIYA DSVKG	VAGGISARSRTS YFDY	0,35	nd	nd	nd	nd	sí	nd	1
M162-A04	RASQSISSW LA	KASTL ES	QYNTY WT	HYIM M	GIYSSGGITVYA DSVKG	RRTGIPRRDAFDI		nd	nd	nd	nd	sí	sí	1
X115-A03	RASQSISSW LA	KASTL ES	QYNTY WT	HYIM M	GIYSSGGITVYA DSVKG	RRIGVPRRDSFD M	0,16	0,16	0,23	3,7	0,13	sí	nd	1
X115-D01	RASQSISSW LA	KASTL ES	QYNTY WT	IYSM H	SIVPSRGMWTWY ADSVKG	RRTGIPRRDAFDI	0,18	0,18	0,26	2,5	0,12	sí	nd	1
X115-F02	RASQSISSW LA	KASTL ES	QYNTY WT	HYIM M	GIYSSGGITVYA DSVKG	RRIGVPRRDEFD I	0,089	0,09	0,14	5,9	0,1	sí	sí	1
X115-G04	RASQSISSW LA	KASTL ES	QYNTY WT	HYIM M	GIYSSGGITVYA DSVKG	RRTGVPRRDEF DI	0,6	0,3	0,4	2,2	0,3	sí	sí	1
M29-D09	SGNKLGDK YVA	QDTRK PS	QAWDSSI VI	WYT MV	YIPSGGATFY ADSVKG	GSYDIWGFYSD H	0,7	0,24	0,27	0,34	0,39	n	sí	2

Población	LV-CDR1	LV-CDR2	LV-CDR3	HV-CDR1	HV-CDR2	HV-CDR3	Ki,ap de pCal de longitud completa (nM)	Ki,ap de dominio cat. WT (nM)	Ki,ap de Muta nte 1 (nM)	Ki,ap de Muta nte 2 (nM)	Ki,ap de Muta nte 4 (nM)	Comp ite con AEBS F	Comp ite por epi-kal2	grupo
M145-D11	SGDKLGD KYTS	QDIKR PS	QAWDSPN ARV	HYR MS	SIYPSGGRTVYA DSVKG	DKFEWRLLFRGIGN DAFDI	0,79	0,16	0,23	0,1	0,21	sí	sí	2
M06-D09	RASQSIRN YLN	AASTL QS	QQLSGYPH T	FYY MV	VIYPSGGITVYAD SVKG	DKWAVMPPYYYYA MDV	5,9	2,5	3,4	13,5	2,9	sí	sí	3
M35-G04	RASQSVS SYLA	DASN RAT	QQRSNWP RGFT	YYH MS	VISPSGGSTKYA DSVKG	GGSSDYAWGSYRR PYFDY	2,9	0,8	0,09	1,1	0,8	nd	nd	3

Mediciones de $K_{i,ap}$ en equilibrio. Se midieron las constantes de inhibición aparente (valores de $K_{i,ap}$) por preincubación de disoluciones de enzima e inhibidor antes de iniciar las reacciones con sustrato. Se preincubaron la enzima y el inhibidor durante 2 horas a 30 °C en una placa de 96 pocillos añadiendo 10 µl de 10X disolución de enzima y 10 µl de 10X disoluciones de inhibidor a 70 µl de tampón de reacción. Las reacciones se iniciaron mediante la adición de 10 µl de 10X reserva concentrada de sustrato, y se monitorizaron a 30 °C en un lector de placas de fluorescencia con las longitudes de onda de excitación y de emisión establecidas a 360 nm/460 nm, respectivamente. Se adquirieron los datos cinéticos por el aumento en la fluorescencia, y las tasas iniciales para cada condición se representaron contra la concentración de inhibidor total. Los datos se ajustaron a la siguiente ecuación para inhibidores de unión fuertes:

$$A = A_0 - A_{inh} \left(\frac{(K_{i,ap} + Inh + E) - \sqrt{(K_{i,ap} + Inh + E)^2 - 4 \cdot Inh \cdot E}}{2 \cdot E} \right) \quad \text{Ec. 1}$$

Donde A = tasa inicial observada a cada concentración de inhibidor; A_0 = tasa inicial observada en ausencia de inhibidor; A_{inh} = tasa inicial observada para el complejo de inhibidor enzimático; Inh = concentración de inhibidor; E = concentración enzimática total (tratada como un parámetro propuesto); y $K_{i,ap}$ = constante de inhibición en equilibrio aparente.

Grupos de inhibidores de anticuerpo. Los anticuerpos en el Grupo 1 inhiben pCal humana y de ratón, pero no se unen a precalicreína. Los anticuerpos en el Grupo 2 inhiben pCal humana, pero no de ratón, y no se unen a precalicreína. Los anticuerpos en el Grupo 3 inhiben la pCal humana y de ratón pero se unen a precalicreína.

Análisis de competición Biacore con un anticuerpo contra calicreína a modo de ejemplo, epi-Kal2.

Epi-Kal2 es un inhibidor de anticuerpos de calicreína que actúa uniéndose al sitio activo de calicreína (para la secuencia véase el Ejemplo 8). El análisis de competición Biacore se usa en el presente documento como un ensayo para determinar si un anticuerpo contra calicreína de prueba se une al mismo sitio que epi-Kal2 y se evalúa midiendo la competición (por ejemplo, desplazamiento) entre epi-Kal2 y el anticuerpo de prueba para unirse al sitio activo.

Se inmovilizó IgG específica anti-Fc humano de cabra o IgG anti-Fab humano por acoplamiento de amina en un chip sensor CM5 a densidades de inmovilización de aproximadamente 5000 UR. Se capturaron los anticuerpos anti-pCal o sFab sobre sus superficies respectivas inyectando una disolución 50 nM de IgG/sFab durante 1-2 minutos a 5 a µl/min. Se inyectaron pCal humana (100 nM) o complejo de pCal humana-ep-kal2 (hpKal 100 nM que se había preincubado con epi-kal2 1 µM durante 1 hora a temperatura ambiente) sobre las IgG capturadas o sFab durante 5 minutos a 20-50 µl/min seguido por una fase de disociación de 5-10 minutos. Las respuestas de unión se registraron al final de la fase de asociación. Se consideraron IgG o sFab anti-pCal que competían con epi-kal2 para unirse a pCal humana si la unión del complejo pCal-epi-kal2 a los anticuerpos anti-pCal era significativamente reducida (> 70 %) en comparación con una inyección de hpKal solo. La superficie del chip sensor se regeneró con un pulso de glicina 10 mM a pH 1,5 a un caudal de 100 µl/min. Las mediciones se realizaron a 25 °C usando HBS-P (HEPES 10 mM a pH 7,4, NaCl 150 mM y 0,005 % de tensioactivo P20) como tampón de electroforesis. Los resultados del análisis de competición Biacore para epi-Kal2 se muestran en el presente documento en las Figuras 11A y 11B.

Análisis de competición Biacore con el inhibidor calicreína de molécula pequeña, AEBSF.

AEBSF (es decir, clorhidrato de fluoruro de 4-(2-aminoetil)bencenosulfonilo) es un inhibidor de molécula pequeña de calicreína. Se usa en el presente documento el análisis de competición Biacore para determinar si un anticuerpo de prueba se une al mismo sitio (o un sitio de solapamiento) utilizado por AEBSF para la inhibición de calicreína.

Se inmovilizó IgG específica anti-Fc humano de cabra o IgG anti-Fab humano por acoplamiento de amina en un chip sensor CM5 a densidades de inmovilización de aproximadamente 5000 UR. Se capturaron IgG o sFab anti-pCal sobre sus superficies respectivas inyectando una disolución 50 nM de IgG/sFab durante 1-2 minutos a 5 a µl/min. Se inyectaron pCal humana (100 nM) o complejo de pCal humana-AEBSF (hpKal 100 nM que se había pretratado con AEBSF 1 mM durante 1 hora a temperatura ambiente) sobre las IgG o sFab capturados durante 5 minutos a 20-50 µl/min seguido por una fase de disociación de 5-10 minutos. Las respuestas de unión se registraron al final de la fase de asociación. Se consideraron IgG o sFab anti-pCal que competían con AEBSF para unirse a pCal humana si la unión del complejo pCal-AEBSF a los anticuerpos anti-pCal era significativamente reducida (> 70 %) en comparación con una inyección de hpKal solo. La superficie del chip sensor se regeneró con un pulso de glicina 10 mM a pH 1,5 a un caudal de 100 µl/min. Las mediciones se realizaron a 25 °C usando HBS-P (HEPES 10 mM a pH 7,4, NaCl 150 mM y 0,005 % de tensioactivo P20) como tampón de electroforesis. Los resultados del análisis de competición Biacore para AEBSF se muestran en el presente documento en la Figura 12.

Lo siguiente son las secuencias para las regiones variables de la cadena ligera (LV) y regiones variables de la cadena pesada (HV) para 8 anticuerpos anti-pCal madurados por afinidad a modo de ejemplo

ES 2 905 545 T3

559A-M0029-D09-LV
QSALTQPPTVSVSPGQTASITCSGNKLGDKYVAWYQQKPGQSPMLVIYQDTRPSRVSERFSGSNSANTAT
LSISGTQALDEADYYCQAWDSSIIVIFGGGTRLTVL

559A-M0145-D11-LV
QSVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGNKLGDKYTSWYQQRPQGSPVLVIYQDIKRPSGIPERFSGSNSGNTAT
LTISGTQAMDEADYYCQAWDSPNARVFGSGTKVTVL

5 559A-M0162-A04-LV
DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPNLLIYKASTLESGVPSRFSGSGSGTEF
TLTISSLQPDDEFATYYCQQYNTYWTFGQGTKVEIK

559A-X0101-A01-LV
EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRTSQFVNSNYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTD
FTLTISRLEPEDFAVYYCQQSSRTPWTFGQGTKVEIK

10 559A-X0115-A03-LV
DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASTLESGVPSRFSGSGSGTEF
TLTISSLQPDDEFATYYCQQYNTYWTFGQGTKVEIK

559A-X0115-B07-LV
EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRTSQFVNSNYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTD
FTLTISRLEPEDFAVYYCQQSSRTPWTFGQGTKVEIK

559A-X0115-D01-LV
DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASTLESGVPSRFSGSGSGTEF
TLTISSLQPDDEFATYYCQQYNTYWTFGQGTKVEIK

15 559A-X0115-D05-LV
EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRTSQFVNSNYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTD
FTLTISRLEPEDFAVYYCQQSSRTPWTFGQGTKVEIK

559A-X0115-E09-LV
EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRTSQFVNSNYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTD
FTLTISRLEPEDFAVYYCQQSSRTPWTFGQGTKVEIK

20 559A-X0115-F02-LV
DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASTLESGVPSRFSGSGSGTEF
TLTISSLQPDDEFATYYCQQYNTYWTFGQGTKVEIK

559A-X0115-G04-LV
DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASTLESGVPSRFSGSGSGTEF
TLTISSLQPDDEFATYYCQQYNTYWTFGQGTKVEIK

559A-X0115-H06-LV
EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRTSQFVNSNYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTD
FTLTISRLEPEDFAVYYCQQSSRTPWTFGQGTKVEIK

25 559A-M0006-D09-LV
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIIRNYLNWYQQKPGKAPNLLIYAASLTQSGVPARFSGSGSGTDF
TLTISSLQPEDFATYYCQQLSGYPHTFGQGTKLEIK

559A-M0035-G04-LV
QDIQMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNATGIPARFSGSGSGTD
FTLTISLLEPEDFAVYYCQQRSNWPRGFTFGPGTKVDIK

30 559A-M0029-D09-HV
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSWYTMVWRQAPGKGLEWVSYYIPSGGATFYADSVKGRFTIS
RDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAMGSYDIWGFYSDHWGQGLTVTVSS

559A-M0145-D11-HV
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYRMSWVRQAPGKGLEWVSYYIPSGGRTVYADSVKGRFTIS
RDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKDKFEWRL LFRGIGNDAFDIWGQGTMTVTVSS

ES 2 905 545 T3

559A-M0162-A04-HV
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYIMMWVRQAPGKGLEWVSGIYSSGGITVYADSVKGRFTIS
RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAYRRTGIPRRDAFDIWGQGTMTVTSS

559A-X0101-A01-HV
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYLMTWVRQAPGKGLEWVSYISPSGGHTIYADSVKGRFTIS
RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVARGIAARSRTSYFDYWGGQGLTVTVSS

559A-X0115-A03-HV
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYIMMWVRQAPGKGLEWVSGIYSSGGITVYADSVKGRFTIS
RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAWRRIGVPRRDSFDMWGQGTMTVTSS

559A-X0115-B07-HV
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYLMTWVRQAPGKGLEWVSYISPSGGHTIYADSVKGRFTIS
RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAMVGQIGRGRSRTSYFAQWGGQGLTVTVSS

559A-X0115-D01-HV
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYSMHWVRQAPGKGLEWVSSIYPSRGMTWYADSVKGRFTIS
RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAYRRTGIPRRDAFDIWGQGTMTVTSS

559A-X0115-D05-HV
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYMMWVRQAPGKGLEWVSSIYPSGGHTIYADSVKGRFTIS
RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVARGIAARSRTSYFDYWGGQGLTVTVSS

559A-X0115-E09-HV
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYLMTWVRQAPGKGLEWVSYISPSGGHTIYADSVKGRFTIS
RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVAQGIARSRTSSVDQWGGQGLTVTVSS

559A-X0115-F02-HV
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYIMMWVRQAPGKGLEWVSGIYSSGGITVYADSVKGRFTIS
RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAYRRIGVPRRDEFDIWGQGTMTVTSS

559A-X0115-G04-HV
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYIMMWVRQAPGKGLEWVSGIYSSGGITVYADSVKGRFTIS
RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAYRRTGVPRRDEFDIWGQGTMTVTSS

559A-X0115-H06-HV
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYLMTWVRQAPGKGLEWVSYISPSGGHTIYADSVKGRFTIS
RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVAQGISARSRTSYFDYWGGQGLTVTVSS

559A-M0006-D09-HV
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSFYMMWVRQAPGKGLEWVSVIYPSGGITVYADSVKGRFTIS
RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDKWAVMPPIYYAMDVWGQGTMTVTSS

559A-M0035-G04-HV
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYHMSWVRQAPGKGLEWVSVISPSGGSTKYADSVKGRFTIS
RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGSSDYAWGSYRRPIYFDYWGGQGLTVTVSS

559A-M0029-D09 LV
CAGAGCGCTTTGACTCAGCCACCCACAGTGTCTGTGTCCCCAGGACAGACAGCCAGGATCACCTGCTCTGG
AAATAAATTGGGGGATAAATATGTTGCCTGGTATCAGCAGAAGCCAGGCCAGTCCCCTATGTTGGTCATCT
ATCAAGATACTAAGCGCCCTCAAGAGTTTCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACCTCTGCGAATACAGCCACT
CTGTCCATCAGCGGGACCCAGGCTCTGGATGAGGCTGACTATTACTGTGTCAGGCGTGGGACAGCAGCATTGT
GATCTTCGGCGGAGGGACCAGGCTGACCGTCCTA

559A-M0145-D11 LV
CAGAGCGTCTTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCCGTGTCTCCAGGACAGACAGCCAGCATCACCTGCTCTGG
AGATAAATTGGGGGATAAATATCTCTCTGGTATCAGCAGAGGCCAGGCCAGTCCCCTGTATTGGTCATCT
ATCAAGATATCAAGCGCCCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACCTCTGGGAACACAGCCACT

CTGACCATCAGCGGGACCCAGGCTATGGATGAGGCTGACTATTACTGTGTCAGGCGTGGGACAGTCCCAATGC
GAGGGTCTTCGGATCTGGGACCAAGGTCACCGTCCTA

559A-M0162-A04 LV
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCG
GGCCAGTCAGAGTATCAGTAGTTGGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCAACCCTCCTGA
TCTATAAGGCGTCTACTTTAGAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTC
ACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAGTATAAATACTTATTG
GACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA

559A-X0101-A01 LV
GAGATCGTGTGACCCAGTCCCCCTGGCACCCCTGTCTGTCTCTCCGGCGAGAGGCCACCCTGTCTGCCG
GACCTCCCAGTTTCGTGAACCTCAAACCTACCTGGCTTGGTATCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCCCTAGACTGC
TGATCTACGGCGCCTCTTCCAGAGCCACCGCATCCCTGACCGGTTCTCCGGCTCTGGCTCCGGCACCGAC
TTCACCCTGACCATCTCCCGGCTGGAACCTGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTCTCCCGGAC
CCCTTGGAACCTTTGGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAG

559A-X0115-A03 LV
GACATCCAGATGACCCAGTCCCCCTCCACCCTGTCCGCCTCTGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTCTG
GGCCTCCCAGTCCATCTCCAGCTGGCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGCAAGGCCCCCAAGCTGTCTGA
TCTACAAGGCCAGCACCCCTGGAATCCGGCGTGGCCTCCAGATTCTCCGGCTCTGGCTCCGGCACCGAGTTC
ACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCGACGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACAACACCTACTG
GACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAG

5

559A-X0115-B07 LV
GAGATCGTGTGACCCAGTCCCCCTGGCACCCCTGTCTGTCTCTCCGGCGAGAGGCCACCCTGTCTGCCG
GACCTCCCAGTTTCGTGAACCTCAAACCTACCTGGCTTGGTATCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCCCTAGACTGC
TGATCTACGGCGCCTCTTCCAGAGCCACCGCATCCCTGACCGGTTCTCCGGCTCTGGCTCCGGCACCGAC
TTCACCCTGACCATCTCCCGGCTGGAACCTGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTCTCCCGGAC
CCCTTGGAACCTTTGGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAG

559A-X0115-D01 LV
GACATCCAGATGACCCAGTCCCCCTCCACCCTGTCCGCCTCTGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTCTG
GGCCTCCCAGTCCATCTCCAGCTGGCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGCAAGGCCCCCAAGCTGTCTGA
TCTACAAGGCCAGCACCCCTGGAATCCGGCGTGGCCTCCAGATTCTCCGGCTCTGGCTCCGGCACCGAGTTC
ACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCGACGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACAACACCTACTG
GACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAG

10

559A-X0115-D05 LV
GAGATCGTGTGACCCAGTCCCCCTGGCACCCCTGTCTGTCTCTCCGGCGAGAGGCCACCCTGTCTGCCG
GACCTCCCAGTTTCGTGAACCTCAAACCTACCTGGCTTGGTATCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCCCTAGACTGC
TGATCTACGGCGCCTCTTCCAGAGCCACCGCATCCCTGACCGGTTCTCCGGCTCTGGCTCCGGCACCGAC
TTCACCCTGACCATCTCCCGGCTGGAACCTGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTCTCCCGGAC
CCCTTGGAACCTTTGGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAG

559A-X0115-E09 LV
GAGATCGTGTGACCCAGTCCCCCTGGCACCCCTGTCTGTCTCTCCGGCGAGAGGCCACCCTGTCTGCCG
GACCTCCCAGTTTCGTGAACCTCAAACCTACCTGGCTTGGTATCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCCCTAGACTGC
TGATCTACGGCGCCTCTTCCAGAGCCACCGCATCCCTGACCGGTTCTCCGGCTCTGGCTCCGGCACCGAC
TTCACCCTGACCATCTCCCGGCTGGAACCTGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTCTCCCGGAC
CCCTTGGAACCTTTGGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAG

559A-X0115-F02 LV
GACATCCAGATGACCCAGTCCCCCTCCACCCTGTCCGCCTCTGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTCTG
GGCCTCCCAGTCCATCTCCAGCTGGCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGCAAGGCCCCCAAGCTGTCTGA
TCTACAAGGCCAGCACCCCTGGAATCCGGCGTGGCCTCCAGATTCTCCGGCTCTGGCTCCGGCACCGAGTTC

15

ACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCGACGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACAACACCTACTG
GACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAG

559A-X0115-G04 LV
GACATCCAGATGACCCAGTCCCCCTCCACCCTGTCCGCCTCTGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTCTG
GGCCTCCCAGTCCATCTCCAGCTGGCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGCAAGGCCCCCAAGCTGTCTGA
TCTACAAGGCCAGCACCCCTGGAATCCGGCGTGGCCTCCAGATTCTCCGGCTCTGGCTCCGGCACCGAGTTC
ACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCGACGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACAACACCTACTG
GACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAG

20

559A-X0115-H06 LV

GAGATCGTGTGACCCAGTCCCCTGGCACCTGTCTCTGTCTCCCGGCGAGAGAGCCACCCTGTCTGCGG
GACCTCCCAGTTTCGTGAACTCCAACCTACCTGGCTTGGTATCAGCAGAAAGCCAGGCCAGGCCCTTAGACTGC
TGATCTACGGCGCCTCTTCCAGAGCCACCGGCATCCCTGACCGGTTCTCCGGCTCTGGCTCCGGCACCGAC
TTCACCCGTGACCATCTCCCGGCTGGAACCTGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTCTCCCGGAC
CCCTTGACCTTTGGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAG

559A-M0006-D09 LV

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCG
GGCAAGTCAGAGTATTCGCAACTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACAGGGAAAGCCCCTAACCTCCTGA
TCTATGCTGCATCCACTTTGCAAAAGTGGGTGCCAGCAAGTTTCAGTGCCAGTGATCTGGGACAGATTTTC
ACTCTCACTATCAGCAGTCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGCTTAGTGTTACCC
CCACACTTTTGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA

559A-M0035-G04 LV

CAAGACATCCAGATGACCCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTG
CAGGGCCAGTCAGAGTGTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCC
TCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCAGCCAGGTTTCAGTGCCAGTGCGTCTGGGACAGAC
TTCCTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGAGTTTATTACTGTGACGAGCGTAGCAACTG
GCCTGCGGATTCACTTTTCGGCCCTGGGACCAAGGTGGATATCAAA

5

559A-M0029-D09 HV

GAAGTTCAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTTCAGCCTGGTGGTTCTTTACGTCTTTCTTGCGCTGC
TTCCGGATTCACTTTCTCTTGGTACACTATGGTTTGGGTTCGCCAAGCTCCTGGTAAAGGTTTGGAGTGGG
TTTCTTATATCTATCCTTCTGGTGGCGCTACTTTTTATGCTGACTCCGTTAAAGGTCGCTTCACTATCTCT
AGAGACAACCTAAGAATACTCTCTACTTGAGATGAACAGCTTAAGGGCTGAGGACACGGCCGTGTATTA
CTGTGCGATGGGTTTATATGATTACATTTGGGGATTTTATAGTGACCACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCA
CCGTCTCAAGC

559A-M0145-D11 HV

GAAGTTCAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTTCAGCCTGGTGGTTCTTTACGTCTTTCTTGCGCTGC
TTCCGGATTCACTTTCTCTCATTACCGTATGCTTGGGTTCGCCAAGCTCCTGGTAAAGGTTTGGAGTGGG
TTTCTTCTATCTATCCTTCTGGTGGCCGTACTGTTTATGCTGACTCCGTTAAAGGTCGCTTCACTATCTCT
AGAGACAACCTAAGAATACTCTCTACTTGAGATGAACAGCTTAAGGGCTGAGGACACGGCCGTGTATTA
CTGTGCGAAGATAAAGTTTCAGTGGAGGTTATTATTTTCGCGGATTGGAATGATGCTTTTGATATCTGGG
GCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCAAGC

10

559A-M0162-A04 HV

GAAGTTCAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTTCAGCCTGGTGGTTCTTTACGTCTTTCTTGCGCTGC
TTCCGGATTCACTTTCTCTCATTACATTATGATGTGGGTTCGCCAAGCTCCTGGTAAAGGTTTGGAGTGGG
TTTCTTCTATCTATCCTTCTGGTGGCCGTACTGTTTATGCTGACTCCGTTAAAGGTCGCTTCACTATCTCT
AGAGACAACCTAAGAATACTCTCTACTTGAGATGAACAGCTTAAGGGCTGAGGACACGGCCGTGTATTA
CTGTGCGTACCGCCGACTGGGATTCCAAGAAGAGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCA
CCGTCTCAAGC

559A-X0101-A01 HV

GAGGTGCAATTGCTGGAATCCGGCGGAGGTCTGGTGCAGCCTGGCGGCTCCCTGAGACTGTCTTGCGCCGC
CTCCGGCTTACCTTCTCCCACTACCTGATGACCTGGGTGCGCCAGGCTCCTGGCAAGGGCCTCGAATGGG
TGTCTACATCTCCCCCTCTGGCGGCCACACCATCTACGCCGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCC
CGGGACAACCTCAAGAACACCCGTATCTGCAGATGAACCTCCCTGAGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTA
CTGCGCCAGGGTGGCCAGAGAAATCGCCGCCAGGTCCCGGACCTCCTACTTCGACTACTGGGGCCAGGGCA
CCCTGGTGACCGTGTCTCTCC

559A-X0115-A03 HV

GAGGTGCAATTGCTGGAATCCGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCTCCCTGAGACTGTCTTGCGCCGC
CTCCGGCTTTTACCTTCTCCCACTACATCATGATGTGGGTGCGACAGGCTCCAGGCAAGGGCCCTGGAATGGG
TGTCCGGCATCTACTCTCCGGCGGCATCACCCTGTACGCCGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCC
CGGGACAACCTCAAGAACACCCGTGTACCTGCAGATGAACCTCCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTA
CTGTGCTTGGCGGAGAATCGGCGTGGCCAGACGGGACTCCTTCGACATGTGGGGACAGGGCACCATGGTGA
CAGTGTCTCTCC

15

559A-X0115-B07 HV

GAGGTGCAATTGCTGGAATCCGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCTCCCTGAGACTGTCTTGCGCCGC
CTCCGGCTTACCTTCTCCCACTACCTGATGACCTGGGTGCGACAGGCTCCAGGCAAGGGCCCTGGAATGGG
TGTCTACATCTCCCCCTCTGGCGGCCACACCATCTACGCCGACTCCGTGAAGGGCCGGTTTACCATCTCC
CGGGACAACCTCAAGAACACCCGTGTACCTGCAGATGAACCTCCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTA
CTGTGCCATGTCGGCCAGGGAATCCGGGGCAGATCCCGGACCTCCTACTTCGCCAGTGGGGCCAGGGCA
CCCTGGTGACAGTGTCTCTT

559A-X0115-D01 HV

GAGGTGCAATTGCTGGAATCCGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCTCCCTGAGACTGTCTTGCGCCGC
CTCCGGCTTACCTTCTCCATCTACTCCATGCACTGGGTGCGACAGGCTCCAGGCAAGGGCCTGGAATGGG
TGTCCTCCATCTACCCCTCCCGGGGCATGACTTGGTACGCCGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACAATCTCC
CGGGACAACCTCAAGAACACCCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTA
CTGCGCCTACCGGCGGACCGGCATCCCTAGACGGGACGCCTTCGACATCTGGGGGCAGGGCACCATGGTGA
CAGTGTCTCTCC

559A-X0115-D05 HV

GAGGTGCAATTGCTGGAATCCGGCGGTGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCTCCCTGAGACTGTCTTGCGCCGC
CTCCGGCTTACCTTCTCCGACTACATGATGGCCTGGGTGCGACAGGCTCCAGGCAAGGGACTGGAATGGG
TGTCCTCCATCGTGCCCTCTGGCGGCCACACCCACTACGCCGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCAACATCTCC
CGGGACAACCTCAAGAACACCCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTA
CTGCGCCAGAGTGGCCAGAGGAATCGCCGCCAGATCCCGGACCTCCTACTTCGACTACTGGGGCCAGGGCA
CCCTGGTGACAGTGTCTCTCC

5

559A-X0115-E09 HV

GAGGTGCAATTGCTGGAATCCGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCTCCCTGAGACTGTCTTGCGCCGC
CTCCGGCTTACCTTCTCCCACTACATGATGGGTGCGACAGGCTCCTGGCAAAGGCCGCTGGAATGGG
TGTCCTACATCTCCCCCTCTGGCGGCCACACCATCTACGCCGACTCCGTGAAGGGCCGGTTTACCATCTCC
CGGGACAACCTCAAGAACACCCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTA
CTGTGCCCGGGTGGCCAGGGAATCGCCGCCAGATCCCGGACCTCCTCTGTGGATCAGTGGGGCCAGGGCA
CCCTGGTGACAGTGTCTCTCT

559A-X0115-F02 HV

GAGGTGCAATTGCTGGAATCCGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCTCCCTGAGACTGTCTTGCGCCGC
CTCCGGCTTACCTTCTCCCACTACATGATGTGGGTGCGACAGGCTCCTGGCAAAGGGCCTGGAATGGG
TGTCGGGCATCTACTCTCCGGCGGCATCACCGTGTACGCCGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCAACATCTCT
CGGGACAACCTCAAGAACACCCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTA
CTGCGCCTACCGGCGGATCGCGGTGCCAGACGGGACGAGTTCGACATCTGGGGGCAGGGCACCATGGTGA
CAGTGTCTCTCC

559A-X0115-G04 HV

GAGGTGCAATTGCTGGAATCCGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCTCCCTGAGACTGTCTTGCGCCGC
CTCCGGCTTACCTTCTCTCACTACATTATGATGTGGGTGCGACAGGCTCCTGGCAAAGGCCGCTGGAATGGG
TGTCGGGATCTACTCTCCGGCGGCATCACCGTGTACGCCGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCAACATCTCC
CGGGACAACCTCAAGAACACCCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTA
CTGCGCCTACAGACGGACCGGCGTGCCAGACGGGACGAGTTCGATATCTGGGGGCAGGGCACCATGGTGA
CAGTGTCTCTCC

10

559A-X0115-H06 HV

GAGGTGCAATTGCTGGAATCCGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCTCCCTGAGACTGTCTTGCGCCGC
CTCCGGCTTACCTTCTCCCACTACCTGATGACCTGGGTGCGACAGGCTCCTGGCAAAGGCCGCTGGAATGGG
TGTCCTACATCTCCCCCTCTGGCGGCCACACCATCTACGCCGACTCCGTGAAGGGCCGGTTTACCATCTCC
CGGGACAACCTCAAGAACACCCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTA
CTGTGCCCGGGTGGCCAGGGAATCTCCGCCAGATCCCGGACCTCCTACTTCGATTACTGGGGCCAGGGCA
CCCTGGTGACAGTGTCTCTCT

559A-M0006-D09 HV

GAAGTTCAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTTTCAGCCTGGTGGTTCTTTACGTCTTTCTTGCGCTGC
TTCCGGATTCACTTTCTCTTTTTACTATATGGTTTTGGGTTCGCCAAGCTCCTGGTAAAGGTTTGGAGTGGG
TTTCTGTTATCTATCTTCTTGGTGGCATTACTGTTTATGCTGACTCCGTTAAAGGTCGCTTCACTATCTCT
AGAGACAACCTCAAGAATACTCTACTTGCAGATGAACAGCTTAAGGGCTGAGGACACGGCCGTGTATTA
CTGTGCGAGAGATAAATGGGCGGTGATGCCCCCTACTACTACTACGCTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGA
CCACGGTCACCGTCTCAAGC

15

559A-M0035-G04 HV

GAAGTTCAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTTTCAGCCTGGTGGTTCTTTACGTCTTTCTTGCGCTGC
TTCCGGATTCACTTTCTCTTTATTACCATATGTTTGGGTTCGCCAAGCTCCTGGTAAAGGTTTGGAGTGGG
TTTCTGTTATCTCTCTTCTGGTGGCTCTACTAAGTATGCTGACTCCGTTAAAGGTCGCTTCACTATCTCT
AGAGACAACCTCAAGAATACTCTACTTGCAGATGAACAGCTTAAGGGCTGAGGACACTGCAGTCTACTA
TTGTGCGAGAGCGGTTTCGAGCGATTACGCTTGGGGGAGTTATCGTCGACCCTACTACTTTGACTACTGGG
GCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCAAGC

REIVINDICACIONES

1. Un ácido o ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en:

(i) un anticuerpo que comprende una secuencia V_H de

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYIMMWVRQAPGKGLEWVSGIYSSGGITVY
ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAYRRIGVPRRDEFDIWGQGTMTVTS
S

y una secuencia V_L de

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASTLESGVPSRF
SGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYCQQYNTYWTFGQGTKVEIK;

(ii) un anticuerpo que comprende una secuencia V_H de

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYIMMWVRQAPGKGLEWVSGIYSSGGITVY
ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAYRRTGIPRRDAFDIWGQGTMTVTS
SASTKGPSVFPLAPSSKS

y una secuencia V_L de

QDIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPNLLIYKASTLESGVPS
RFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYCQQYNTYWTFGQGTKVEIK;

(iii) un anticuerpo que comprende una secuencia V_H de

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYLMTWVRQAPGKGLEWVSYISPSGGHTIY
ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVARGIAARSRTSYFDYWGGQTLV
TVSS

y una secuencia V_L de

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRTSQFVNSNYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIP
DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQSSRTPWTFGQGTKVEIK;

(iv) un anticuerpo que comprende una secuencia V_H de

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYLMTWVRQAPGKGLEWVSYISPSGGHTIY
ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVARGIAARSRTSYFDYWGGQTLV
TVSSASTKGPSVFPLAPSSKS

y una secuencia V_L de

QDIQMTQSPGTLSLSPGERATLSCRTSQFVNSNYLAWYQQTPGQAPRLLIYGASSRATGIP
DRFSGTGYGTDFTLTISRLEPEDYGTYYCQQSSRTPWTFGQGTRVEIK;

(v) un anticuerpo que comprende una secuencia V_H de

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYLMTWVRQAPGKGLEWVSYISPSGGHTIY
ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVARGIAARSRTSYFDYWGGQTLV
TVSS

y una secuencia V_L de

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRTSQFVNSNYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDR
FSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQSSRTPWTFGQGTKVEIK;

(vi) un anticuerpo que comprende una secuencia V_H de

EVQLLESQGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYLMTWVRQAPGKGLEWVSYPSPGGHTIY
ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVARGIAARSRTSYFDYWGGQTLV
TVSSASTKGPSVFPLAPSSKS

5 y una secuencia V_L de

QDIQMTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGISSYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLTQSGVPSR
FSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQQLNSYPLTFGGGTKVEIK;

(vii) un anticuerpo que comprende una secuencia V_H de

EVQLLESQGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSAYSMIWVRQAPGKGLEWVSYPSPGGRTTY
ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGLLLWFRELKSNYFDYWGGQT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS

y una secuencia V_L de

10 QDIQMTQSPSSLSAFVGDRVTITCRASQPIDNYLNWYHQKPGKAPKLLIYAASRLQSGVPS
RLSGSGFGTDFTLTISLQPEDFGNYCQQSYTPYTFGGGTKVEIR;

(viii) un anticuerpo que comprende una secuencia V_H de

EVQLLESQGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSAYSMIWVRQAPGKGLEWVSYPSPGGRTTY
ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGLLLWNRELKSNYFDYWGGQT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS

y una secuencia V_L de

QDIQMTQSPSSLSAFVGDRVTITCRASQPIDNYLNWYHQKPGKAPKLLIYAASRLQSGVPS
RLSGSGFGTDFTLTISLQPEDFGNYCQQSYTPYTFGGGTKVEIR;

15 (ix) un anticuerpo que comprende una secuencia V_H de

EVQLLESQGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSAYSMIWVRQAPGKGLEWVSYPSPGGRTTY
ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGLLLWARELKSNYFDYWGGQT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS

y una secuencia V_L de

QDIQMTQSPSSLSAFVGDRVTITCRASQPIDNYLNWYHQKPGKAPKLLIYAASRLQSGVPS
RLSGSGFGTDFTLTISLQPEDFGNYCQQSYTPYTFGGGTKVEIR;

(x) un anticuerpo que comprende una secuencia V_H de

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYLMTWVRQAPGKGLEWVSYISPSGGHTIY
ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAMVGQGIRGRSRTSYFAQWGQGTL
VTVSS

y una secuencia V_L de

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRTSQFVNSNYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDR
FSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQSSRTPWTFGQGTKVEIK;

(xi) un anticuerpo que comprende una secuencia V_H de

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYLMTWVRQAPGKGLEWVSSIVPSGGHTH
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVARGIAARSRTSYFDYWQGQTL
VTVSS

5

y una secuencia V_L de

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRTSQFVNSNYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDR
FSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQSSRTPWTFGQGTKVEIK;

(xii) un anticuerpo que comprende una secuencia V_H de

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYLMTWVRQAPGKGLEWVSYISPSGGHTIY
ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVAQGIAARSRTSSVDQWGQGTL
VTVSS

10

y una secuencia V_L de

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRTSQFVNSNYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDR
FSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQSSRTPWTFGQGTKVEIK;

(xiii) un anticuerpo que comprende una secuencia V_H de

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYLMTWVRQAPGKGLEWVSYISPSGGHTIY
ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVAQGISARSRTSYFDYWQGQTL
VTVSS

y una secuencia V_L de

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRTSQFVNSNYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDR
FSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQSSRTPWTFGQGTKVEIK;

15

(xiv) un anticuerpo que comprende una secuencia V_H de

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYIMMWVRQAPGKGLEWVSGIYSSGGITVY
ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAWRRIGVPRRDSFDMWGQGTMTV
VSS

y una secuencia V_L de

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASTLESQVPSRF
SGSGSGTEFTLTISLQPDFATYYCQYNTYWTFGQGTKVEIK;

(xv) un anticuerpo que comprende una secuencia V_H de

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYSMHWVRQAPGKGLEWVSSIYPSRGMTW
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAYRRTGIPRRDAFDIWGQGTMVTV
SS

y una secuencia V_L de

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASTLESGVPSRF
SGSGSGTEFTLTISLQPD FATYYCQYNTYWTFGQGTKVEIK;

5 (xvi) un anticuerpo que comprende una secuencia V_H de

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYIMMWVRQAPGKGLEWVSGIYSSGGITVY
ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAYRRTGVPRRDEFDIWGQGTMVTV
SS

y una secuencia V_L

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASTLESGVPSRF
SGSGSGTEFTLTISLQPD FATYYCQYNTYWTFGQGTKVEIK;

(xvii) un anticuerpo que comprende una secuencia V_H de

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSWYTMVWVRQAPGKGLEWVSYIYPSGGATF
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAMS YDIWGFYSDHWGQGTLT
VSSASTKGPSVFPLAPSSKS

10

y una secuencia V_L de

QSALTQPPTVSVSPGQTARITCSGNKLGDKYVAWYQQKPGQSPMLVIYQDTKRPSRVSER
FSGSNSANTATLSISGTQALDEADYYCQAWDSSIVIFGGGTRLTVL;

(xviii) un anticuerpo que comprende una secuencia V_H de

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYRMSWVRQAPGKGLEWVSSIYPSGGRTV
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDKFEWRLLFRGIGNDAFDIWGQ
GTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS

15 y una secuencia V_L de

QSVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYTSWYQQRPGQSPVLVIYQDIKRPSGIPERF
SGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSPNARVFGSGTKVTVL.

2. El ácido o ácidos nucleicos de la reivindicación 1, donde el anticuerpo comprende una secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de cadena pesada (V_H) de

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYIMMWVRQAPGKGLEWVSGIYSSGGITVY
ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAYRRIGVPRRDEFDIWGQGTMVTVS
S

20 y una secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de cadena ligera (V_L) de

DIQMTQSPSTLSASVGDRVITICRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASTLESGVPSRF
SGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYNTYWTFGQGTKVEIK.

3. El ácido o ácidos nucleicos de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa.
- 5 4. El ácido o ácidos nucleicos de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde el anticuerpo es un Fab soluble (sFab).
5. El ácido o ácidos nucleicos de la reivindicación 4, donde el anticuerpo es una IgG.
6. Un vector o vectores que comprenden el ácido o ácidos nucleicos de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
7. El vector o vectores de la reivindicación 6, donde el vector o vectores son un vector o vectores de expresión.
- 10 8. Una célula hospedadora que comprende el ácido o ácidos nucleicos de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 o el vector o vectores de la reivindicación 6 o la reivindicación 7.
9. La célula hospedadora de la reivindicación 8, donde la célula es una célula de mamífero.
10. La célula hospedadora de la reivindicación 9, donde la célula de mamífero es una célula de ovario de hámster chino (CHO).
- 15 11. Un método de producción de un anticuerpo que se une a la forma activa de calicreína plasmática humana y no se une a precalicreína humana, que comprende cultivar la célula hospedadora de una cualquiera de las reivindicaciones 8-10 en un medio de cultivo, para producir de esta manera el anticuerpo.
12. El método de la reivindicación 11, que comprende además recuperar el anticuerpo del medio de cultivo.
13. El método de la reivindicación 11 o la reivindicación 12, que comprende además purificar el anticuerpo.

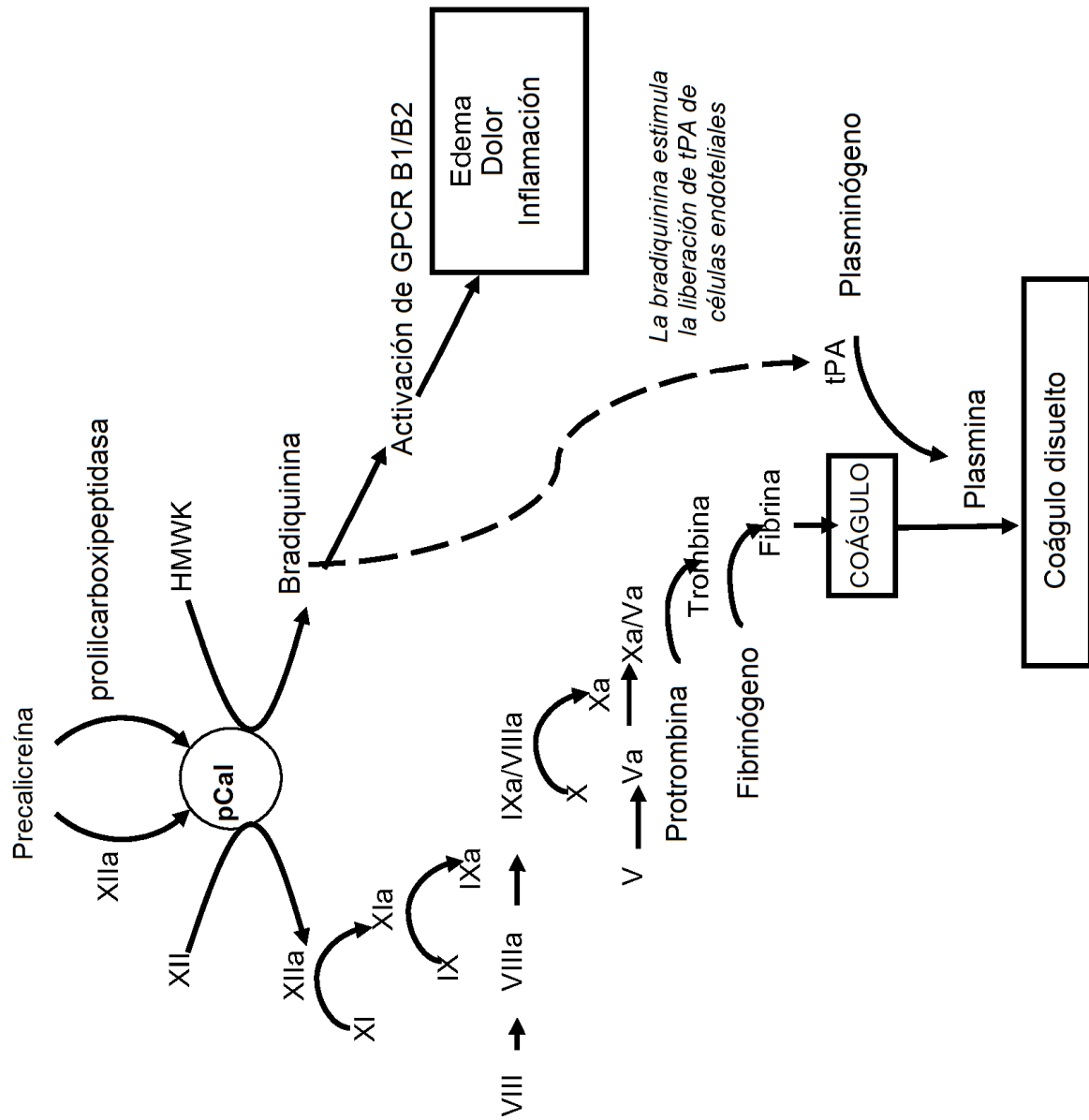


FIGURA 1

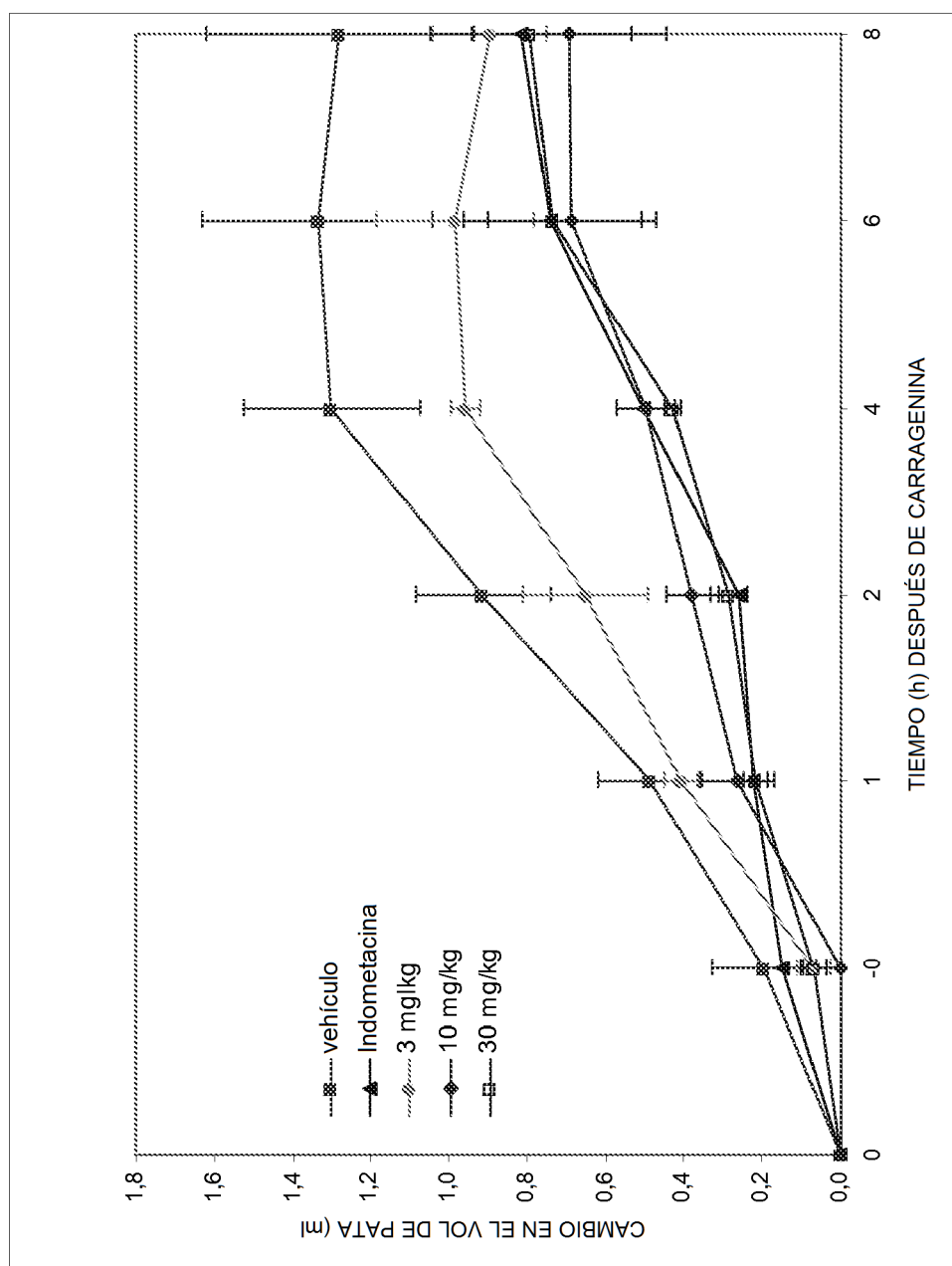


FIGURA 2

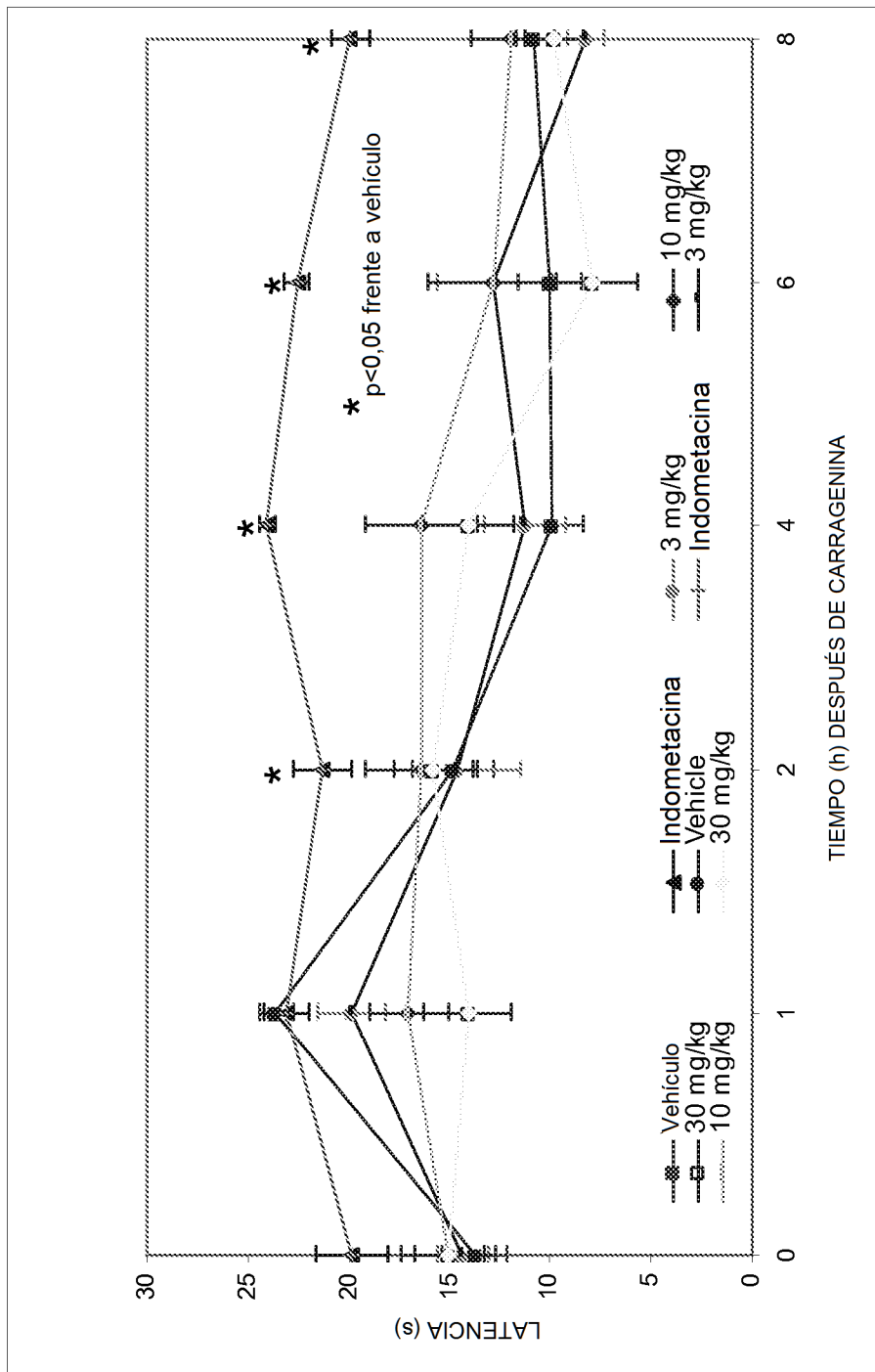


FIGURA 3

```

X63-G06      CAAGACATCCAGATGACCCAGTCTCCAGGACCCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCC
X81-B01      ---GAGATCGTGTGACCCAGTCCCTGGCACCCCTGTCTCTGTCTCCCGGCGAGAGAGCC
** ***      * ***** ** ***** ** ***** ** *****
X63-G06      ACCCTCTCCTGCAGGACCAGTCAATTTGTTAACAGCACTACTTAGCCTGGTACCAACAG
X81-B01      ACCCTGTCTCTGCCGGACCTCCCAGTTTCGTGAACCTCCAATACTAGCTGGCTTGGTATCAGCAG
*****      **** ** ** ** ***** * ** ***** ** ***
X63-G06      ACACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGGATCCAGCAGGGCCACTGGCATC
X81-B01      AAGCCAGGCCAGGCCCCCTAGACTGTGATCTACGGGGCCTCTTCCAGAGCCACCGGCATC
* ** ***** ** ** ** ***** ** ** ** ***** *****
X63-G06      CCAGACAGGTTTCAGTGGCACTGGGTATGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTG
X81-B01      CCTGACCCGGTTCTCCGGCTCTGGCTCCGGCACCGACTTCACTGACCATCTCCCGGCTG
** *** ***** ** ** ** ***** ** ***** * * ***
X63-G06      GAGCCTGAAGATTATGGAACCTACTGTCTCAGCAGAGTTCCAGAACCCCGTGGACGTTT
X81-B01      GAACCTGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTCTCCCGGACCCCTTGGACCTTT
** ***** ** * ***** ***** ** * ***** ***** **
X63-G06      GGCCAAGGGACCAGAGTGGAATCAAA
X81-B01      GGCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAG
*****      ** **** ***** *****

```

FIGURA 4

X63-G06	QDIQMTQSPGTLSPGERATLSCRTSQFVNSNYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGI
X81-B01	-EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRTSQFVNSNYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGI
	* *****
X63-G06	PDRFSGTGYGTDFTLTISRLEPEDYGYCQQSSRTPWTFGGQTRVEIK
X81-B01	PDRFSGSGGTDFLTISRLEPEDFAVYCCQQSSRTPWTFGGQTKVEIK
	***** * *****

FIGURA 5

X81-B01	GAGGTGCAATTGCTGGAATCCGGCGGAGGTCTGGTGCAGCCTGGCGGCTC
X63-G06	GAAGTTCAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTTCAGCCTGGTGGTTC
	** ** *
X81-B01	CCTGAGACTGTCTTGGCGCGCCTCCGGCTTCACCTTCTCCACTACCTGA
X63-G06	TTTACGTCCTTCTTGGCGTGTCCGGATTTCACCTTCTCTCATTAACCTTA
	* *
X81-B01	TGACCTGGGTGGCGCCAGGCTCCTGGCAAGGGCCTCGAATGGGTGTCCTAC
X63-G06	TGACCTGGGTGGCGCCAGGCTCCTGGTAAAGGTTTGGAGTGGGTTCTTAT
	* *
X81-B01	ATCTCCCTCTTGGCGGCCACACCATCTACGCCGACTCCGTTGAAGGCCG
X63-G06	ATCTCTCTTCTTGGTGGCCATACTATTATGCTGACTCCGTTAAAGTCTG
	* *
X81-B01	GTTACCATCTCCCGGGCAAACTCCAAGAACACCCCTGTATCTGCAGATGA
X63-G06	CTTCACTATCTAGAGACAACCTTAAGAACTACTCTCTACTTGCAGATGA
	* *
X81-B01	ACTCCCTGAGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGTGGCC
X63-G06	ACAGCTTAAGGGCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGTGGCC
	* *
X81-B01	AGAGGAATCGCGCCAGGTCCCGACCTCCTACTTCGACTACTGGGGCCA
X63-G06	CGGGGATAGCAGCTCGATCGCGAACCACTTTGACTACTGGGGCCA
	* *
X81-B01	GGGCACCTGTGACCGTGTCTCC
X63-G06	GGGAACCTGTGACCGTGTCTCAAGC
	* *

FIGURA 6

X81-B01	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYLMTWVRQAPGKGLEWVSY
X63-G06	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYLMTWVRQAPGKGLEWVSY

X81-B01	ISPSGGHTIYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVA
X63-G06	ISPSGGHTIYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVA

X81-B01	RGIAARSRTSYFDYWGQGTLVTVSS
X63-G06	RGIAARSRTSYFDYWGQGTLVTVSS

FIGURA 7

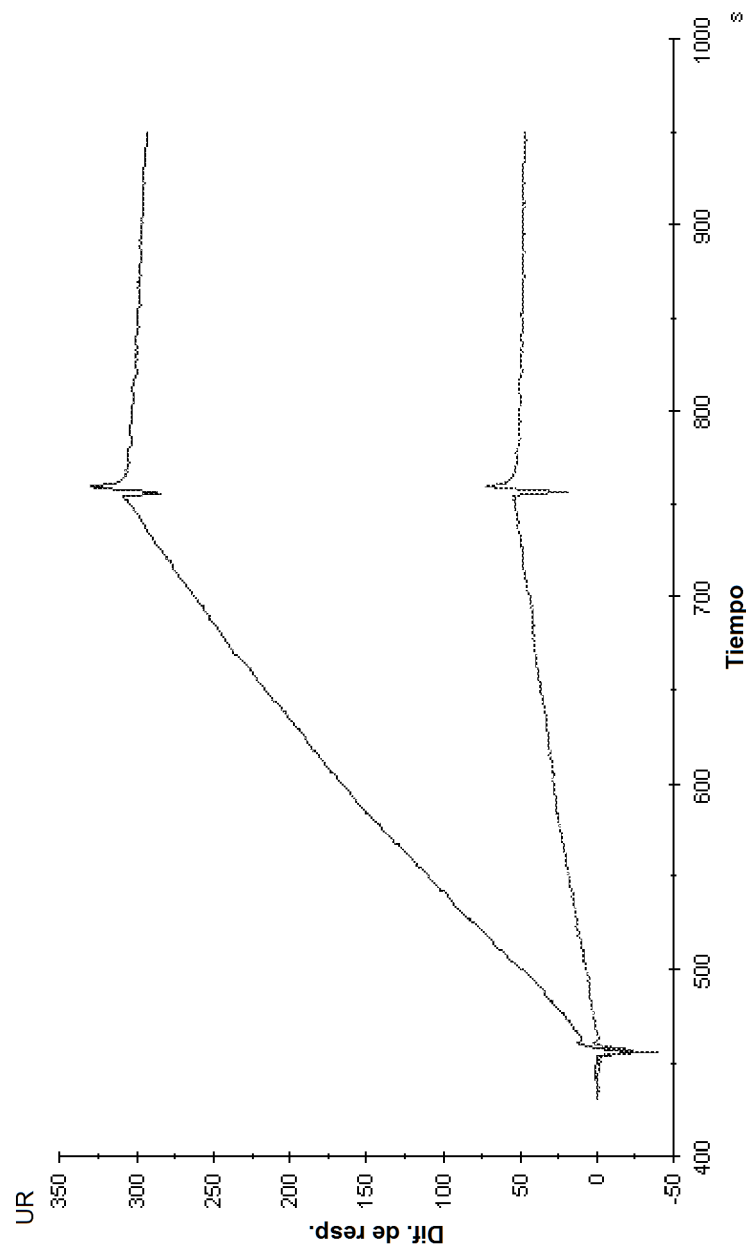


FIGURA 8A

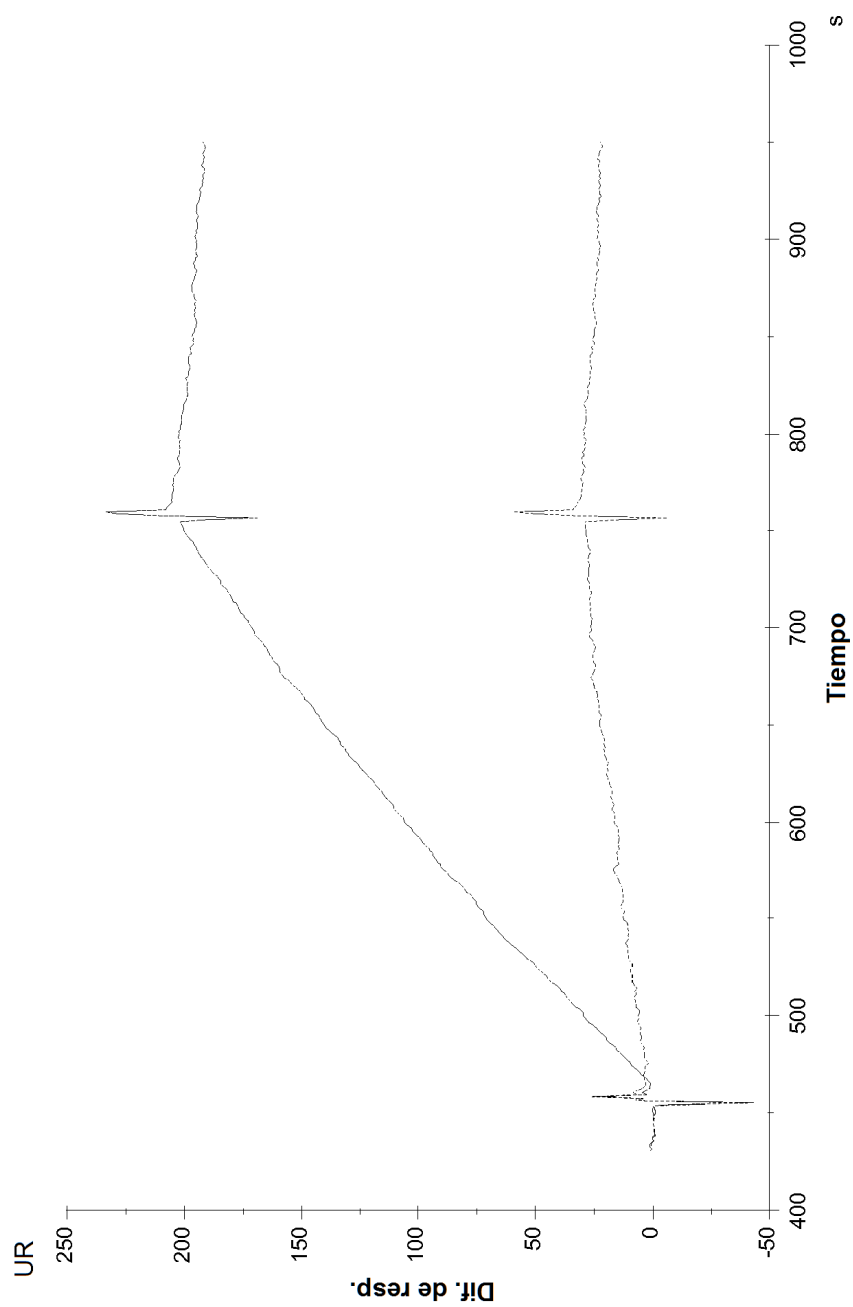


FIGURA 8B

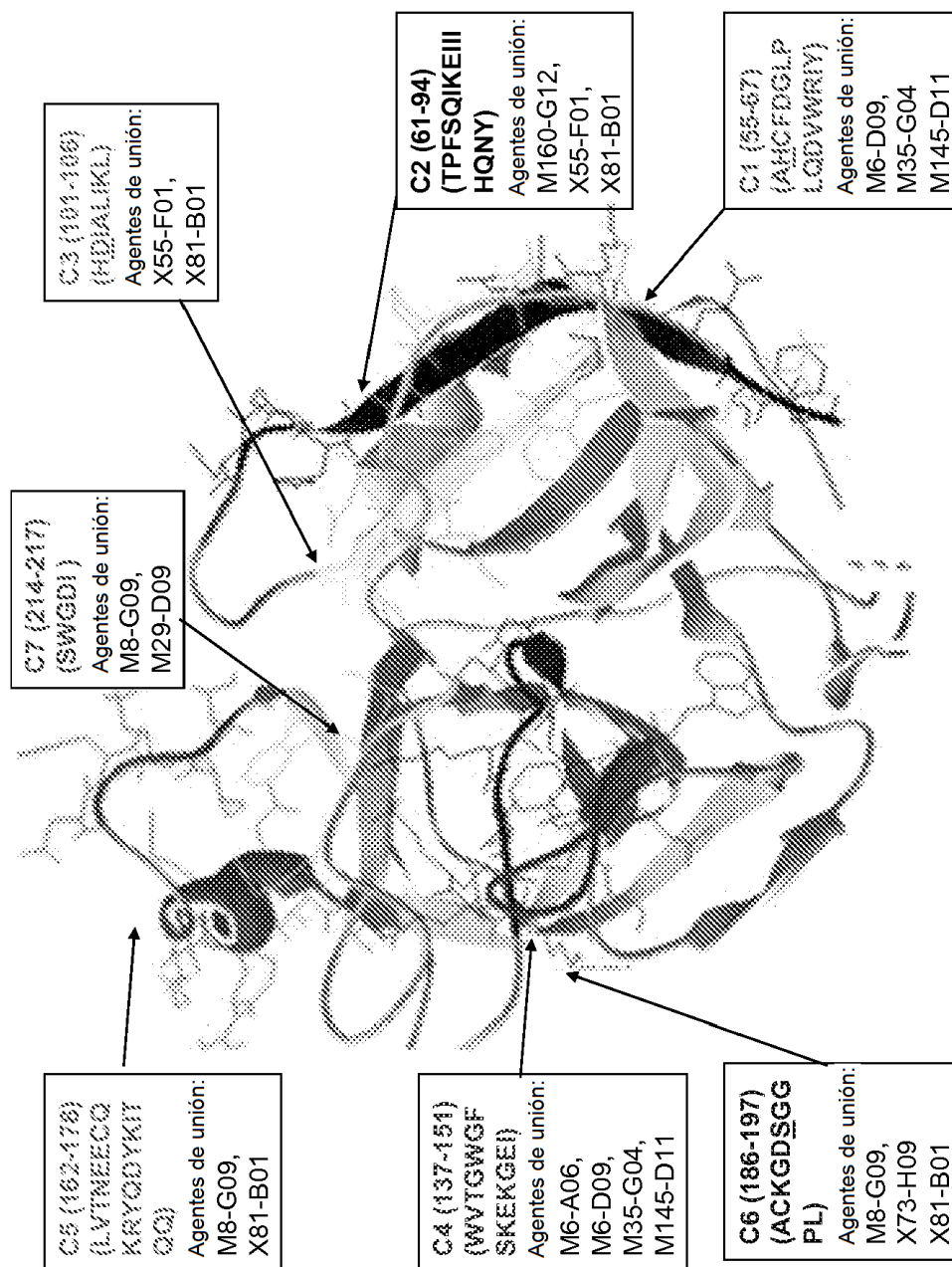


FIGURA 9

[illegible]

FIGURA 10A

	Human	Vaca	Ratón	Rata	Cerdo	Rana	MACACO	Perro	
--EPCHSKIYPGVDEGGEELNVT	EVKGVNV	QVQETCTK	MIR	QFTTYS	SLP	EDCKE	EKKCK	347	
GTEPCHSKIYPQVAFEGEELHVT	EVKGV	QDQVQETCTK	MIR	QFTTYS	SLP	EDCKE	EKKCK	349	
--EPCHSKIYSGVAFEGEELNVT	EVKGV	QDQVQETCTK	MIR	QFTTYS	SLP	EDCKE	EKKCK	347	
--EPCHSKIYSGVAFEGEELNVT	FVQ	QDQVQETCTK	MIR	QFTTYS	SLP	EDCKE	EKKCK	347	
--EPCHFKIYSGVAFEGEELNVT	FVQ	QDQVQETCTK	MIR	QFTTYS	SLP	EDCKE	EKKCK	347	
--EPCHSKIYSEVDFEGEELNVT	FVQ	QDQVQETCTK	MIR	QFTTYS	SLP	EDCKE	EKKCK	355	
---VCPLTMSDFELGDELLV	EVSGERE	QVQAC	TNIR	QFTTYS	SLP	EDCKE	EKKCK	345	
--EPCHSKIYPGVDFEGEELNVT	EVKGVNV	QVQETCTK	MIR	QFTTYS	SLP	EDCKE	EKKCK	350	
--EPCHSKIYSGVDFEGEELNVT	FAE	GVNA	QVQETCTK	MIR	QFTTYS	SLP	EDCKE	EKKCK	340

[illegible]

	00000000000000000000	#####(C1)	00000000000000000000	++	
Humano	VSLQVKA--Q	GGSLICHQWVLTAA	PLDVRWRYSGILNLS	DIKTDPF 463	
Vaca	VSLQVKQRA--Q	SHLCGGSII	GRQWVLTAAHCFDGLLS	NIWRYGGILNLS	EITETSF 464
Ratón	VSLQVKLVG--Q	THLCGGSII	GRQWVLTAAHCFDGI	PPDVRWRYGGILS	EITKETPS 463
Rata	VSLQVKLVG--Q	NHMGCGSII	GRQWVLTAAHCFDGI	PPDVRWRYGGILNLS	EITNKTPF 463
Cerdo	VSLQAKLRA--Q	NHLCGGSII	GRQWVLTAAHCFDGL	SLDVRWRYGGILNLS	EITKETPF 471
Rana	VSMHLRGASYKHA	CGSII	SNQWIVTAAHCFVALY	PQPMWII	YSGFVRLNITKSTPF 465
MACACO	VSLQVKLMA--Q	RHL	CGGSLICHQWVLTAAHCFDGL	PLDVRWRYSGILNLS	DIKTETPF 466
Perro	VSLQVKLRA--Q	SHLCGGSII	GRQWVLTAAHCFDELS	PLDVRWRYSGILNLS	EITKETPF 456

182

FIGURA 10C

NOTA: Las posiciones subrayadas son los aminoácidos que forman la tríada catalítica (His434, Asp483 y Ser578, numeración basada en la secuencia humana)

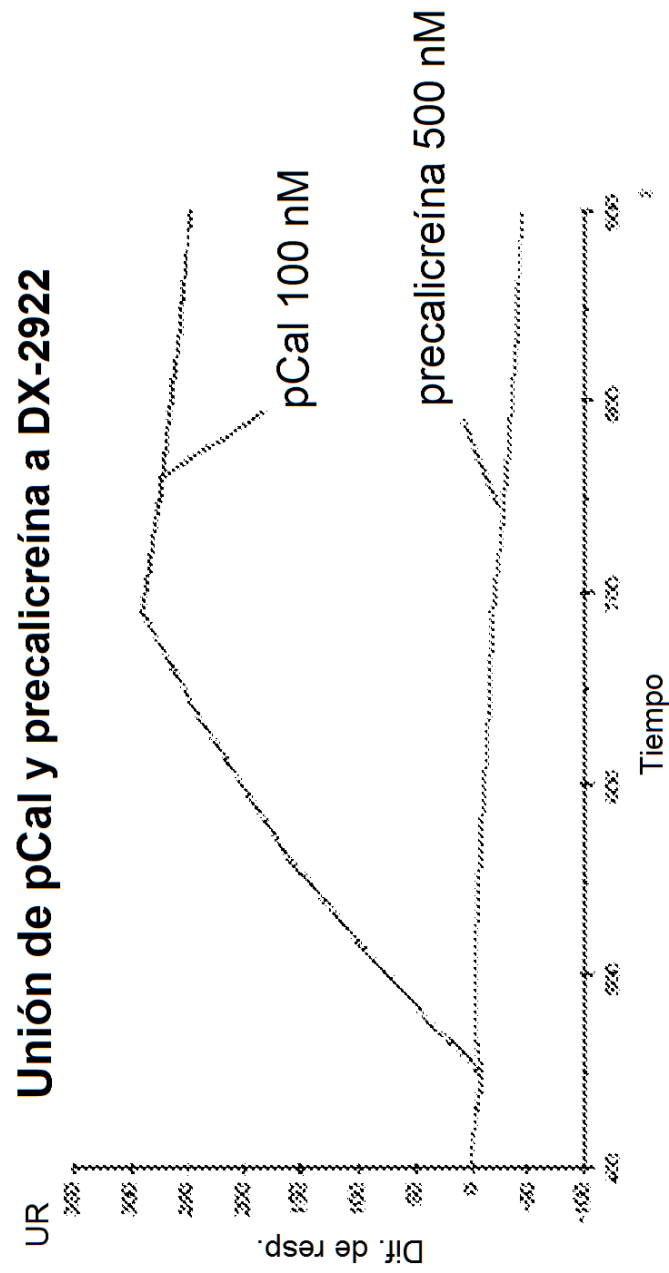


FIGURA 11A

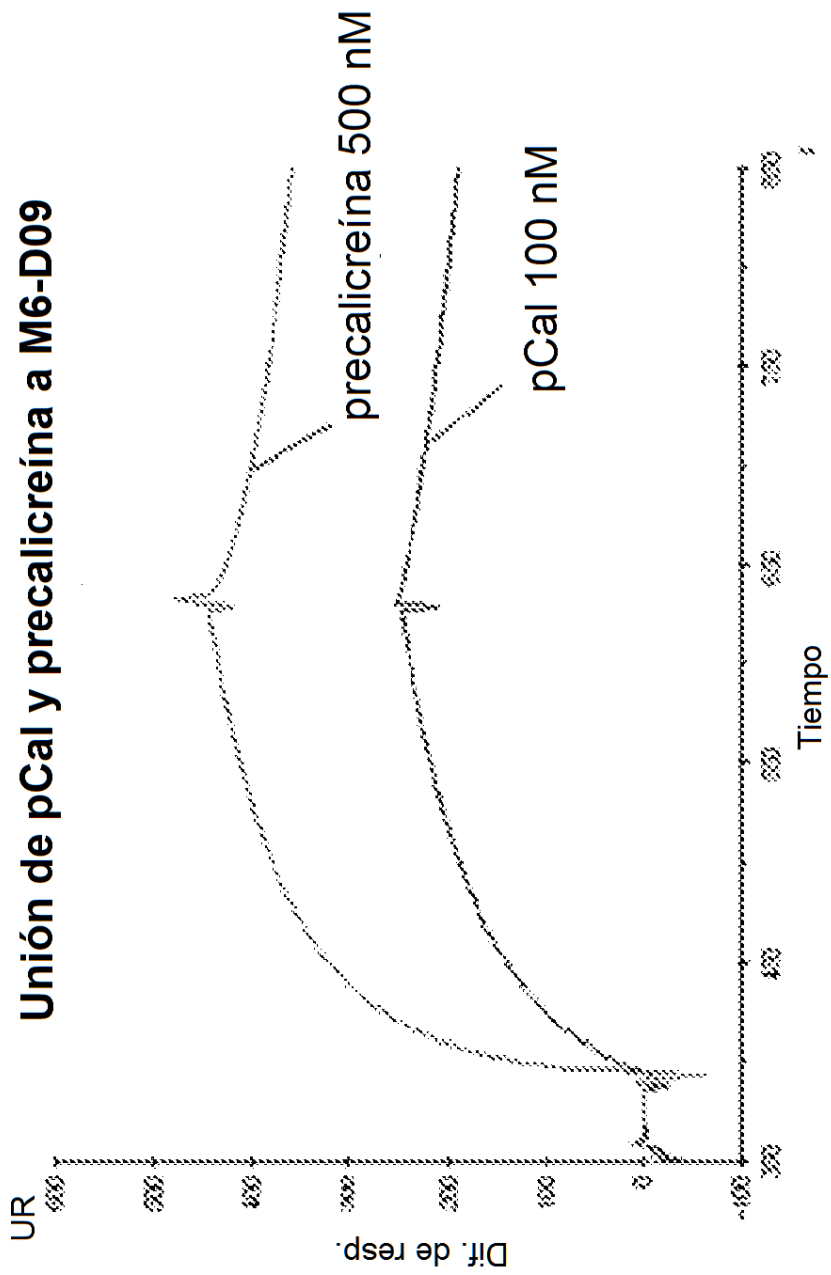


FIGURA 11B

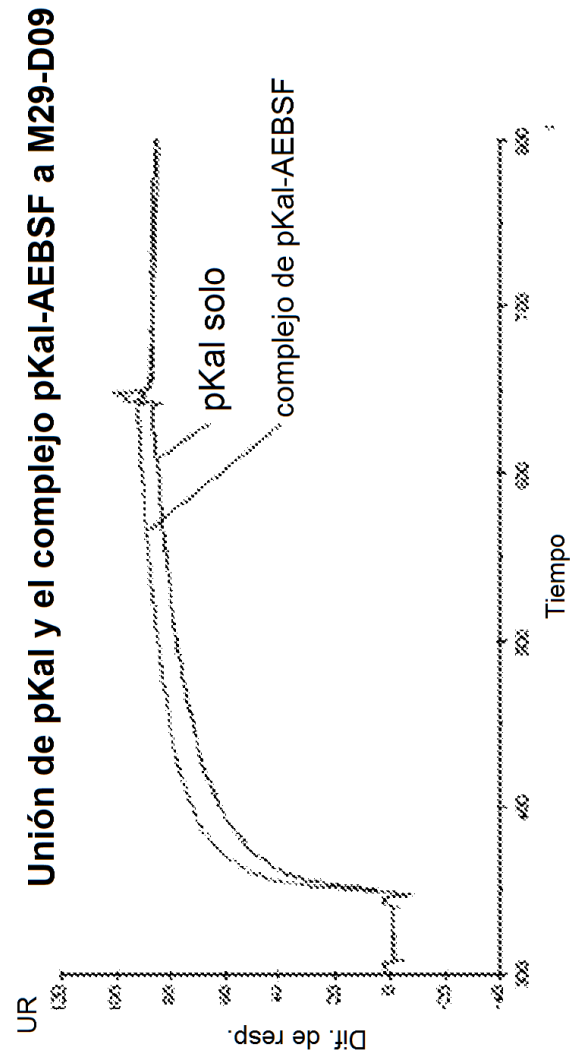
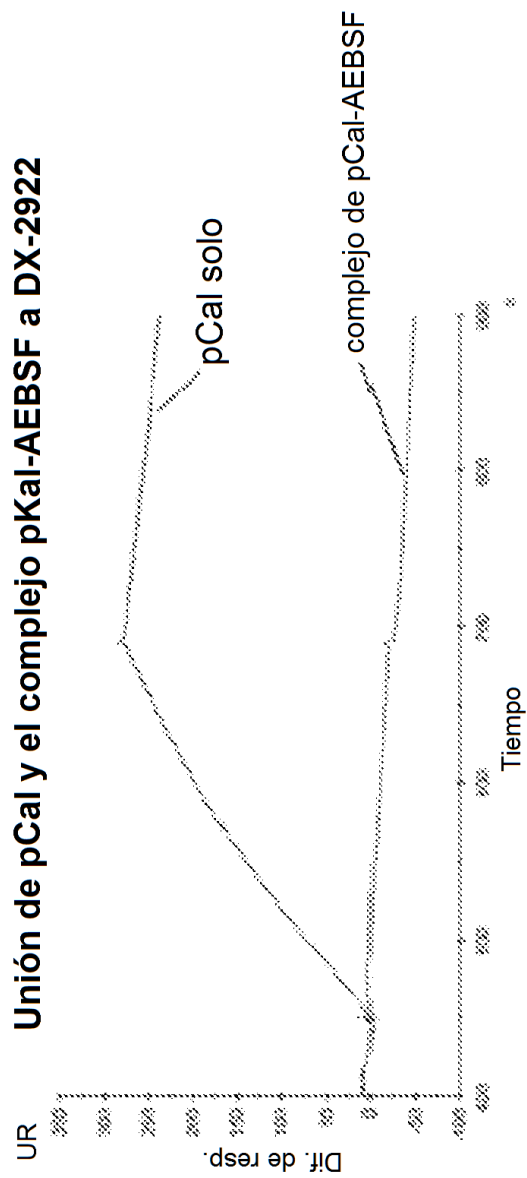


FIGURA 12

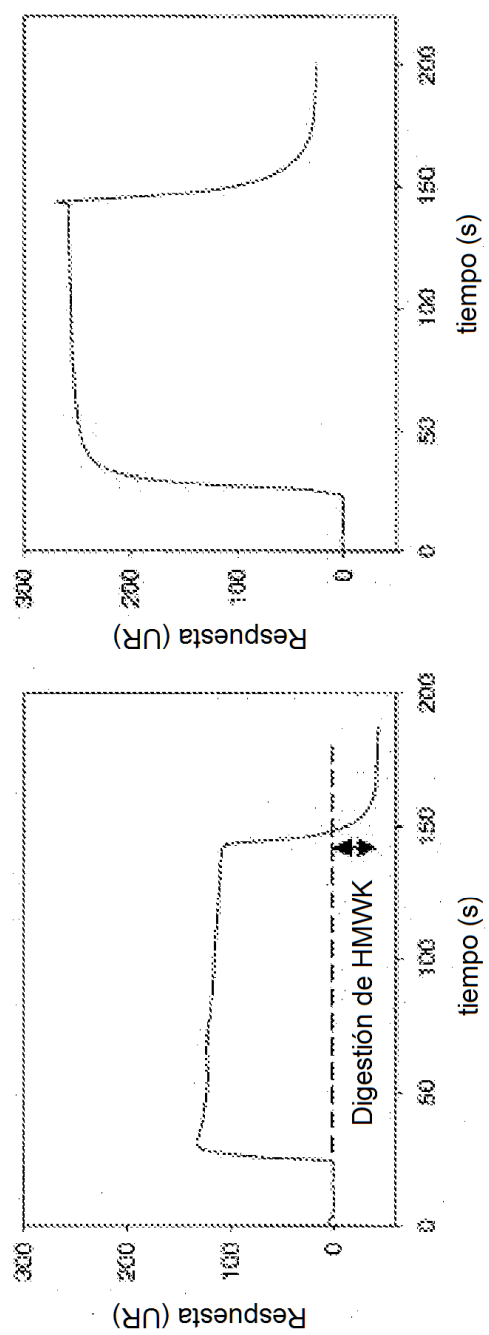


FIGURA 13

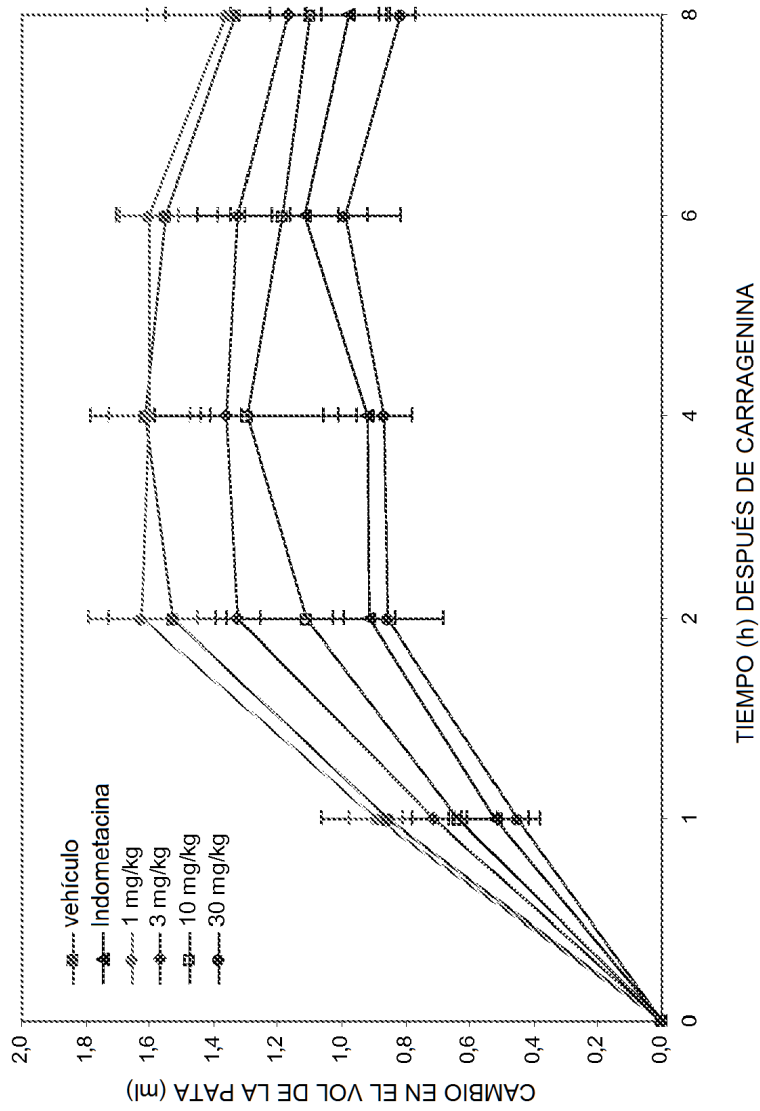


FIGURA 14