

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 835 383**

51 Int. Cl.:

C07K 16/40	(2006.01)	A61P 25/00	(2006.01)	A61P 35/02	(2006.01)
A61P 1/00	(2006.01)	A61P 29/00	(2006.01)	A61K 39/00	(2006.01)
A61P 1/04	(2006.01)	A61P 31/04	(2006.01)		
A61P 1/16	(2006.01)	A61P 33/00	(2006.01)		
A61P 9/10	(2006.01)	A61P 37/06	(2006.01)		
A61P 11/00	(2006.01)	A61P 43/00	(2006.01)		
A61P 13/12	(2006.01)	A61P 25/14	(2006.01)		
A61P 17/02	(2006.01)	A61P 25/16	(2006.01)		
A61P 17/06	(2006.01)	A61P 25/28	(2006.01)		
A61P 21/02	(2006.01)	A61P 25/30	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.05.2013** **E 19163818 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.10.2020** **EP 3521315**

54 Título: **Anticuerpos anti-transglutaminasa 2**

30 Prioridad:

24.05.2012 GB 201209096

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.06.2021

73 Titular/es:

LIFEARC (100.0%)
7th Floor Lynton House 7-12 Tavistock Square
London, Greater London WC1H 9LT, GB

72 Inventor/es:

JOHNSON, TIM;
WATSON, PHIL;
MATTHEWS, DAVID y
BROWN, ALEX

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 835 383 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-transglutaminasa 2

5 La presente invención se refiere a inhibidores de TG2 y a métodos para proporcionar y usar dichos inhibidores.

La transglutaminasa tipo 2 (TG2; también conocida como transglutaminasa tisular, Tgt) es parte de la familia de las transglutaminasas de 9 miembros más amplia que incluye el factor XIIIa, que es crítico para la coagulación de la sangre, así como la transglutaminasa de queratinocitos (TG1) y la transglutaminasa epidérmica (TG3) que participan en la diferenciación terminal del queratinocito. Además, existen otros miembros de la familia de TG tales como TG tipos 4 a 7 donde no se ha identificado función definitiva hasta la fecha.

TG2 funciona principalmente como enzima de reticulación de proteínas catalizando la formación de enlaces isodipeptídicos de $\epsilon(\gamma\text{-glutamil})\text{lisina}$. La elevada expresión de TG2 conduce a la reticulación aberrante de proteínas, que se ha asociado a varias patologías que incluyen diversos tipos de cicatrización de tejido, formación de ovillos neurofibrilares en varios trastornos del cerebro y resistencia a quimioterapia en algunos cánceres. TG2 también es capaz de desamidar proteínas. TG2 desamida gliadina y el complejo TG2/gliadina es el autoantígeno primario en celiaquía. Además, TG2 tiene una función de unión a GTP y puede actuar de GTPasa, aunque ésta no se ha asociado a una función patológica.

La elevada actividad de TG2 se asocia principalmente a cicatrización anormal [1] que conduce a fibrosis hepática [2], pulmonar [3], del corazón [4] y renal, [5], así como a aterosclerosis [6]. El proceso de cicatrización y fibrosis se asocia al aumento de síntesis y, lo que es más importante, la elevada exportación de TG2 al espacio intersticial. Una vez fuera de la célula, TG2 es capaz de reticular proteínas de la matriz extracelular (ECM) tales como fibronectina y colágeno [7] por la incorporación de un enlace dipeptídico de $\epsilon(\gamma\text{-glutamil})\text{lisina}$ [8]. Los estudios han mostrado que esto puede acelerar la deposición de componentes de ECM disponibles, mientras que al mismo tiempo confiere resistencia a la eliminación proteolítica por el sistema de la metaloproteínasa de matriz (MMP) [9, 10]. Tomado conjuntamente, esto provoca una acumulación de proteínas de ECM y así tejido cicatricial [9]. Además, TG2 tiene una función emergente en la activación de TGF- β 1 latente en el proceso de cicatrización [11] y también se ha asociado a las vías de activación de interleucina-6 [12] y del factor de necrosis tumoral α [13].

La inhibición de TG2 *in vitro* disminuye los niveles de matriz extracelular [14], mientras que las células derivadas de ratones inactivados en TG2 tienen niveles más bajos de ECM madura [9]. La aplicación *in vivo* de inhibidores de pan TG en modelos de enfermedad renal crónica reducen el desarrollo de glomeruloesclerosis y fibrosis tubulointersticial, preservando la función renal [15, 16].

Se observan beneficios similares en el ratón inactivado en TG2 sometido a obstrucción uretérica unilateral [17].

Existen varias enfermedades neurodegenerativas caracterizadas por la presencia de agregados de proteína en la región degenerativa del cerebro en las que TG2 participa en su formación. La mejor caracterizada es la corea de Huntington. La proteína de Huntington (htt) contiene repeticiones de poliglutamina expandidas en su dominio de extremo N. Ninguna htt mutante contiene menos de 35 glutaminas consecutivas, mientras que la htt relacionada con la enfermedad normalmente tiene más de 40 glutaminas consecutivas que hace que sea un sustrato excelente de TG2. Posteriormente, se forman agregados insolubles en el estriado y la corteza de pacientes con enfermedad de Huntington. La frecuencia de agregados se correlaciona bien con la gravedad de la enfermedad.

La enfermedad de Alzheimer se tipifica por la presencia de placas seniles extracelulares compuestas de proteína β amiloide agregada y ovillos neurofibrilares intracelulares que consisten en una forma altamente fosforilada de la proteína tau. Estas placas contienen grandes cantidades de enlaces isodipeptídicos de $\epsilon(\gamma\text{-glutamil})\text{lisina}$.

Finalmente, un distintivo de la enfermedad de Parkinson es la presencia de agregados de alfa-sinucleína llamados cuerpos de Lewy en el citoplasma de las neuronas afectadas, que nuevamente contienen enlaces isodipeptídicos de $\epsilon(\gamma\text{-glutamil})\text{lisina}$. Todas las proteínas anteriormente mencionadas son buenos sustratos de TG2 *in vitro*. Además, la región del cerebro afectada contiene mayores niveles de proteína TG2 que las regiones no afectadas del cerebro en los mismos pacientes. La correlación entre la especificidad por sustrato de TG2 por proteínas agregadas relevantes para la enfermedad y los elevados niveles de expresión de TG2 sugieren una función para TG2 enzimáticamente activa en cada enfermedad.

Se ha mostrado que los inhibidores de TG ejercen efectos terapéuticos en múltiples modelos biológicos de enfermedades neurodegenerativas. En un modelo de cultivo celular de enfermedad de Parkinson que transfecta células COS-7 con alfa-sinucleína y TG2 simultáneamente, agregados covalentes de sinucleína, reminiscentes de cuerpos de Lewy en enfermedad de Parkinson, forman y dependen de TG2 enzimáticamente activa puesto que el mutante de TG2 inactivo C277S dejó de inducir la formación de agregados. El tratamiento de estas células cotransfectadas con cistamina redujo significativamente la cantidad de agregados de alfa-sinucleína, así como el porcentaje de células que contenían los agregados. Ha habido otros dos informes en los que proteínas con longitud normal y proteínas de repetición de poliglutamina expandida, representativas de enfermedades de CAG expandida,

tales como enfermedad de Huntington, se han transfectado en líneas celulares y mostrado que forman agregados. El tratamiento de estas líneas celulares con el inhibidor competitivo de TG monodansilcadaverina condujo a una disminución en la fragmentación nuclear, mientras que el tratamiento con cistamina conduce a tanto una disminución en la fragmentación nuclear como una disminución en la formación de agregados de proteína. Un ejemplo de un inhibidor de pan TG es cloruro de 1,3-dimetil-2-[(2-oxo-propil)tio]imidazolio, que está disponible de Zedira GmbH y se menciona en varias publicaciones como NTU283 o r283.

La cistamina tiene un beneficioso efecto terapéutico *in vivo* cuando se dosifica en modelos de ratón de enfermedad de Huntington. Los ratones R6/2 de Huntington dosificados con cistamina mostraron función motora mejorada, pérdida de peso menos grave y elevada supervivencia en comparación con controles no tratados. Y, lo que es más importante, la actividad de TG2 *ex vivo* en homogeneizados de cerebro fue más baja después de la dosificación con cistamina al menos 60 min después de la inyección. En un modelo de ratón diferente de enfermedad de Huntington, la cepa YAC128, la cistamina fue capaz de disminuir el nivel de atrofia estriatal, pero incapaz de mejorar el peso o la función motora del animal, que indica un efecto beneficioso de la cistamina a nivel celular y tisular, pero no en los síntomas de la enfermedad.

Probablemente, la evidencia más convincente de que el beneficioso efecto terapéutico de la cistamina en ratones de Huntington es independiente de la inhibición de TG2 ha procedido de cruzar el ratón de Huntington R6/2 con el ratón inactivado en TG2 para crear una cepa susceptible a la neurodegeneración en ausencia de TG2. Cuando los ratones R6/2 TG2^{-/-} se trataron con cistamina, la mejora de la función motora y el aumento de la esperanza de vida no fueron estadísticamente diferentes de la mejora observada en ratones R6/2 TG2^{+/+} tratados con cistamina. Además, los ratones R6/1 y R6/2 TG2^{-/-} tuvieron niveles elevados de agregados de proteína neuronal en comparación con los ratones R6/1 y R6/2 TG2^{+/+}, que sugiere un mecanismo de agregación de proteínas independiente de la actividad de transamidación de TG2 en estos modelos. Sin embargo, es de notar que los ratones R6/2 TG2^{-/-} mostraron un retraso en la aparición de disfunción motora y supervivencia mejorada en comparación con los ratones R6/2 TG2^{+/+}, que implica una función para TG2 en la patogénesis de la neurodegeneración en el modelo R6/2.

TG2 también está fuertemente implicado en celiaquía, que afecta a 1 de cada 100 personas en Europa occidental. La celiaquía es un trastorno inflamatorio del intestino delgado mediado por linfocitos T causado por una clase de proteínas llamadas prolaminas encontradas en trigo, cebada y centeno. El alto contenido de prolina y glutamina de estas proteínas las hace resistentes a las proteasas naturales gástricas, pancreáticas e intestinales, y las peptidasas durante la digestión. Los fragmentos de péptido resultantes siguen sin ser bien digeridos en el intestino delgado y acceden a la lámina propia intestinal donde, después de la modificación por TG2, pueden estimular una respuesta inmunitaria de linfocitos T que conduce a inflamación y destrucción de la arquitectura intestinal. TG2 intestinal desamida los restos de glutamina específicos en los péptidos de prolamina dando restos de glutamato. En individuos HLA-DQ2/8, estos péptidos modificados se presentan a linfocitos T autorreactivos correspondientes por moléculas de MHC clase II. Aunque las prolaminas tienen un alto contenido de glutamina (alrededor 30-35 %), solo algunos de estos restos de glutamina son elegidos como diana por TG2 humana. Una excelente correlación entre especificidad por sustrato de TG2, afinidad de unión a DQ2 y potencial estimulante de linfocitos T de prolaminas tratadas con TG2 sugiere fuertemente que la desamidación de péptidos está mediada por TG2 y desempeña una función significativa en determinar la gravedad de enfermedad. Además, los pacientes celíacos generan una autorrespuesta de anticuerpos a complejos de TG2-gliadina. Estos anticuerpos anti-TG2 se encuentran en tanto el intestino delgado, donde se ha mostrado que se co-localizan con TG2 extracelular, y en la sangre, donde son explotados como un marcador de diagnóstico de enfermedad.

A pesar de la ausencia de modelos animales de celiaquía, experimentos *ex vivo* indican que la inhibición de TG2 tiene el potencial de beneficiar a pacientes con celiaquía. El cultivo de pequeñas biopsias intestinales de pacientes celíacos con ya fuera digestos de gluten tratados con TG2 (desamidados) o no tratados con TG2 (no desamidados) dieron ambos como resultado la generación de líneas de linfocitos T del paciente que reconocieron preferencialmente los péptidos de gluten desamidados en vez de los péptidos de gluten no desamidados. Además, el bloqueo de la actividad de TG2 endógena en las biopsias de celíacos con cistamina más de la mitad de las líneas de linfocitos T resultantes tuvo respuestas proliferativas reducidas en comparación con los controles tratados no con cistamina. Las líneas celulares no respondieron bien a los digestos no desamidados. Estos resultados implican que las poblaciones de linfocitos T sensibles al gluten en las biopsias intestinales de celíacos se desvían naturalmente hacia el reconocimiento de péptidos de gluten desamidados, a diferencia de péptidos no desamidados, que la actividad de TG2 endógena en estas biopsias puede dar como resultado la desamidación de péptidos de gluten *in situ* y que el tratamiento de biopsias de celíacos con inhibidores de TG2 puede reducir la respuesta proliferativa de linfocitos T reactivos con el gluten.

Otro estudio mostró que el inhibidor de pan-TG, el inhibidor de 2-[(2-oxopropil)tio]imidazolio, era capaz de prevenir la reticulación *in situ* de péptidos de gluten con proteínas endógenas en finas secciones de tejido tomadas tanto de pacientes con celiaquía como controles. Lo que es más importante, los autores mostraron que la incubación de pequeñas biopsias intestinales de celíacos intactas con 2-[(2-oxopropil)tio]imidazolio previno la activación de linfocitos T inducida por la forma no desamidada de un péptido de gluten inmunodominante. A diferencia, la inhibición de TG fue ineficaz en controlar la activación de linfocitos T cuando las biopsias se incubaron con la versión desamidada del mismo péptido. Estos resultados sugieren que la inhibición de TG2 endógena en biopsias de

pacientes celíacos puede prevenir la desamidación de péptidos de gluten y, por tanto, reducir la activación de linfocitos T.

Varias observaciones soportan la hipótesis de que TG2 desempeña una función en el desarrollo de ciertos tipos de cáncer. Múltiples estudios han mostrado que la proteína TG2 está regulada por incremento en tejido canceroso con respecto a tejido sano en cánceres tales como glioblastomas, melanomas malignos y adenocarcinomas ductales pancreáticos, por nombrar algunos. Se ha demostrado una correlación positiva entre la resistencia quimioterapéutica y el potencial metastásico de ciertos cánceres con niveles de expresión de TG2, mientras que en ciertos tipos de células se ha mostrado que TG2 ejerce efectos antiapoptóticos sobre las células, mientras que la regulación por disminución de ARNip de niveles de expresión de proteínas TG2 o el tratamiento con inhibidores de TG2 sensibiliza estas células a la apoptosis. Por otra parte, también hay informes de la regulación por disminución de la expresión de TG2 en ciertos tipos de cáncer [18]. Recientemente, se ha mostrado que TG2 es un componente de unión para GPR56, una proteína regulada por disminución en células cancerosas altamente metastásicas, sugiriendo que TG2 puede actuar como proteína supresora de tumores mediante su interacción con GPR56 [18].

Los actuales inhibidores de transglutaminasa se clasifican en 3 clases principales: 1) Inhibidores competitivos de amina (por ejemplo, cistamina y espermina) que compiten con los sustratos de amina natural; 2) inhibidores alostéricos reversibles, tales como GTP y una clase recientemente descubierta de compuesto con un esqueleto de acilhidrazida de tieno[2,3-d]pirimidin-4-ona; y 3) inhibidores irreversibles que incluyen derivados de 2-[(2-oxopropil)tio]imidazolio (acetilan la cisteína del sitio activo), 3-halo-4,5-dihidroisoxazoles (forman un iminotioéter estable en el sitio activo) y análogos de carbobenciloxi-L-glutaminilglicina con una variedad de restos reactivos insertados.

La mayoría se han usado en los sistemas experimentales anteriores y mostraron resultados beneficiosos. Sin embargo, ninguno de estos inhibidores muestra especificidad por isoformas de TG, ya que todos eligen como diana la tríada catalítica conservada dentro del núcleo catalítico de la familia de la transglutaminasa. Por consiguiente, todos tienen potencialmente la desventaja de co-inhibición del factor XIIIa, TG1 y TG3, que previene eficazmente su aplicación en enfermedad humana debido a los efectos secundarios que se pueden esperar.

El documento de patente WO 2006/100679 describe un anticuerpo anti-TG2 específico producido por tecnología recombinante de muestras recogidas de tres pacientes celíacos adultos con altos títulos de anticuerpos anti-TG2.

CUB7402 (ab2386) es un anticuerpo comercialmente disponible de Abcam.

Lai *et al.*, 2007; FASEB 21(14):4131-4143 describe la identificación de dos formas de GTP alternativamente cortadas y empalmadas independientes de transglutaminasa tisular en leucocitos humanos, músculo liso vascular y células endoteliales.

El documento de patente WO 2010/113025 describe el diagnóstico selectivo de enfermedades autoinmunitarias inducidas por el gluten por ensayos de unión que utilizan el principal epítipo celíaco presente en las proteínas de la familia de la transglutaminasa.

El documento de patente WO 02/068616 describe la transglutaminasa 6 como un indicador de diagnóstico de enfermedades autoinmunitarias.

Di Niro *et al.*, 2005; Biochem. J. 388(4): 889-894 describe la caracterización de epítopos de anticuerpos monoclonales mediante la presentación en fase de fragmentos de genes filtrados.

Di Niro *et al.*, 2007; BMC Biotechnology 7(46): 1-10 describe la construcción de minianticuerpos para el estudio *in vivo* de enfermedades autoinmunitarias humanas en modelos animales.

El documento de patente WO 2010/116196 describe el diagnóstico selectivo de enfermedades autoinmunitarias inducidas por el gluten por ensayos de unión que utilizan el principal epítipo celíaco presente en las proteínas de la familia de la transglutaminasa. El documento de patente documento WO 2010/116196 también describe el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias inducidas por el gluten que inhiben la unión de autoanticuerpos celíacos por compuestos terapéuticos.

Simon-Vescsei *et al.*, 2012; PNAS 109(2): 433-434 describen que un único epítipo conformacional de transglutaminasa 2, al que contribuyen tres dominios, es crítico para la unión y los efectos de anticuerpos en celíacos.

Sblattero *et al.*, 2002; EUR. J Biochem 269(12): 5177-5178 describen el análisis de la especificidad fina de los anticuerpos en la enfermedad celíaca utilizando fragmentos de transglutaminasa tisular.

Dada la asociación de TG2 con numerosos estados de enfermedad y datos convincentes de inhibidores no específicos, existe una necesidad de inhibidores de TG2 altamente selectivos y de alta eficacia con efectos

inespecíficos mínimos.

El listado o la discusión de un documento aparentemente previamente publicado en esta memoria descriptiva no debe ser considerado necesariamente como un reconocimiento de que el documento sea parte del estado de la técnica o sea conocimiento general común.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une selectivamente a un epítipo dentro de la región de núcleo de transglutaminasa tipo 2 (TG2) humana e inhibe la actividad de la TG2 humana, en donde dicha región de núcleo consiste en los aminoácidos 143 a 473 de la TG2 humana, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une selectivamente a la región que comprende los aminoácidos 304 a 326 de la TG2 humana, y en donde la actividad de la TG2 humana que se inhibe es la reticulación por TG2 de lisina y glutamina con enlaces isozeptídicos de Nε(γ-glutamil)lisina.

En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo no inhibe la actividad de TG1, TG3, TG13 y/o TG7. En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo: a. comprende o consiste en un anticuerpo intacto, o b. comprende o consiste en un fragmento de unión a antígeno seleccionado del grupo que consiste en: un fragmento Fv (por ejemplo, un fragmento Fv monocatenario o un fragmento Fv unido por disulfuro); un fragmento Fab y un fragmento de tipo Fab (por ejemplo, un fragmento Fab' o un fragmento F(ab)₂).

En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une al mismo epítipo que un anticuerpo que comprende las siguientes secuencias de CDR:

KASQDINSYLT (LCDRI);
RTNRLFD (LCDR2);
LQYDDFPYT (LCDR3);
SSAMS (HCDR1);
TISVGGGKTYYPDSVKG (HCDR2); y
LISLY (HCDR3).

En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo compite con y rompe la unión de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que tiene una región variable de la cadena ligera seleccionada de las siguientes secuencias:

DIQMTQTPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLF
DGVPSRFSGSGSGQDFFLTISSELEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGKLEIK;

DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLF
DGVPSRFSGSGSGQDFFLTISSELEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGKLEIK;

EIVLTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLF
DGVPSRFSGSGSGQDFFLTISSELEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGKLEIK;

DIQMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLF
DGVPSRFSGSGSGQDFFLTISSELEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGKLEIK;

EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLTWYQQKPGKAPKLLIYRTNRLF
DGVPSRFSGSGSGTDFFTISSLPEDFGTYCLQYDDFPYTFGGGKLEIK;

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKAPKSLIYRTNRLF
DGVPSRFSGSGSGTDFFTISSLPEDFATYYCLQYDDFPYTFGGGKVEIK;

AIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYLTNRLM
DGVPSRFSGSGSGQEFLTISGLEHEDMGIYYCLQYVDFPYTFGGGKLEIK;

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKAPKSLIYLTNRLM
DGVPSRFSGSGSGTDFFTISSLPEDFATYYCLQYVDFPYTFGGGKVEIK;

DIKMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKAPKTLIYLTNRLM
DGVPSRFSGSGSGQEFLTISLPEDFATYYCLQYVDFPYTFGGGKVEIK;

DITMTQSPSSIYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKILIYLVNRLVD
GVPSRFSGSGSGQDYALTISSELEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGKLEIK;

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKAPKSLIYLVNRLV

DGVPSRFSGSGSGTDFFLTISSLQPEDFATYYCLQYDDFPYTFGQGTKVEIK;

DITMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDINSYLTWFQQKPGKAPKILIYLVNRLVD
GVPSRFSGSGSGQDYALTISSLQPEDFATYYCLQYDDFPYTFGQGTKVEIK; y

5

una región variable de la cadena pesada seleccionada de las siguientes secuencias:

EVQLEESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTLSSSAMSWSVRQTPDRRLEWVATISV
GGGKTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRSEDTAMYYCAKLISLYWGQGTTLT VSS;

10

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTLSSSAMSWSVRQTPDRRLEWVATISV
GGGKTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRSEDTAMYYCAKLISLYWGQGTTLT VSS;

15

EVQLQESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTLSSSAMSWSVRQTPDRRLEWVATISV
GGGKTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRSEDTAMYYCAKLISLYWGQGTTLT VSS;

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSAMSWSVRQAPGKGLEWVSTIS
VGGGKTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLISLYWGQGTTLT VSS;

20

AVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGIIFSSSAMSWSVRQTPEKRLEWVATISSG
GRSTYYPDSVKGRFTVSRDSAKNTLYLQMDSLRSEDTAIIYYCAKLISPYWGQGTTLTVS S;

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSAMSWSVRQAPGKGLEWVSTIS
SGGRSTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLISPYWGQGTTLV TVSS;

25

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIIFSSSAMSWSVRQAPGKGLEWVATISS
GGRSTYYPDSVKGRFTVSRDSSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLISPYWGQGTTLT VSS;

30

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTLSTHAMSWSVRQTPEKRLEWVATISS
GGRSTYYPDSVKGRFTISRDNVKNNTLYLQLSSLRSEDTAVYFCARLISTYWGQGTTLTV SS;

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTHAMSWSVRQAPGKGLEWVSTIS
SGGRSTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLISYWGQGTTLT VSS;

35

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSTHAMSWSVRQAPGKGLEWVATISS
GGRSTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARLISTYWGQGTTLTV SS.

En una realización, la unión del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo a TG2 humana se inhibe o reduce cuando un anticuerpo que tiene una región variable de la cadena ligera se selecciona de las siguientes secuencias:

40

DIQMTQTPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLF
DGVPSRFSGSGSGQDFFLTISSEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGKLEIK;

45

DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLF
DGVPSRFSGSGSGQDFFLTISSEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGKLEIK;

EIVLTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLF
DGVPSRFSGSGSGQDFFLTISSEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGKLEIK;

50

DIQMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLF
DGVPSRFSGSGSGQDFFLTISSEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGKLEIK;

55

EIVLTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDINSYLTWFQQKPGKAPKLLIYRTNRLF
DGVPSRFSGSGSGTDFFLTISSLQPEDFGTYCLQYDDFPYTFGGGKLEIK;

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDINSYLTWFQQKPGKAPKSLIYRTNRLF
DGVPSRFSGSGSGTDFFLTISSLQPEDFATYYCLQYDDFPYTFGQGTKVEIK;

60

AIKMTQSPSSMYASLGERVIITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYLTNRLM
DGVPSRFSGSGSGQEFLTISGLEHEDMGIYYCLQYVDFPYTFGGGKLEIK;

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDINSYLTWFQQKPGKAPKSLIYLTNRLM
DGVPSRFSGSGSGTDFFLTISSLQPEDFATYYCLQYVDFPYTFGQGTKVEIK;

65

DIKMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDINSYLTWFQQKPGKAPKTLIYLTNRLM

DGVPSRFSGSGSGQEFLLTISSLQPEDFATYYCLQYVDFPYTFGQGTKVEIK;

DITMTQSPSSIASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKILIYLVNRLVD
GVPSRFSGSGSGQDYALTISLSEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGTKLEIK;

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKAPKSLIYLVNRLV
DGVPSRFSGSGSGTDFLTISSSLQPEDFATYYCLQYDDFPYTFGQGTKVEIK;

DITMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKAPKILIYLVNRLVD
GVPSRFSGSGSGQDYALTISLQPEDFATYYCLQYDDFPYTFGQGTKVEIK; y

una región variable de la cadena pesada seleccionada de las siguientes secuencias:

EVQLEESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTLSSSAMSWVRQTPDRRLEWVATISV
GGGKTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRSEDAMYYCAKLISLYWGQGTTLT VSS;

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTLSSSAMSWVRQTPDRRLEWVATISV
GGGKTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRSEDAMYYCAKLISLYWGQGTTLT VSS;

EVQLQESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTLSSSAMSWVRQTPDRRLEWVATISV
GGGKTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRSEDAMYYCAKLISLYWGQGTTLT VSS;

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSAMSWVRQAPGKGLEWVSTIS
VGGGKTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLISLYWGQGTLTV VSS;

AVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGIIFSSSAMSWVRQTPEKRLEWVATISSG
GRSTYYPDSVKGRFTVSRDSKNTLYLQMDSLRSEDATYYCAKLISPYWGQGTTLTVS S;

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSAMSWVRQAPGKGLEWVSTIS
SGGRSTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLISPYWGQGTLV TVSS;

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIIFSSSAMSWVRQAPGKGLEWVATISS
GGRSTYYPDSVKGRFTVSRDSSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLISPYWGQGTLTV VSS;

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTLSTHAMS WVRQTPEKRLEWVATISS
GGRSTYYPDSVKGRFTISRDNVKNNTLYLQLSSLRSEDATVYFCARLISTYWGQGTTLTV SS;

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTHAMS WVRQAPGKGLEWVSTIS
SGGRSTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLISPYWGQGTLTV VSS;

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSTHAMS WVRQAPGKGLEWVATISS
GGRSTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARLISTYWGQGTLTVV SS se une a TG2 humana.

La presente invención también proporciona un polinucleótido que codifica un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de la presente invención.

Además, la presente invención proporciona un compuesto que comprende un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención y un resto adicional, por ejemplo un resto fácilmente detectable, y/o un resto directamente o indirectamente citotóxico.

La presente invención también proporciona una composición/formulación farmacéutica que comprende un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de la presente invención, o un polinucleótido de la presente invención, o un compuesto de la presente invención, en mezcla con un excipiente, adyuvante, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable, que comprende opcionalmente además uno o más principios activos adicionales, preferentemente en donde la composición/formulación se formula para administración intravenosa, intramuscular o subcutánea a un paciente.

La presente invención también proporciona un kit de partes que comprende un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de la presente invención, o un polinucleótido de la presente invención, o un compuesto de la presente invención; y un agente adicional.

La presente invención también proporciona un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de la presente invención, o un polinucleótido de la presente invención, o un compuesto de la presente invención, para su uso en medicina.

Además, la presente invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de la presente invención, o un polinucleótido de la presente invención, o un compuesto de la presente invención, para su uso en el tratamiento y/o diagnóstico de celiaquía, curación anormal de heridas, cicatrización, cicatrices hipertróficas, cicatrización ocular, enfermedad inflamatoria del intestino, degeneración macular, psoriasis, enfermedades relacionadas con la fibrosis (por ejemplo, fibrosis hepática, fibrosis pulmonar tal como enfermedad pulmonar intersticial y enfermedad pulmonar fibrótica, fibrosis cardíaca, mielofibrosis, fibrosis renal tal como glomeruloesclerosis y fibrosis tubulointersticial), aterosclerosis, reestenosis, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades neurodegenerativas/neurológicas (por ejemplo, enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad por poliglutaminas, atrofia muscular espinobulbar, atrofia dentato-rubro-pálido-luisiana, ataxias espinocerebelosas 1, 2, 3, 6, 7 y 12, atrofia rubropálida, parálisis espinocerebelosa), glioblastomas tales como glioblastoma en síndrome de Li-Fraumeni y glioblastoma esporádico, melanomas malignos, adenocarcinomas ductales pancreáticos, leucemia mieloide, leucemia mielógena aguda, síndrome mielodisplásico, síndrome mieloproliferativo, cáncer ginecológico, sarcoma de Kaposi, enfermedad de Hansen y/o colitis colagena.

La presente invención también proporciona un método de producción de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, comprendiendo el método aislar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de una muestra *ex vivo* obtenida de un animal no humano que se inmunizó previamente usando:

a) un compuesto que comprende:

i) una secuencia de polipéptido que consiste en la secuencia de polipéptido de los aminoácidos 143 a 473 del TG2 humana, o

ii) una secuencia de polipéptido que consiste en los aminoácidos 304 a 326 de TG2 humana; y,

b) opcionalmente un adyuvante;

y en donde el método comprende además la etapa de seleccionar un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo basándose en su unión selectiva a la región que comprende los aminoácidos 304 a 326 de la TG2 humana en la TG2 y de su inhibición de la actividad de la TG2 humana, en donde la actividad de la TG2 que se inhibe es la reticulación por TG2 de lisina y glutamina con enlaces isopeptídicos de Nε(γ-glutamil)lisina.

Descripción detallada

La presente invención proporciona un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo que se une selectivamente a un epítipo dentro de la región de núcleo de transglutaminasa tipo 2 humana (TG2).

Se prevé que un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo descrito en el presente documento se puede unir selectivamente a un epítipo dentro de la región de núcleo de TG2 humana, TG2 de rata y/o TG2 de ratón.

Las secuencias de aminoácidos completas de TG2 humana, de rata y de ratón se pueden encontrar con los números de acceso de GenBank NM_004613, NM_019386.2 y NM_009373.3. La parte codificante de estas secuencias son del siguiente modo:

Secuencia de nucleótidos de TG2 humana:

atggccgaggagctggtcttagagaggtgtgatctggagctggagaccaatggccgagaccacca
cacggccgacctgtgccgggagaagctggtggtgcgacggggccagcccttctggctgacctgc
actttgaggggccgcaactacgaggccagtgtagacagtctcaccttcagtgtcgtgaccggccca
gcccctagccaggaggccgggaccaaggcccggttttccactaagagatgctgtggaggagggtga
ctggacagccaccgtggtggaccagcaagactgcaccctctcgtgcagctcaccaccccgcca
acgcccccatcggcctgtatcgccctcagcctggaggcctccactggctaccagggatccagcttt
gtgctggggccacttcattttgctcttcaacgcctggtgccagcggtgctgtgtacctggactc
ggaagaggagcggcaggagtatgtcctcaccagcagggctttatctaccagggtcggccaagt
tcatcaagaacataccttggaattttgggcagtttgaagatgggatcctagacatctgcctgatc
cttctagatgtcaaccccaagttcctgaagaacgccggccgtgactgctcccgccgacgagccc
cgtctacgtgggcccgggtggtgagtggcatggtcaactgcaacgatgaccagggtgtgctgctgg
gacgctgggacaacaactacggggacggcgctcagccccatgtcctggatcggcagcgtggacatc
ctgcgggcgctggaagaaccacggctgccagcgcgctcaagtatggccagtgtggttctcgccgc
cgtggcctgcacagtgtgaggtgcctgggcatccctaccgcgctcgtgaccaactacaactcgg
cccatgaccagaacagcaaccttctcatcgagtacttccgcaatgagtttggggagatccagggt
gacaagagcgagatgatctggaacttccactgctgggtggagtgcgtggatgaccaggccggacct
gcagccggggtacgagggtggtcaggccctggacccaacgccccaggagaagagcgaaggacgt
actgctgtggcccagttccagttcgtgccatcaaggaggcgacctgagcaccaagtacgatgcg
ccctttgtctttgcgagggtcaatgccgacgtggttagactggatccagcaggacgatgggtctgt
gcacaaatccatcaaccgttccctgatcgttgggctgaagatcagcactaagagcgtgggcccag
acgagcgggaggatataccacacactacaaataccagagggtcctcagaggagaggaggcc
ttcacaagggggaaccacctgaacaaactggccgagaaggaggagacagggatggccatgcggat
ccgtgtgggcccagagcatgaacatgggcagtgactttgacgtctttgccacatcaccaacaaca
ccgctgaggagtacgtctgccgcctcctgctctgtgccgcaccgtcagctacaatgggatcttg
gggcccagagtgtggcaccaagtacctgctcaacctcaacctggagcctttctctgagaagagcgt
tcctctttgcatcctctatgagaaataccgtgactgccttacggagtccaacctcatcaagggtgc
gggcccctcctcgtggagccagttatcaacagctacctgctggctgagaggacaccttacctggag
aatccagaaatcaagatccggatccttggggagcccaagcagaaacgcaagctggtggctgaggt
gtccctgcagaaccgcctcctgtggccctggaaggctgcacctcactgtggaggggggcccggcc
tgactgaggagcagaagacgggtggagatccagaccccgctggaggcagggggaggaagttaagggtg
agaatggacctgctgccgctccacatgggcctccacaagctggtggtgaacttcgagagcgacaa
gctgaaggctgtgaagggttccggaatgtcatcattggccccgcctaa

Secuencia de aminoácidos de TG2 humana:

MAEELVLERCDLELETNGRDHHTADLCREKLVVRGQPFWLTLHFEGRNYEASVDSLTF
VVTGPAPSQEAGTKARFPLRDAVEEGDWTATVVDQDCTLSLQLTTPANAPIGLYRLSLE
ASTGYQGSSFVLGHFILLFNAWCPADAVYLDSEERQEYVLTQQGFIYQGSAKFIKNI PW
NFGQFEDGILDICLILLDVNPKFLKNAGRDCSRRSSPVYVGRVVS GMVNCNDDQGVLLGR
WDNNYGDGVSPMSWIGSVDILRRWKNHGCQRVKYGCWVF AAVACTVLRCLGIPTRVVTN
YNSAHDQNSNLLIEYFRNEFGELIQGDKSEMIWNFHCWVESWMTRPDLQPGYEGWQALDPT
PQEKSEGTYCCGPVPVRAIKEGDLSTKYDAPFVFAEVNADVVDWIQDDGSVHKSINRSL
IVGLKISTKSVGRDEREDITHYKYPEGSSSEEREAFTRANHLNKLAEKEETGMAMRIRVG
QSMNMGSDFDVFAHITNNTAEYVCRLLLCARTVSYNGILGPECCTKYLLNLNLEPFSEK
SVPLCILYEKYRDCLTESNLIKVRALLVEPVINSYLLAERDLYLENPEIKIRILGEPKQK
RKLVAEVS LQNPLPVALEGCTFTVEGAGLTEEQKTVEIPDPVEAGEEVKVRMDLLPLHMG
LHKLNVNFESDKLKAVKGFRNVIIGPA*

5

Secuencia de nucleótidos de TG2 de rata:

Atggccgaggagctgaacctggagaggtgcgatttgagatacaggccaatggccgtgatcacca
cacggccgacctgtgccaagagaaactgggtgctgcggcgaggccagcgcttccggctgacactgt
acttcgagggccgtggctatgagggcagcggtggacagacttacatttggtgccgtgaccggccca
gatcccagtgagagggcagggaccaaggcccgcttctcactgtctgacgatgtggaggagggatc
ctggtcagcctctgtgctggaccaacaggacaatgtcctctcgtgacgctctgcaccccagcca
atgctcctgttggtccagtagccgctcagcctggagacttctactggctaccaaggctccagcttc
atgctgggtcacttcatcctgctcttcaatgcctgggtgccagcggtgacgtgtacctagattc
agaggcggagcgccgggaatacgtcctcacacagcagggcttcatctaccagggctctgtcaagt
tcatcaagagtggtgccttggaactttgggcagtttgaggatgggatcctggatgcctgcctgatg
cttttggtatgtgaaccccaagttcctgaaggaccgtagccgggactgctcacgacgcagcagtc
catctatgtgggcccgtgggtgagcggcatggtcaactgcaatgatgaccaggggtgtgcttctgg
gtcgtgggacaacaattatggggacggtatcagtcctatggcctggattggcagcgtggacatt
ctgcggcgtggaaggaacacggctgtcagcaagtgaagtatggccagtgctgggtgtttgcggc
ggtagcctgcacagtgctgcggtgccttggtatccctaccagagtggtgaccaactacaactccg
cccacgaccagaacagcaacctgctcatcgagtacttccgaaacgagtacggggagctggagagc
aacaagagcgagatgatctggaatttccactgctgggtggagtcctggatgaccagggcagacct
acagccaggctatgaggggtggcaggccattgacccacaccgcaggagaagagcgaaggaacat
actgttggtggccagtcctcagtgcgggccatcaaggaggggtgacctgagcaccaagtatgatgcg
tccttcgtgtttgcccaggtcaacgctgatgtgggtggactggatccggcagtcagatgggtctgt
gctcaaattccatcaacaattccctgggtcgtggggcagaagatcagcactaagagcgtgggcccgtg
atgaccgggaggacatcacctatacctacaagtaccagaggggtcccagaggagaggggaagtc
ttcaccagagccaaccacctgaacaaactggcagagaaagaggagacaggggtggccatgcggat
ccgagtgggggatgggtatgagcttgggcaatgactttgacgtgtttgccacatcggaacgaca
cctcggagagccgtgagtgccgcctcctgctctgtgcccgcactgtcagctacaacggcgtgctg
gggcccagtggtggcactgaggacatcaacctgacctggatccctactctgagaacagcatccc
ccttcgcacctctacgagaagtacagcgggtgctgacctgagtcacacctcatcaaggtgcggg
gtctcctcgtcgagccagccgctaacagctacctgctggctgagagagatctctacctggagaat
cctgaaatcaagatccggatcctgggggagcccaagcagaaccgcaaactgggtggctgaggtgtc
cctgaagaaccactttctgattccctgtatgactgtgtcttactgtggagggggctggcctga
ccaaggaacagaagtctgtggaggtctcagacctgtgccagcaggagatgcgggtcaaggtgcgg
gttgacctgttcccgaactgatattggcctccacaagttggtgggtgaacttccagtgtagaagct
gaagtcgggtcaaggggtaccggaatatcatcatcggcccgccctaag

Secuencia de aminoácidos de TG2 de rata:

MAEELNLERCDLEIQANGRDHHTADLCQEKLVLRGQRFRLTLYFEGRGYEASVDRLTFG
AVTGPDPSEEAGTKARFSLSDVEEGSWSASVLDQQDNVLSLQLCTPANAPVGQYRLSLE
TSTGYQGSSFMLGHFILLFNAWCPADDVYLDSEAERREYVLTQQGFIYQGSVKFIKSVPW
NFGQFEDGILDACLMLLDVNPFLKDRSRDCSRSSPIYVGRVVS GMVNCNDDQGVLLGR
5 WDNNGYDGI SPMAWIGSVDILRRWKEHGCQQVKYGCWVF AAVACTVLRCLGI PTRVVTN
YNSAHDQNSNLLIEYFRNEYGELESNKSEMIWNFHCWVESWMTRPDLQPGYEGWQAI DPT
PQEKSEGT YCCGPVSVRAIKEGDLSTKYDAS FVFAEVNADVVDWIRQSDGSVLKSINNSL
VVGQKISTKSVGRDDREDITYTYKYPEGSPEEREVFTRANHLNKLAEKEETGVAMRIRVG
DGMSLGND FDFVFAHIGNDTSESRECRLLL CARTVSYNGVLGPECGTEDINLTLDPYSENS
IPLRILY EKYS GCLTESNLIKVRGLLVEPAANSYLLAERDLYLENPEIKIRILGEPKQNR
KLVAEVS LKNPLSDSLYDCVFTVEGAGLTKEQKSVEVSDPVPAGDAVKVRVDLFPTDIGL
HKLNVNFQCDKLKSVKGYRNIIIGPA*X

Secuencia de nucleótidos de TG2 de ratón:

atggcagaggagctgctcctggagaggtgtgatttggagattcaggccaatggccgtgaccacca
cacggccgacctatgccaagagaaactgggtgctgctgctggtcagcgcttccggctgactctgt
acttcgagggccgtggctacgagggcagcggtggacagcctcacgttcgggtgctgtgaccggccca
gatcccagtgaaagaggcagggaccaaggcccgcttctcactgtctgacaatgtggaggagggatc
ttggtcagcctcagtgtggtgaccaacaggacaatgtcctctcgctacagctctgcacccagcca
atgctcctattggcctgtaccgtctcagcctagaggcttctactggctaccagggtctccagcttt
gtgctggggccacttcatcctgctctacaatgcctgggtgccagccgatgatgtgtacctagactc
agaggaggagcgacgggaatatgtccttacgcaacagggttcatctaccaaggctctgtcaagt
tcatcaagagtgtgccttggaaactttgggcagttcgaggatggaatcctggatacctgcctgatg
ctcttggataatgaaccccaagttcctgaagaaccgtagtcgggactgctcacgccgcagcagtc
catctatgtgggcccgtggtgagcgccatggtcaactgcaatgatgaccagggtgtgcttctgg
gccgctgggacaacaactatggggatggtatcagtcctatggcctggattggcagtggtgacatt
ctgcggcgctggaaggaacacgggtgtcagcaagtgaagtacgggcagtgctgggtgtttgcagc
ggtggcctgcacagtgctgcggtgcctcggcatccctaccagagtgggtgaccaactacaactccg
cccacgaccagaacagcaacctgctcatcgagtacttccgaaatgagttcggggagctggagagc
aacaagagcgagatgatctggaacttccactgctgggtggagtccctggatgaccaggccagacct
acagccgggctatgaggggtggcaggccattgacccacaccacaggagaagagcgaaggacat
actgttgtggcccagtgctcagtgcgagccatcaaggaggagacctgagtaccaagtatgatgca
cccttcgtgtttgccgaggtcaacgctgatgtggtggactggatccggcaggaagatgggtctgt
gctcaaatccatcaaccgttcccttggctggtggggcagaagatcagcactaagagtgtgggcccgtg
atgaccgggaggacatcacccatacctacaagtacccagaggggtcacccgaggagagggaagtc
ttaccaaggccaaccacctgaacaaactggcagagaaagaggagacaggggtggccatgcgcat
ccgagtgggggacagtatgagcatgggcaacgacttcgacgtgtttgccacatcggcaacgaca
cctcggagactcgagagtgtcgtctcctgctctgtgcccgcactgtcagctacaacgggggtgctg
gggcccagtggtggcactgaggacatcaacctgacctggatccctactctgagaacagcatccc
acttcgaatcctctacgagaagtacagcgggtgcctgacagagtcaaacctcatcaaggtgcggg
gccttctcatcgaaccagctgccaacagctacctgctggctgagagagatctctacctggagaat
ccgaaatcaagatccgggtcctgggagaaccaagcaaaaccgcaaaactgggtggctgaggtgtc
cctgaagaacccactttccgatcccctgtatgactgcatcttactgtggagggggctggcctga
ccaaggagcagaagtctgtggaagtctcagacccgggtgccagcgggcgatttggtaaggcacgg
gtcgacctgttcccactgatattggcctccacaagctggtggtgaacttccagtggtgacaagct
gaagtcggtgaagggttaccggaatgttatcatcgcccgccctaa

Secuencia de aminoácidos de TG2 de ratón:

MAEELLLERCDELIQANGRDHHTADLCQEKLVLRGQRFRLTYFEGRGY
EASVDSLTFGAVTGPDPSEEAGTKARFSLSDNVEEGSWSASVLDQQDNVL
SLQLCTPANAPIGLYRLSLEASTGYQGSSFVLGHFILLYNWCPADDVYL
DSEERREYVLTQQGFIYQGSVKFIKSVPNWFGQFEDGILDTCLMLLDMN
PKFLKNRSRDCSRSSPIYVGRVVSAMVNCNDDQGVLLGRWDNNYGDGIS
PMAWIGSVDILRRWKEHGCQQVKYQCVFVAFAVACTVLRCLGIPTRVVTN
YNSAHDQNSNLLIEYFRNEFGELESNKSEMIWNFHCWVESWMTRPDLQPG
YEGWQAIDPTPQEKSEGTCCGPVSVRAIKEGDLSTKYDAPFVFAEVNAD
VVDWIRQEDGSVLKSINRSLVVGQKISTKSVGRDDREDITHYKYPEGSP
EEREVFTKANHLNKLAEKEETGVAMRIRVGDSMSMGNDFDVFAHIGNDTS
ETRECRLLL CARTVSYNGVLGPECGTEDINLTLPYSENSIPLRILYKEY
SGCLTESNLIKVRGLLIEPAANSYLLAERDLYLENPEIKIRVLGEPKQNR
KLVAEVSLKNPLSDPLYDCIFTVEGAGLTKEQKSVEVSDPVPAGDLVKAR

5

VDLFPTDIGLHKLNVNFQCDKLKSVKGYRNVIIGPA

Los presentes inventores han producido anticuerpos para TG2 inmunizando ratones con una proteína recombinante
que engloba los aminoácidos 143 a 473 del núcleo de TG2 humana. Se cribaron los hibridomas para la especificidad

10

e inhibición de TG2 con cualquier candidato adecuado clonado. Se purificó IgG a partir de estos para calcular la eficacia y se mapeó el epítipo diana cribando una biblioteca de TG2 humana por presentación en fagos.

El presente enfoque para producir anticuerpos contra TG2 usando una proteína de núcleo TG2 recombinante no se ha probado antes y condujo sorprendentemente al aislamiento y la caracterización de anticuerpos contra TG2 que fueron altamente selectivos para TG2 y mostraron fuertes características inhibitoras. Intentos previos para producir anticuerpos contra TG2 han conducido al aislamiento de anticuerpos relativamente no selectivos que reaccionan de forma cruzada con otros miembros de la familia de la transglutaminasa y así no representarían anticuerpos prometedores para uso clínico. Los anticuerpos de la presente invención, por otra parte, son candidatos prometedores para ensayos clínicos para enfermedades agravadas por o mediadas por actividad de TG2.

Es sorprendente que el enfoque en la presente solicitud haya conducido a la producción de anticuerpos muchos más eficaces que los previamente producidos. No hubo garantía de que hubiera sido posible producir anticuerpos que fueran inhibidores de TG2 eficaces inmunizando con la región de núcleo. Como se indica anteriormente, los anticuerpos que son inhibidores eficaces pueden no ser suficientemente específicos para TG2 como para ser usados eficazmente en medicina. Es sorprendente que los anticuerpos contra las regiones divergentes (en particular, regiones del núcleo que divergen ligeramente entre diferentes miembros de la familia de la transglutaminasa de TG2) sean inhibidores eficaces y selectivos de TG2.

Sin desear quedar ligado a teoría alguna, los presentes inventores creen que produciendo anticuerpos contra una proteína más pequeña que cubre solo el núcleo central, los presentes inventores no solo eliminan algunos de los epítipos inmunológicos favorecidos presentes sobre la proteína de longitud completa, sino que los presentes inventores también fuerzan al direccionamiento del núcleo. Esto parece aumentar la variedad de anticuerpos disponibles para la selección y proporciona una cobertura más amplia del núcleo.

El inmunizar con solo el núcleo de TG2 retiró mucha de la estructura terciaria de la enzima (en particular los dos dominios de barril beta del extremo carboxi). Es posible que algunos de los epítipos que quizás puedan estar menos disponibles o sean inmunogénicos dentro de una molécula de TG2 nativa de longitud completa puedan ser epítipos más atractivos con el núcleo en el formato descrito en el presente documento. Los anticuerpos descritos en el presente documento reconocieron epítipos lineales (es decir, unidos a TG2 en un gel reductor de SDS-PAGE), mientras que 80 % de los anticuerpos que aislaron previamente los presentes inventores usando TG2 de longitud completa como inmunógeno fueron dependientes de la conformación. Los presentes inventores fueron capaces de mostrar que el dominio de núcleo recombinante retuvo la actividad enzimática, y así el aislamiento de anticuerpos inhibidores estuvo probablemente ayudado por la exposición de epítipos previamente menos favorables localizados en o cerca del sitio activo. Es interesante y sorprendente que los anticuerpos inhibidores contra TG2 humana se produjeran inmunizando con el núcleo, dado que la proteína de núcleo recombinante puede no haber demostrado las mismas características de plegamiento que la proteína de longitud completa.

El núcleo catalítico de TG está altamente conservado entre miembros de la familia de TG y a través de especies. Esto sugiere que no solo puede ser técnicamente exigente el desarrollo de no solo inhibidores específicos de molécula pequeña, sino también de inhibidores basados en anticuerpos. Sin embargo, la presente divulgación proporciona anticuerpos que son altamente selectivos. Que esto sea posible puede reflejar el hecho de que existen algunas regiones dentro del dominio catalítico de TG2 donde existe cierta heterogeneidad. Los presentes anticuerpos pueden, por tanto, explotar estas pequeñas diferencias. La sorprendente selectividad de los presentes anticuerpos puede permitir el desarrollo de agentes terapéuticos que pueden interferir eficientemente con la actividad de TG2 y así proporcionar terapias posiblemente eficaces para afecciones agravadas por o causadas por la actividad de TG2 donde actualmente no existe opción terapéutica satisfactoria.

A modo de comparación, los anticuerpos descritos en el documento de patente WO 2006/100679, que se produjeron por tecnología recombinante de muestras de tres pacientes celíacos adultos con altos títulos de anticuerpos anti-TG2, demostraron ser de baja eficacia cuando se probaron por los presentes inventores (Ejemplo 2). Los anticuerpos de la presente invención fueron muy superiores a los del documento de patente WO 2006/100679 en términos de selectividad por TG2 y en términos de actividad inhibitora. Por ejemplo, los presentes inventores generaron un fragmento Fab del anticuerpo del documento de patente WO 2006/100679, que se aplicó a la misma concentración en ensayos de inhibición de TG2 que los anticuerpos de la presente invención. La cantidad de fragmento Fab de las pruebas fue dos veces en términos molares que la de los anticuerpos de la presente invención, pero aún dejaron de mostrar cualquier inhibición de actividad de TG2. Cuando se probó el anticuerpo de longitud completa del documento de patente WO 2006/100679 para la inhibición en el ensayo estándar de incorporación de putrescina de los presentes inventores, no se encontró inhibición de actividad de TG2. Así, los métodos de la presente invención, y los anticuerpos producidos por los métodos, son superiores a los previamente descritos.

Por "anticuerpo" los presentes inventores incluyen moléculas de anticuerpo sustancialmente intactas, así como anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos (en donde al menos un aminoácido está mutado con respecto a los anticuerpos humanos que existen de forma natural), anticuerpos monocatenarios, anticuerpos biespecíficos, cadenas pesadas del anticuerpo, cadenas ligeras del anticuerpo, homodímeros y heterodímeros de cadena pesadas y/o ligeras de anticuerpo, y fragmentos de unión al antígeno y derivados de los

mismos. Los presentes inventores también incluyen variantes, fusiones y derivados de los anticuerpos y sus fragmentos de unión al antígeno de los mismos dentro del significado de los términos "anticuerpo" y "fragmentos de unión al antígeno de los mismos".

- 5 El término "anticuerpo" también incluye todas las clases de anticuerpos, que incluyen IgG, IgA, IgM, IgD e IgE. Así, el anticuerpo puede ser una molécula IgG, tal como una molécula IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. Preferentemente, el anticuerpo de la invención es una molécula IgG, o un fragmento de unión al antígeno, o variante, fusión o derivado de la misma. Más preferentemente, el anticuerpo es una molécula IgG2.
- 10 Los anticuerpos, composiciones, usos y métodos descritos en el presente documento engloban variantes, fusiones y derivados de los anticuerpos definidos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos, así como fusiones de dichas variantes o derivados, siempre que dichas variantes, fusiones y derivados tengan especificidad de unión por TG2.
- 15 Como los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos comprenden uno o más componentes de polipéptido, variantes, fusiones y derivados del anticuerpo y fragmento de unión al antígeno del mismo como se define en el presente el documento, se pueden preparar usando los métodos de ingeniería de proteínas y mutagénesis dirigida al sitio bien conocidos en la técnica usando los polinucleótidos recombinantes (véase ejemplo, véase Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 3ª edición, Sambrook y Russell, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- 20

Así, se pueden preparar variantes, fusiones y derivados del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo como se define en el presente documento, basándose en el componente de polipéptido del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo.

- 25 Por "fusión" los presentes inventores incluyen dicho polipéptido fusionado con cualquier otro polipéptido. Por ejemplo, dicho polipéptido se puede fusionar con un polipéptido tal como glutatión-S-transferasa (GST) o proteína A para facilitar la purificación de dicho polipéptido. Los ejemplos de dichas fusiones se conocen bien por los expertos en la técnica. Similarmente, dicho polipéptido se puede fusionar con una marca de oligo-histidina tal como His6 o con un epítipo reconocido por un anticuerpo tal como el epítipo bien conocido Myc-tag. También se incluyen fusiones con cualquier variante o derivado de dicho polipéptido. Se apreciará que se prefieren las fusiones (o variantes o derivados de las mismas) que retienen propiedades deseables, tales como tener especificidad de unión por TG2.
- 30
- 35 La fusión puede comprender o consistir en una porción adicional que confiere una característica deseable a dicho polipéptido; por ejemplo, la porción puede ser útil en detectar o aislar el polipéptido, o promover la captación celular del polipéptido. La porción puede ser, por ejemplo, un resto de biotina, un resto radiactivo, un resto fluorescente, por ejemplo, un fluoróforo pequeño o un fluoróforo de proteína verde fluorescente (GFP), como bien se conoce por los expertos en la técnica. El resto puede ser una marca inmunogénica, por ejemplo, una marca Myc, como se conoce por los expertos en la técnica, o puede ser una molécula lipófila o dominio de polipéptido que es capaz de promover la captación celular del polipéptido, como se conoce por los expertos en la técnica.
- 40

- Por "variantes" de dicho polipéptido, los presentes inventores se refieren a un polipéptido en donde en una o más posiciones ha habido inserciones, deleciones y/o sustituciones de aminoácidos, ya sea conservativas o no conservativas, a condición de que dichos cambios den como resultado una proteína cuyas propiedades básicas, por ejemplo, propiedades de unión, termoestabilidad, actividad en un cierto intervalo de pH (estabilidad al pH) no han cambiado significativamente. "Significativamente" en este contexto significa que un experto en la materia diría que las propiedades de la variante pueden ser todavía diferentes, pero serían obvias con respecto a las de la proteína original. Así, los presentes inventores incluyen variantes del polipéptido donde dichos cambios no alteran sustancialmente la actividad de dicho polipéptido. En particular, los presentes inventores incluyen variantes del polipéptido donde dichos cambios no alteran sustancialmente la especificidad de unión por TG2.
- 45
- 50

Por "sustituciones conservativas" está previsto combinaciones tales como Gly, Ala; Val, Ile, Leu; Asp, Glu; Asn, Gln; Ser, Thr; Lys, Arg; y Phe, Tyr.

- 55 Dichas variantes se pueden preparar usando los métodos de ingeniería de proteínas y mutagénesis dirigida al sitio.

- La variante de polipéptido puede tener una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 % de identidad con una o más de las secuencias de aminoácidos dadas en el presente documento, por ejemplo, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % de identidad con una o más de las secuencias de aminoácidos especificadas en el presente documento.
- 60

- Se puede determinar el porcentaje de identidad de la secuencia entre dos polipéptidos usando programas informáticos adecuados, por ejemplo, el programa GAP del Grupo de Computación Genética de la Universidad de Wisconsin y se apreciará que el porcentaje de identidad se calcula en relación con los polipéptidos cuyas secuencias se han alineado óptimamente.
- 65

El alineamiento se puede llevar a cabo alternativamente usando el programa Clustal W (como se describe en Thompson *et al.*, 1994, Nucl. Acid Res. 22:4673-4680).

5 Los parámetros usados pueden ser del siguiente modo:

- Parámetros de alineamiento rápido por pares: tamaño K-tuple (palabra); 1, tamaño de ventana; 5, penalización por hueco; 3, número de diagonales superiores; 5. Método de puntuación: x porcentaje.
- Parámetros de alineamiento múltiple: penalización por abertura de hueco; 10, penalización por extensión de hueco; 0,05.
- Matriz de puntuación: BLOSUM.

Alternativamente, se puede usar el programa BESTFIT para determinar alineamientos locales de secuencias.

15 El anticuerpo, fragmento de unión al antígeno, variante, fusión o derivado usado en los métodos o usos de la invención puede comprender o consistir en uno o más aminoácidos que se han modificado o derivatizado.

Se pueden lograr derivados químicos de uno o más aminoácidos por reacción con un grupo lateral funcional. Dichas moléculas derivatizadas incluyen, por ejemplo, las moléculas en las que grupos amino libres se han derivatizado para formar clorhidratos de amina, grupos *p*-toluenosulfonilo, grupos carboxibenzoxi, grupos *t*-butiloxicarbonilo, grupos cloroacetilo o grupos formilo. Se pueden derivatizar grupos carboxilo libres para formar sales, ésteres metílicos y etílicos u otros tipos de ésteres y hidrazidas. Se pueden derivatizar grupos hidroxilo libres para formar derivados de O-acilo u O-alquilo. También se incluyen como derivados químicos los péptidos que contienen derivados de aminoácidos que existe de forma natural de los veinte aminoácidos estándar. Por ejemplo: se puede sustituir 4-hidroxiprolina por prolina; se puede sustituir 5-hidroxilisina por lisina; se puede sustituir 3-metilhistidina por histidina; se puede sustituir homoserina por serina y ornitina por lisina. Los derivados también incluyen péptidos que contienen una o más adiciones o deleciones, en tanto que se mantengan la actividad requerida. Otras modificaciones incluidas son amidación, acilación de extremos amino (por ejemplo, acetilación o amidación con ácido tioglicólico), amidación del extremo carboxilo (por ejemplo, con amoniaco o metilamina), y modificaciones terminales similares.

Se apreciará además por los expertos en la técnica que también pueden ser útiles compuestos peptidomiméticos. Así, por 'polipéptido' los presentes inventores incluyen compuestos peptidomiméticos que son capaces de unirse a un epítipo dentro de la región de núcleo de TG2. El término 'peptidomimético' se refiere a un compuesto que imita la conformación y características deseables de un péptido particular como agente terapéutico.

Por ejemplo, dicho polipéptido incluye no solo moléculas en la que los restos de aminoácidos se unen por enlaces peptídicos (-CO-NH-), sino también moléculas en las que se invierte el enlace peptídico. Dichos peptidomiméticos retro-inversos se pueden preparar usando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, tales como los descritos en Meziere *et al.* (1997) J. Immunol. 159, 3230-3237. Este enfoque implica preparar pseudo-péptidos que contienen cambios que implican al esqueleto, y no a la orientación de las cadenas laterales. Los péptidos retro-inversos, que contienen enlaces NH-CO en lugar de enlaces peptídicos CO-NH, son mucho más resistentes a la proteólisis. Alternativamente, dicho polipéptido puede ser un compuesto peptidomimético en donde uno o más de los restos de aminoácidos se enlazan por un enlace -(CH₂NH)- en lugar del enlace amida convencional.

En una alternativa adicional, se puede prescindir por completo del enlace peptídico, a condición de que se use un resto conector apropiado que retiene la separación entre los átomos de carbono de los restos de aminoácidos; puede ser ventajoso que el resto conector tenga sustancialmente la misma distribución de carga y sustancialmente la misma planaridad que un enlace peptídico.

Se apreciará que dicho polipéptido se pueda bloquear convenientemente en su extremo N o C para ayudar a reducir la susceptibilidad a la digestión exo-proteolítica.

También se ha usado una variedad de aminoácidos no codificados o modificados, tales como D-aminoácidos y N-metilaminoácidos, para modificar péptidos de mamífero. Además, se puede estabilizar una supuesta conformación bioactiva por una modificación covalente, tal como ciclación o por incorporación de lactama u otros tipos de puentes, por ejemplo, véanse Veber *et al.*, 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:2636 y Thursell *et al.*, 1983, Biochem. Biophys. Res. Comm. 111:166.

Un tema común entre muchas de las estrategias sintéticas ha sido la introducción de algunos restos cíclicos en una región estructural basada en péptidos. El resto cíclico restringe el espacio conformacional de la estructura del péptido y esto da frecuentemente como resultado un aumento de la especificidad del péptido por un receptor biológico particular. Una ventaja añadida de esta estrategia es que la introducción de un resto cíclico en un péptido también puede dar como resultado que el péptido tenga una sensibilidad reducida a peptidasas celulares.

Así, los polipéptidos a modo de ejemplo útiles en los métodos y usos de la invención comprenden o consisten en

aminoácidos terminales de cisteína. Dicho polipéptido puede existir en una forma cíclica heterodética por formación de enlaces disulfuro de los grupos mercapturo en los aminoácidos terminales de cisteína o en una forma homodética por formación de enlaces peptídicos de amida entre los aminoácidos terminales. Como se indica anteriormente, el ciclar péptidos pequeños mediante enlaces disulfuro o amida entre las cisteínas de los extremos N y C puede evitar los problemas de especificidad y semivida observados algunas veces con los péptidos lineales, disminuyendo la proteólisis y también aumentando la rigidez de la estructura, que puede dar compuestos de mayor especificidad. Los polipéptidos ciclados por enlaces disulfuro tienen extremos amino y carboxi libres que todavía pueden ser susceptibles a la degradación proteolítica, mientras que los péptidos ciclados por formación de un enlace amida entre la amina del extremo N y el carboxilo del extremo C y, por tanto, ya no contienen extremos amino o carboxi libres. Así, los péptidos se pueden enlazar ya sea por un enlace C-N o un enlace disulfuro.

La presente invención no se limita de ningún modo por el método de ciclación de péptidos, pero engloba péptidos cuya estructura cíclica se puede lograr por cualquier método adecuado de síntesis. Así, enlaces heterodéticos pueden incluir, pero no se limitan a, la formación mediante puentes de disulfuro, alquileo o sulfuro. Los métodos de síntesis de péptidos cíclicos homodéticos y péptidos cíclicos heterodéticos, que incluyen puentes de disulfuro, sulfuro y alquileo, se desvelan en el documento de patente US 5.643.872. Otros ejemplos de métodos de ciclación se tratan y desvelan en el documento de patente US 6.008.058.

Un enfoque adicional a la síntesis de compuestos peptidomiméticos estabilizados cíclicos es la metátesis con cierre de anillo (RCM). Este método implica las etapas de sintetizar un precursor de péptido y ponerlo en contacto con un catalizador de RCM para dar un péptido conformacionalmente restringido. Los precursores de péptido adecuados pueden contener dos o más enlaces C-C insaturados. El método se puede llevar a cabo usando técnicas de síntesis de péptidos en fase sólida. En esta realización, el precursor, que se ancla a un soporte sólido, se pone en contacto con un catalizador de RCM y el producto se escinde entonces del soporte sólido dando un péptido conformacionalmente restringido.

Otro enfoque, desvelado por D. H. Rich en *Protease Inhibitors*, Barrett and Selveson, eds., Elsevier (1986), ha sido para diseñar peptidomiméticos mediante la aplicación del concepto de análogos del estado de transición en el diseño de inhibidores enzimáticos. Por ejemplo, se sabe que el alcohol secundario de estalina imita el estado de transición tetraédrico del enlace amida escindible del sustrato de pepsina.

En resumen, las modificaciones terminales son útiles, como se conoce bien, para reducir susceptibilidad por digestión de proteinasa y, por tanto, para prolongar la semivida de los péptidos en soluciones, particularmente en líquidos biológicos donde pueden estar presentes proteasas. La ciclación de polipéptidos también es una modificación útil debido a las estructuras estables formadas por ciclación y en vista de las actividades biológicas observadas para los péptidos cíclicos.

Así, dicho polipéptido puede ser cíclico. Sin embargo, alternativamente, dicho polipéptido puede ser lineal.

Por "se une selectivamente a un epítipo dentro de la región de núcleo de TG2", los presentes inventores entienden un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que es capaz de unirse selectivamente a un epítipo en la región de núcleo de TG2. Por "capaz de unirse selectivamente" los presentes inventores incluyen dichos restos de unión derivados de anticuerpo que se unen al menos 10 veces más fuertemente al núcleo de TG2 que a otras proteínas; por ejemplo, al menos 50 veces más fuertemente, o al menos 100 veces más fuertemente. El resto de unión puede ser capaz de unirse selectivamente a un epítipo en el núcleo de TG2 en condiciones fisiológicas, por ejemplo, *in vivo*.

Dicha especificidad de unión se puede determinar por métodos bien conocidos en la técnica, tales como enzoinmunoanálisis de adsorción (ELISA), inmunohistoquímica, inmunoprecipitación, transferencia Western y citometría de flujo usando células transfectadas que expresan TG2 o el núcleo de TG2, o un fragmento de la misma. Los métodos adecuados para medir intensidades relativas de unión incluyen inmunoensayos, por ejemplo, donde el resto de unión es un anticuerpo (véase Harlow y Lane, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York). Alternativamente, la unión se puede evaluar usando ensayos competitivos o usando análisis Biacore® (Biacore International AB, Suecia).

Se prefiere que el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la invención se una exclusivamente a TG2.

Se apreciará por los expertos en la técnica que la especificidad de unión de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo se confiere por la presencia de regiones determinantes de la complementariedad (CDR) dentro de las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras constituyentes. Como se trata más adelante, en una realización particularmente preferida de los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos definidos en el presente documento, la especificidad de unión por TG2 se confiere por la presencia de una o más de las CDR identificadas. Por ejemplo, las secuencias que pueden comprender o consistir en las secuencias de CDR de AB-1 VL y VH incluyen KASQDINSYLT, RTNRLFD, LQYDDFPYT, SSAMS, TISSGGRSTYYPDSVKG y LISLY. En un ejemplo adicional, las secuencias que pueden comprender o consistir en las secuencias de CDR de BB-7 VL y VH incluyen KASQDINSYLT, LTNRLMD, LQYVDFPYT, SSAMS, TISSGGRSTYYPDSVKG y LISPY. Las secuencias que

pueden comprender o consistir en las secuencias de CDR de DC-1 VL y VH incluyen KASQDINSYLT, LVNRLVD, LQYDDFPYT, THAMS, TISSGGRSTYYPDSVKG y LISTY. Se prefiere que los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos definidos en el presente documento comprendan o consistan en las secuencias de CDR, o Secuencias de CDR y flanqueantes, como se define en la Tabla 24A. Lo más preferido es que los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos definidos en el presente documento comprendan o consistan en las secuencias de CDR, o Secuencias de CDR y flanqueantes, del anticuerpo AB-1, o BB-7 o DC-1 a modo de ejemplo (como se define, por ejemplo, en la Tabla 24A).

Se prefiere que el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo retenga la especificidad de unión por TG2 del anticuerpo original. Por "retiene la especificidad de unión" los presentes inventores entienden que el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo es capaz de competir para unirse a TG2 con los anticuerpos a modo de ejemplo de la divulgación, por ejemplo, AB-1, AG-1, AG-9, AH-1, AH-3, BB-7, DC-1, EH-6, JE-12, IA-12, DF-4, DH-2, DD-6 y/o DD-9 (véanse los ejemplos adjuntos). Por ejemplo, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo se puede unir al mismo epítipo sobre TG2 que un anticuerpo que comprende las siguientes secuencias: KASQDINSYLT, RTNRLFD, LQYDDFPYT, SSAMS, TISVGGGKTYYPDSVKG y LISLY.

Por "epítipo" se pretende significar en el presente documento un sitio de una molécula a la que se une un anticuerpo, es decir, una región molecular de un antígeno. Un epítipo puede ser un epítipo lineal, que se determina por, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos, es decir, la estructura primaria, o un epítipo tridimensional, definido por la estructura secundaria, por ejemplo, plegamiento de una cadena de péptido en hoja beta o hélice alfa, o por la estructura terciaria, por ejemplo, la forma en la que las hélices u hojas se pliegan o disponen para dar una estructura tridimensional, de un antígeno.

Se conocen bien en la técnica métodos de determinación de si un anticuerpo de prueba es capaz de competir por la unión con el segundo anticuerpo (tales como, por ejemplo, técnicas de ELISA de sándwich o ELISA de sándwich inverso) y se describen, por ejemplo, en *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow y Lane (1988, CSHL, NY, ISBN 0-87969-314-2).

El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, con especificidad de unión por un epítipo en la región de núcleo de TG2, también puede retener una o más de las mismas propiedades biológicas que el anticuerpo original (tal como los anticuerpos a modo de ejemplo proporcionados en los ejemplos).

Como se ha explicado anteriormente, TG2 es una proteína multifuncional dependiente del calcio que cataliza la formación de enlaces isopeptídicos de Nε-(γ-glutamil)lisina entre los restos de lisina glutamina. TG2 comprende un dominio de sándwich beta del extremo N que contiene sitios de unión (por ejemplo, fibronectina) y secuencias requeridas para la exportación de enzimas. Este se enlaza al dominio catalítico de núcleo. Lo central para el dominio es una tríada catalítica que consiste en Cys 277, Asp 358 e His 355, más varios sitios de unión de calcio putativos. Este se enlaza al tercer dominio, barril 1 beta, donde reside un sitio de unión a GTP que transporta la enzima con actividad de GTPasa. El barril 1 beta también contiene un sitio de unión a integrina usado en la adhesión celular. El barril 1 beta junto con el cuarto dominio de TG2, barril 2 beta, participan en el cambio conformacional en TG2 requerido para su activación. En un entorno de alto calcio y bajo GTP, el barril 1 y 2 gira hacia abajo desde la forma inactiva cerrada y plegada para transportar TG2 con una estructura lineal que abre el núcleo catalítico, permitiendo la activación (Pinkas *et al.* (2007) *PLoS Biol.* Transglutaminase 2 undergoes a large conformational change upon activation. 5(12): e327).

Por "la región de núcleo de transglutaminasa tipo 2 (TG2)" los presentes inventores incluyen una región de TG2 que comprende la tríada catalítica descrita anteriormente, excluyendo el dominio de sándwich beta y los barriles 1 y 2 beta. En el contexto de la presente invención, la región de núcleo comprende o consiste en los aminoácidos 143 a 473 de TG2 humana, o un fragmento de la misma.

Los aminoácidos 143 a 473 de TG2 humana consisten en la siguiente secuencia:

CPADAVYLDSEEERQ EYVLTQQGFIYQGS AKFIKNIPWNFGQFEDGILDICLILLDVNPK
FLKNAGRDCSRRSSPVYVGRVVS GMVNCNDDQGVLLGRWDNNYGDGVSPMSWIGSVDILR
RWKNHGCQRVKYGQCWVFAAVACTVLRCLGIPTRVVTNYS AHDQNSNLLIEYFRNEFGE
IQGDKSEMIWNFHCWVESWMTRPDLQPGYEGWQALDPTPQEKSEGTYCCGPVPVRAIKEG
DLSTKYDAPFVFAEVNADVVDWIQQDDGSVHKSINRSLIVGLKISTKSVGRDEREDITH
YKYPEGSSEEREAFTRANHLNKLAEKEETGM

Así, en la presente invención, la región de núcleo consiste en los aminoácidos 143 a 473 de TG2 humana. El epítipo de un anticuerpo descrito en el presente documento podría así ser cualquier epítipo dentro de la región definida por

los aminoácidos 143 a 473 de TG2 humana. Así, el epítipo puede ser un fragmento de esta secuencia o podrían estar constituido de diversos restos de aminoácidos dentro de este fragmento que pueden no ser adyacentes entre sí en la estructura primaria de aminoácidos, pero se localizan entre sí en la estructura secundaria, terciaria o incluso cuaternaria de la proteína, como sería entendido por un experto en la técnica.

5 El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención se une selectivamente a una región que comprende los aminoácidos 304 a 326 de TG2 humana. Esta región (aminoácidos 304 a 326 de TG2 humana) se denomina el grupo 1 en la Figura 5 y comprende la secuencia de aminoácidos AHDQNSNLLIEYFRNEFGIQQD.

10 Un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de la divulgación se puede unir selectivamente en total o en parte a una región que comprende los aminoácidos 351 a 365 de TG2 humana. Esta región (aminoácidos 351 a 365 de TG2 humana) se denomina el grupo 2 en la Figura 5 y comprende la secuencia de aminoácidos YEGWQALDPTPQEKs.

15 Un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de la divulgación se puede unir selectivamente en total o en parte a una región que comprende los aminoácidos 450 a 467 de TG2 humana. Esta región (aminoácidos 450 a 467 de TG2 humana) se denomina el grupo 3 en la Figura 5 y comprende la secuencia de aminoácidos SEEREAFTRANHLNKLAE.

20 El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención inhiben la actividad de TG2 humana.

En una realización de la invención el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo puede comprender una o más de las siguientes secuencias de aminoácidos:

25 KASQDINSYLT; y/o
RTNRLFD; y/o
LQYDDFPYT; y/o
SSAMS; y/o
TISVGGGKTYYPDSVKG; y/o
30 LISLY.

Un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención puede comprender una o más de las siguientes secuencias de aminoácidos:

35 TCKASQDINSYLTWF; y/o
TLIYRTNRLFDGVP o TLIYRTNRLFDGVPXXFSGSGSGQDFF; y/o
YCLQYDDFPYTFG; y/o
FTLSSSAMSWSVR o CXAXFTLSSSAMSWSVR; y/o
WVATISVGGGKTYYPDSVKGRFTISR o WVATISVGGGKTYYPDSVKGRFTISRNXNXXXL; y/o
40 YCAKLISLYWG, en donde X es cualquier aminoácido.

Se considera que las secuencias de las realizaciones inmediatamente precedentes comprenden las regiones determinantes de la complementariedad de las regiones variables ligeras y pesadas del anticuerpo AB-1 a modo de ejemplo (véase el Ejemplo 1) y ciertas variantes humanizadas específicas del anticuerpo AB-1. En una realización
45 adicional, el anticuerpo puede comprender la secuencia de aminoácidos

KASQDINSYLTXXXXXXXXXXXXXXXXRTNRLFDXXLQYDDFPYT; o
KASQDINSYLTXXX;

50 o RTNRLFDXXXXXXXXXXXXXXXXX; o FXXXXXXXXXXXXXXXXX LQYDDFPYT, en donde X es cualquier aminoácido.

En una realización adicional, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo puede comprender la secuencia de aminoácidos TCKASQDINSYLTWF o TCKASQDINSYLTWY; y/o

55 LLIYRTNRLFDGVP o SLIYRTNRLFDGVP o LLIYRTNRLFDGVPXXFSGSGSGQDFF o
SLIYRTNRLFDGVPXXFSGSGSGQDFF; y/o
YCLQYDDFPYTFG; y/o
FTFSSSAMSWSVR o CXAXFTFSSSAMSWSVR; y/o
WVSTISVGGGKTYYPDSVKGRFTISR o WVSTISVGGGKTYYPDSVKGRFTISRNXNXXXL; y/o
YCAKLISLYWG, en donde X es cualquier aminoácido.

60 Así, en una realización, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo puede tener al menos una región variable de la cadena ligera que comprende las siguientes secuencias: KASQDINSYLT; y RTNRLFD; y LQYDDFPYT.

65 En una realización adicional, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede tener al menos una región variable de la cadena pesada que comprende las siguientes secuencias: SSAMS; y

TISVGGGKTYYPDSVKG; y LISLY.

En una realización de la invención, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo puede tener al menos una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos

- 5 DIQMTQTPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLFDGVPS
RFSGSGSGQDFFLTISSEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGKLEIK o
- 10 DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLFDGVPS
RFSGSGSGQDFFLTISSEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGKLEIK. Estas regiones variables de la cadena ligera corresponden a las encontradas en el anticuerpo AB-1 a modo de ejemplo (Figuras 7 y 18).

- 15 Alternativamente, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo puede tener al menos una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos:

- EIVLTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLFDGVPS
RFSGSGSGQDFFLTISSEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGKLEIK (AB-1_VK) o
- 20 DIQMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLFDGVPS
RFSGSGSGQDFFLTISSEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGKLEIK (AB-1_VK1).

En una realización particularmente preferida, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo puede tener al menos una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos:

- 25 EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLTWYQQKPGKAPKLLIYRTNRLFDGVPS
RFSGSGSGTDFFLTISLQPEDFGTYICLQYDDFPYTFGGGKLEIK (hAB-1_RKE); o
- 30 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKAPKSLIYRTNRLFDGVPS
RFSGSGSGTDFFLTISLQPEDFATYYICLQYDDFPYTFGGGKVEIK (hAB-1_RKJ).

Estas secuencias son variantes humanizadas de las secuencias de la cadena ligera de AB-1 proporcionadas anteriormente.

- 35 En una realización de la invención, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo puede tener al menos una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos

- EVQLEESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTLSSSAMSWSVRQTPDRRLEWVATISVGGGKTY
PDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRSEDAMYCAKLISLYWGQGTTLTVSS o
- 40 EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTLSSSAMSWSVRQTPDRRLEWVATISVGGGKTY
PDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRSEDAMYCAKLISLYWGQGTTLTVSS. Estas regiones variables de la cadena pesada corresponden a las encontradas en el anticuerpo AB-1 a modo de ejemplo (Figuras 7 y 18).

- 45 Alternativamente, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo puede tener al menos una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos:

- EVQLQESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTLSSSAMSWSVRQTPDRRLEWVATISVGGGKTY
PDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRSEDAMYCAKLISLYWGQGTTLTVSS (AB-1_VH).

- 50 En una realización particularmente preferida, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo puede tener al menos una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos:
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSAASGFTFSSSAMSWSVRQAPGKGLEWVSTISVGGGKTY
PDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRSEDAMYCAKLISLYWGQGTTLTVSS (hAB-1_RHA). Esta secuencia es
55 una variante humanizada de la secuencia de la cadena pesada de AB-1 proporcionada anteriormente.

Así, se prevé que un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de la divulgación puede tener:

- i) al menos una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos
- 60 DIQMTQTPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLFDGVPS
RFSGSGSGQDFFLTISSEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGKLEIK o
- DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLFDGVPS
RFSGSGSGQDFFLTISSEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGKLEIK, o
- 65 EIVLTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLFDGVPS
RFSGSGSGQDFFLTISSEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGKLEIK (AB-1_VK), o

DIQMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLFDGVPS
 RFSGSGSGQDFLLTISLEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGKLEIK (AB-1_VK1), o
 EIVLTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKAPKLLIYRTNRLFDGVPS
 RFSGSGSGTDFFTISLQPEDFGTYCLQYDDFPYTFGGGKLEIK (hAB-1_RKE), o
 5 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKAPKSLIYRTNRLFDGVPS
 RFSGSGSGTDFLLTISLQPEDFATYYCLQYDDFPYTFGGGKVEIK (hAB-1_RKJ); y

ii) al menos una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos

10 EVQLEESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTLSSSAMSWSVRQTPDRRLEWVATISVGGGKTYT
 PDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRSEDAMYYCAKLISLYWGQGTTLTVSS o
 EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTLSSSAMSWSVRQTPDRRLEWVATISVGGGKTYT
 PDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRSEDAMYYCAKLISLYWGQGTTLTVSS, o
 EVQLQESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTLSSSAMSWSVRQTPDRRLEWVATISVGGGKTYT
 15 PDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRSEDAMYYCAKLISLYWGQGTTLTVSS (AB-1_VH), o
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSAASGFTFSSSAMSWSVRQAPGKGLEWVSTISVGGGKTYT
 PDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRSEDAMYYCAKLISLYWGQGTTLTVSS (hAB-1_RHA).

En una realización de cualquier aspecto de la presente invención el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo puede comprender una o más de las siguientes secuencias de aminoácidos:

25 KASQDINSYLT; y/o
 LTNRLMD; y/o
 LQYVDFPYT; y/o
 SSAMS; y/o
 TISSGGRSTYYPDSVKG; y/o
 LISPY.

30 Se considera que las secuencias de la realización inmediatamente precedente comprenden las regiones determinantes de la complementariedad de las regiones variables ligeras y pesadas del anticuerpo BB-7 a modo de ejemplo (véase la Figura 19). En una realización adicional, el anticuerpo puede comprender la secuencia de aminoácidos
 KASQDINSYLTXXXXXXXXXXXXXXXXXLTNRLMDXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
 XXXXXLLQYVDFPYT; o KASQDINSYLTXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX; o
 35 LTNRLMDXXXXXXXXXXXXXXXXXFX; o FXXXXXXXXXXXXXXXXXXLLQYVDFPYT, en donde X es cualquier aminoácido.

Así, en una realización de cualquier aspecto de la presente invención, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo puede tener al menos una región variable de la cadena ligera que comprende las siguientes secuencias: KASQDINSYLT; y LTNRLMD; y LQYVDFPYT.

40 En una realización adicional de cualquier aspecto de la presente invención, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo puede tener al menos una región variable de la cadena pesada que comprende las siguientes secuencias: SSAMS; y TISSGGRSTYYPDSVKG; y LISPY.

45 En una realización de cualquier aspecto de la presente invención, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo puede tener al menos una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos
 AIKMTQSPSSMYASLGERVIITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYLTNRLMDGVPS
 RFSGSGSGQEFLLTISGLEHEDMGIYYCLQYVDFPYTFGGGKLEIK. Esta región variable de la cadena ligera corresponde a la encontrada en el anticuerpo BB-7 a modo de ejemplo (Figura 19).

50 En una realización de cualquier aspecto de la presente invención, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo puede tener al menos una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos
 AVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGIIFSSSAMSWSVRQTPEKRLEWVATISSGGRSTYY
 PDSVKGRFTVSRDSAKNTLYLQMDSLRSEDATYYCAKLISPYWGQGTTLTVSS. Esta región variable de la cadena pesada corresponde a la encontrada en el anticuerpo BB-7 a modo de ejemplo (Figura 19).

Así, se prevé que un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de la divulgación pueda tener:

60 i) al menos una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos
 AIKMTQSPSSMYASLGERVIITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYLTNRLMDGVPS
 RFSGSGSGQEFLLTISGLEHEDMGIYYCLQYVDFPYTFGGGKLEIK; y

ii) al menos una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos

65 AVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGIIFSSSAMSWSVRQTPEKRLEWVATISSGGRSTYY
 PDSVKGRFTVSRDSAKNTLYLQMDSLRSEDATYYCAKLISPYWGQGTTLTVSS.

Se prevé además que un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de la divulgación pueda tener:

i) al menos una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLTWFQKPKGKAPKSLIYLTNRLMDGVPS
RFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCLQYVDFPYTFGQGTKVEIK
DIKMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLTWFQKPKGKAPKTLIYLTNRLMDGVPS
RFSGSGSGQEFLTISLQPEDFATYYCLQYVDFPYTFGQGTKVEIK; y/o

ii) al menos una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSAMSWSVRQAPGKGLEWVSTISSGGRSTYY
PDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLISPYWGQGLTVTVSS
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSAMSWSVRQAPGKGLEWVSTISSGGRSTYY
PDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLISPYWGQGLTVTVSS. Estas secuencias corresponden a
variantes humanizadas del anticuerpo BB-7 (véanse las Tablas 23, 24 y 24A).

En una realización de cualquier aspecto de la presente invención el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo puede comprender una o más de las siguientes secuencias de aminoácidos:

KASQDINSYLT; y/o
LVNRLVD; y/o
LQYDDFPYT y/o
THAMS; y/o
TISSGGRSTYYPDSVKG; y/o
LISTY.

Se considera que las secuencias de la realización inmediatamente precedente comprenden las regiones determinantes de la complementariedad de las regiones variables ligeras y pesadas del anticuerpo DC-1 a modo de ejemplo (véase la Figura 20). En una realización adicional, el anticuerpo puede comprender la secuencia de aminoácidos
KASQDINSYLTXXXXXXXXXXXXXXXXLVNRLVDXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
XXXXXXXXLQYDDFPYT o KASQDINSYLTXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXA; o
LVNRLVDXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXA; o AXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXLQYDDFPYT, en donde X es cualquier aminoácido.

Así, en una realización de cualquier aspecto de la presente invención, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo puede tener al menos una región variable de la cadena ligera que comprende las siguientes secuencias:
KASQDINSYLT; y LVNRLVD; y LQYDDFPYT

En una realización adicional de cualquier aspecto de la presente invención, el anticuerpo fragmento de unión al antígeno del mismo puede tener al menos una región variable de la cadena pesada que comprende las siguientes secuencias: THAMS; y TISSGGRSTYYPDSVKG; y LISTY.

En una realización de cualquier aspecto de la presente invención, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo puede tener al menos una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos
DITMTQSPSSYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQKPKGKSPKILIYLVNRLVDGVPS
RFSGSGSGQDYALTISLEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGKTLEIK. Esta región variable de la cadena ligera corresponde a la encontrada en el anticuerpo DC-1 a modo de ejemplo (Figura 20).

En una realización de cualquier aspecto de la presente invención, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo puede tener al menos una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos
EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTLSTHAMSWSVRQTPEKRLEWVATISSGGRSTYY
PDSVKGRFTISRDNVKNNTLYLQLSSLRSEDATVYFCARLISTYWGQGTTLTVSS. Esta región variable de la cadena pesada corresponde a la encontrada en el anticuerpo DC-1 a modo de ejemplo (Figura 20).

Así, se prevé que un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de la divulgación pueda tener:

i) al menos una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos
DITMTQSPSSYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQKPKGKSPKILIYLVNRLVDGVPS
RFSGSGSGQDYALTISLEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGKTLEIK; y
ii) al menos una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos
EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTLSTHAMSWSVRQTPEKRLEWVATISSGGRSTYY
PDSVKGRFTISRDNVKNNTLYLQLSSLRSEDATVYFCARLISTYWGQGTTLTVS.

Se prevé además que un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de la divulgación pueda tener:

i) al menos una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLTWFQKPKGKAPKSLIYLVNRLVDGVPS

RFSGSGSGTDFLTISSLQPEDFATYYCLQYDDFPYTFGQGTKVEIK
DITMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQDINSYLTWFQKPKGKAPKILIYLVNRLVDGVPS
RFSGSGSGQDYALTISSLQPEDFATYYCLQYDDFPYTFGQGTKVEIK; y/o

o

- 5 ii) al menos una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSTHAMSWMVRQAPGKGLEWVSTISSGGRSTYY
PDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLISTYWGQGTLVTVSS o

- 10 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSTHAMSWMVRQAPGKGLEWVATISSGGRSTYY
PDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARLISTYWGQGTLVTVSS. Estas secuencias
corresponden a las variantes humanizadas de DC-1 proporcionadas en las Tablas 23, 24 y 24A.

Un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo descrito en el presente documento puede comprender una o más de las siguientes secuencias de aminoácidos:

- 15 KASQDINSYLT; y/o
XXNRLXD; y/o
LQYXDFPYT; y/o
XXAMS; y/o
20 TISXGGXXTYYPDSVKG; y/o
LISXY, en donde X es cualquier aminoácido.

Un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo descrito en el presente documento puede comprender una o más de las siguientes secuencias de aminoácidos:

- 25 (K/Q/R)ASQ(D/G)I(N/S/R)(S/N)YL(T/N/A); y/o
(R/L/V/D/A)(T/V/A)(N/S)(R/N)L(F/M/V/E/Q)(D/T/S); y/o
(L/Q)Q(Y/H)(D/V/N)(D/T)(F/Y)P(Y/L/W)T; y/o
(S/T)(S/H/Y)AMS; y/o
30 (T/A)IS(V/S/G)(G/S)G(G/R)(K/S)TYYP(P/A)DSVKG; y/o
(L/D)(I/G)(S/G)(L/P/T/V)Y.

Un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo descrito en el presente documento puede tener al menos una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos
35 QIVLTQSPAIMASASPGEKVTMTCSASSSDYMYWYQQKPGSSPRLIYDTSNLAGSVPVR
FSGSGSGTSYSLTISRMEADAATYYCQQWNSSPLTFGAGTKLELK. Esta región variable de la cadena ligera se
corresponde con la que se encuentra en el anticuerpo ejemplar DD-9 (Figura 25).

- Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en el presente documento puede tener al menos una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos

- 40 QVTLESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQSSGKGLEWLAHIYWDDDKR
YNPSLKSRTISKDSSSNQVFLKITSVDTADTATYYCARSWTTPFAFWGQGLTVTVSA.

- 45 Esta región variable de la cadena pesada se corresponde con la encontrada en el anticuerpo ejemplar DD-9 (Figura 25).

Así, se prevé que un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la divulgación pueda tener:

- 50 i) al menos una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos

QIVLTQSPAIMASASPGEKVTMTCSASSSDYMYWYQQKPGSSPRLIYDTSNLAGSVPVR
FSGSGSGTSYSLTISRMEADAATYYCQQWNSSPLTFGAGTKLELK; y

- 55 ii) al menos una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos

QVTLESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQSSGKGLEWLAHIYWDDDKR
YNPSLKSRTISKDSSSNQVFLKITSVDTADTATYYCARSWTTPFAFWGQGLTVTVSA.

- 60 Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede describirse en el presente documento como que
tiene al menos una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos
QIVLTQSPAIMASASPGEKVTMTCSASSSVSYMYWYQQKPGSSPRLIYDTSNLAGSVPVR
FSGSGSGTSYSLTISRMEADAATFYCQQWSSSPLTFGAGTKLELK.
Esta región variable de la cadena ligera corresponde a la encontrada en el anticuerpo DH-2 a modo de ejemplo
65 (Figura 26).

Un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo descrito en el presente documento puede tener al menos una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos
 QVTLKESGPGILQPSQTLSTLCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQPSGKGLEWLAHIYWDDDKR
 YNPSLKSRLTISKDTSSNQVFLKITSVDTADTATYYCARSGTTAPFAYWGQGLTVTSA.

Esta región variable de la cadena pesada corresponde a la encontrada en el anticuerpo DH-2 a modo de ejemplo (Figura 26).

Así, se prevé que un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de la divulgación pueda tener:

i) al menos una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos

QIVLTQSPAIMASASPGEKVTMTCSASSSVSYMYWYQQKPGSSPRLIYDTSNLAGVPPVR
 FSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATFYCQQWSSSPLTFGAGTKLELK; y

ii) al menos una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos

QVTLKESGPGILQPSQTLSTLCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQPSGKGLEWLAHIYWDDDKR
 YNPSLKSRLTISKDTSSNQVFLKITSVDTADTATYYCARSGTTAPFAYWGQGLTVTSA.

Se prevé que un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo pueda tener:

i) al menos una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos correspondiente a cualquiera de las secuencias VK proporcionadas en cualquiera de las Figuras 18 a 28; y/o

ii) al menos una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos correspondiente a cualquiera de las secuencias VH proporcionadas en cualquiera de las Figuras 18 a 28 o un fragmento, variante o su derivado.

Como se indica anteriormente, se prevé que el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la descripción precedente pueda comprender una secuencia de aminoácidos que tienen al menos 75 % de identidad con una o más de las secuencias de aminoácidos dadas anteriormente, por ejemplo, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % de identidad con una o más de las secuencias de aminoácidos especificadas anteriormente. También se prevé que el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno pueda comprender hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más inserciones, deleciones, sustituciones conservativas y/o sustituciones no conservativas.

El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención puede comprender una o más de las siguientes secuencias de aminoácidos:

KASQDINSYLT; y/o
 XXNRLXD; y/o
 LQYXDFPYT; y/o
 XXAMS; y/o
 TISXGGXXTYYPDSVKG; y/o
 LISXY, en donde X es cualquier aminoácido.

En una realización el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención comprende una o más de las siguientes secuencias de aminoácidos:

(K/Q/R)ASQ(D/G)I(N/S/R)(S/N)YL(T/N/A); y/o
 (R/L/V/D/A)(T/V/A)(N/S)(R/N)L(F/M/V/E/Q)(D/T/S); y/o
 (L/Q)Q(Y/H)(D/N/N)(D/T)(F/Y)P(Y/L/W)T; y/o
 (S/T)(S/H/Y)AMS; y/o
 (T/A)IS(V/S/G)(G/S)G(G/R)(K/S)TYYP(P/A)DSVKG; y/o
 (L/D)(I/G)(S/G)(L/P/T/V)Y.

En una realización el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención comprende una o más de las siguientes secuencias de aminoácidos:

KASQDINSYLT; y/o
 RTNRLFD; y/o
 LQYDDFPYT; y/o
 SSAMS; y/o
 TISVGGGKTYYPDSVKG; y/o
 LISLY.

En una realización el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención puede comprender una

o más de las siguientes secuencias de aminoácidos:

TCKASQDINSYLTWF; y/o
 TLIYRTNRLFDGVP o TLIYRTNRLFDGVPXXFSGSGSGQDFF; y/o
 YCLQYDDFPYTFG; y/o
 FTLSSSAMSWSVR o CXAXFTLSSSAMSWSVR; y/o
 WVATISVGGGKTYYPDSVKGRFTISR o
 WVATISVGGGKTYYPDSVKGRFTISRNXNXXXL; y/o
 YCAKLISLYWG, en donde X es cualquier aminoácido.

Se considera que las secuencias de la realización precedente comprenden las regiones determinantes de la complementariedad de las regiones variables ligeras y pesadas del anticuerpo AB-1 ejemplificado.

En una realización adicional, el antígeno del mismo puede comprender la secuencia de aminoácidos KASQDINSYLTXXXXXXXXXXXXXXXXXRTNRLFDXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXFXXXXXXXXXX XXXXXLQYDDFPYT; o KASQDINSYLTXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXF; o RTNRLFDXXXXXXXXXXXXXXXXXF; o FXXXXXXXXXXXXXXXXXXLQYDDFPYT, en donde X es cualquier aminoácido.

En una realización adicional el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo puede comprender la secuencia de aminoácidos TCKASQDINSYLTWF o TCKASQDINSYLTWY; y/o LLIYRTNRLFDGVP o SLIYRTNRLFDGVP o LLIYRTNRLFDGVPXXFSGSGSGQDFF; y/o LLIYRTNRLFDGVPXXFSGSGSGQDFF; y/o YCLQYDDFPYTFG; y/o FTFSSSAMSWSVR o CXAXFTFSSSAMSWSVR; y/o WVSTISVGGGKTYYPDSVKGRFTISR o WVSTISVGGGKTYYPDSVKGRFTISRNXNXXXL; y/o YCAKLISLYWG, en donde X es cualquier aminoácido.

Así, en una realización el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo puede tener al menos una región variable de la cadena ligera que comprende las siguientes CDR: KASQDINSYLT; y RTNRLFD; y LQYDDFPYT.

En una realización adicional el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo puede tener al menos una región variable de la cadena pesada que comprende las siguientes CDR: SSAMS; y TISVGGGKTYYPDSVKG; y LISLY.

En una realización adicional, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo del segundo aspecto puede tener al menos una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos

DIQMTQTPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQKPKGKSPKTLIYRTNRLFDGVPS
 RFSGSGSGQDFFLTISSEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGKLEIK o
 DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQKPKGKSPKTLIYRTNRLFDGVPS
 RFSGSGSGQDFFLTISSEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGKLEIK, o
 EIVLTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQKPKGKSPKTLIYRTNRLFDGVPS
 RFSGSGSGQDFFLTISSEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGKLEIK (AB-1_VK), o
 DIQMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQKPKGKSPKTLIYRTNRLFDGVPS
 RFSGSGSGQDFFLTISSEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGKLEIK (AB-1_VK1), o
 EIVLTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDINSYLTWYQKPKGKAPKLLIYRTNRLFDGVPS
 RFSGSGSGTDFFLTISLQPEDFGTYCLQYDDFPYTFGGGKLEIK (hAB-1_RKE), o
 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDINSYLTWFQKPKGKAPKSLIYRTNRLFDGVPS
 RFSGSGSGTDFFLTISLQPEDFATYCLQYDDFPYTFGGGKVEIK (hAB-1_RKJ).

En una realización adicional más del segundo aspecto, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo puede tener al menos una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos

EVQLEESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTLSSSAMSWSVRQTPDRRLEWVATISVGGGKTY
 PDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRSEDAMYYCAKLISLYWGQGTTLTVSS o
 EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTLSSSAMSWSVRQTPDRRLEWVATISVGGGKTY
 PDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRSEDAMYYCAKLISLYWGQGTTLTVSS, o
 EVQLQESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTLSSSAMSWSVRQTPDRRLEWVATISVGGGKTY
 PDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRSEDAMYYCAKLISLYWGQGTTLTVSS (AB-1_VH), o
 EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSAASGFTFSSSAMSWSVRQAPGKGLEWVSTISVGGGKTY
 PDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRSEDAMYYCAKLISLYWGQGTTLTVSS (hAB-1_RHA).

Además se describe en el presente documento un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que tiene al menos una región variable de la cadena ligera como se integra en el segundo aspecto y al menos una región variable de la cadena pesada como se integra en el segundo aspecto.

Para evitar dudas, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de la divulgación puede comprender cualquier secuencia de aminoácidos proporcionada en relación con el primer aspecto. Así, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo puede incluir cualquier región VK y/o VK como se ejemplifica en cualquiera de las

Figuras 18 a 28 o Tablas 14 a 24 y 24A, o cualquier variante, fragmento o su derivado.

Además, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de cualquier aspecto de la invención puede ser o comprender cualquier anticuerpo humanizado o quimérico descrito en el presente documento, en particular, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo puede comprender o consistir en cualquiera de las secuencias proporcionadas en las Tablas 14 a 24 y 24A.

Se prevé que un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno descrito en el presente documento pueda comprender una secuencia de aminoácidos que tienen al menos 75 % de identidad con una o más de las secuencias de aminoácidos dadas anteriormente, por ejemplo, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % de identidad con una o más de las secuencias de aminoácidos especificadas anteriormente. También se prevé que el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno pueda comprender hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más inserciones, delecciones, sustituciones conservativas y/o sustituciones no conservativas.

En una realización preferida de cualquier aspecto de la invención, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo puede comprender o consistir en un anticuerpo intacto. Alternativamente, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo puede consistir esencialmente en un anticuerpo intacto. Por "consistir esencialmente en" los presentes inventores entienden que el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo consiste en una porción de un anticuerpo intacto suficiente para presentar especificidad de unión por TG2.

El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la invención puede ser un anticuerpo que no existen de forma natural. Por supuesto, si el anticuerpo es un anticuerpo que existe de forma natural, se proporciona en una forma aislada (es decir, distinto de aquél en el que se encuentra en la naturaleza).

En una realización de cualquier aspecto de la invención, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo puede comprender o consistir en un fragmento de unión al antígeno seleccionado del grupo que consiste en: un fragmento Fv; un fragmento Fab; y un fragmento de tipo Fab. En una realización adicional, el fragmento Fv puede ser un fragmento Fv monocatenario o un fragmento Fv unido por disulfuro. En una realización adicional más, el fragmento de tipo Fab puede ser un fragmento Fab' o un fragmento F(ab)₂.

Los dominios pesados (V_H) variables y ligeros (V_L) variables del anticuerpo participan en el reconocimiento del antígeno, un hecho reconocido primero por los tempranos experimentos de digestión con proteasa. La confirmación adicional se encontró por "humanización" de anticuerpos de roedor. Se pueden fusionar dominios variables de origen de roedor con dominios constantes de origen humano de forma que el anticuerpo resultante retenga la especificidad antigénica del anticuerpo emparentado con el roedor (Morrison *et al.* (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6851-6855).

Se confiere especificidad antigénica por dominios variables y es independiente de los dominios constantes, como se conoce de experimentos que implican la expresión bacteriana de fragmentos de anticuerpos, todos los cuales contienen uno o más dominios variables. Estas moléculas incluyen moléculas de tipo Fab (Better *et al.* (1988) Science 240, 1041); moléculas Fv (Skerra *et al.* (1988) Science 240, 1038); moléculas de Fv monocatenario (ScFv) donde los dominios componentes V_H y V_L se enlazan mediante un oligopéptido flexible (Bird *et al.* (1988) Science 242, 423; Huston *et al.* (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5879) y anticuerpos de un solo dominio (dAbs) que comprenden o que consisten en dominios V aislados (Ward *et al.* (1989) Nature 341, 544). Una revisión general de las técnicas implicadas en la síntesis de fragmentos de anticuerpos que retienen sus sitios de unión específicos se encuentra en Winter y Milstein (1991) Nature 349, 293-299.

Así, por "fragmento de unión al antígeno" los presentes inventores incluyen un fragmento funcional de un anticuerpo que es capaz de unirse a TG2.

Los fragmentos de unión al antígeno a modo de ejemplo se pueden seleccionar del grupo que consiste en fragmentos Fv (por ejemplo, Fv monocatenario y Fv unido por sulfuro) y fragmentos de tipo Fab (por ejemplo, fragmentos Fab, fragmentos Fab' y fragmentos F(ab)₂).

En una realización de la invención, el fragmento de unión al antígeno es un scFv.

Son varias las ventajas de uso de los fragmentos de anticuerpos, en vez de anticuerpos completos. El tamaño más pequeño de los fragmentos puede conducir a la mejora de las propiedades farmacológicas, tales como mejor penetración de tejido sólido. Además, los fragmentos de unión al antígeno tales como los fragmentos de anticuerpos Fab, Fv, ScFv y dAb se pueden expresar en y secretar de *E. coli*, que permite así la fácil producción de grandes cantidades de dichos fragmentos.

También se incluyen versiones modificadas de anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos, por ejemplo, modificadas por la unión covalente de polietilenglicol u otro polímero adecuado.

Se prefiere particularmente que el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo sea una molécula recombinante.

Se conocen bien en la técnica los métodos de generación de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos. Por ejemplo, se pueden generar anticuerpos mediante uno cualquiera de varios métodos que emplean inducción de producción *in vivo* de moléculas de anticuerpo, cribado de bibliotecas de inmunoglobulinas (Orlandi. *et al.*, 1989. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:3833-3837; Winter *et al.*, 1991, Nature 349:293-299) o generación de moléculas de anticuerpos monoclonales por líneas celulares en cultivo. Estas incluyen, pero no se limitan a, la técnica de hibridomas, la técnica de hibridomas de linfocitos B humanos y la técnica de hibridomas del virus de Epstein-Barr (EBV) (Kohler *et al.*, 1975. Nature 256:495-497; Kozbor *et al.*, 1985. J. Immunol. Methods 81:31-42; Cote *et al.*, 1983. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2026-2030; Cole *et al.*, 1984. Mol. Cell. Biol. 62:109-120).

Convenientemente, la invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo en donde el anticuerpo es un anticuerpo recombinante (es decir, en donde se produce por medios recombinantes).

En una realización particularmente preferida de cualquier aspecto de la invención, el anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal.

Los anticuerpos monoclonales adecuados para antígenos seleccionados se pueden preparar por técnicas conocidas, por ejemplo, las desveladas en *Monoclonal Antibodies: A manual of techniques*, H Zola (CRC Press, 1988) y en *"Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications"*, JGR Hurrell (CRC Press, 1982). Se proporcionan anticuerpos monoclonales a modo de ejemplo de la invención y métodos adecuados para su fabricación en los ejemplos más adelante.

También se pueden obtener fragmentos de anticuerpos usando métodos bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, 1988, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, New York). Por ejemplo, se pueden preparar fragmentos de anticuerpos de la presente invención por hidrólisis proteolítica del anticuerpo o por expresión en *E. coli* o células de mamífero (por ejemplo, cultivo de células de ovario de hámster chino u otros sistemas de expresión de proteínas) de ADN que codifica el fragmento. Alternativamente, se pueden obtener fragmentos de anticuerpos por digestión con pepsina o papaína de anticuerpos completos por métodos convencionales.

En una realización de cualquier aspecto de la invención, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo puede ser un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado.

Se apreciará por los expertos en la técnica que para terapia humana o diagnósticos se pueden usar anticuerpos humanizados. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos genéticamente manipulados o fragmentos de anticuerpos que tienen porciones mínimas derivadas de anticuerpos no humanos. Los anticuerpos humanizados incluyen anticuerpos en los que regiones determinantes de la complementariedad de un anticuerpo humano (anticuerpo receptor) se sustituyen por restos de una región determinante de la complementariedad de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata o conejo que tiene la funcionalidad deseada. En algunos casos, restos de la región estructural de Fv del anticuerpo humano se sustituyen por restos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender restos que ni se encuentran en el anticuerpo receptor ni en la región determinante de la complementariedad importada o secuencias de la región estructural. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en el que todas o sustancialmente todas las regiones determinantes de la complementariedad corresponden a las de un anticuerpo no humano y todas, o sustancialmente todas, las regiones estructurales corresponden a las de una secuencia consenso humana relevante. Los anticuerpos humanizados también incluyen óptimamente al menos una porción de una región constante de anticuerpo, tal como una región Fc, normalmente derivada de un anticuerpo humano (véanse, por ejemplo, Jones *et al.*, 1986. Nature 321:522-525; Riechmann *et al.*, 1988, Nature 332:323-329; Presta, 1992, Curr Op. Struct. Biol. 2:593-596).

Se conocen bien en la técnica los métodos de humanización de anticuerpos no humanos. Generalmente, el anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos en él de una fuente que es no humana. Estos restos de aminoácidos no humanos, frecuentemente denominados restos importados, normalmente se toman de un dominio variable importado. La humanización se puede realizar esencialmente como se ha descrito (véanse, por ejemplo, Jones *et al.*, 1986, Nature 321:522-525; Reichmann *et al.*, 1988, Nature 332:323-327; Verhoeven *et al.*, 1988, Science 239:1534-1536; documento de patente US 4.816.567) sustituyendo regiones determinantes de la complementariedad humanas con regiones determinantes de la complementariedad de roedor correspondientes. Por consiguiente, dichos anticuerpos humanizados son anticuerpos quiméricos, en donde sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido con la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados pueden ser normalmente anticuerpos humanos en los que algunos restos de la región determinante de la complementariedad y posiblemente algunos restos de la región estructural se sustituyen por restos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

También se pueden identificar anticuerpos humanos usando diversas técnicas conocidas en la técnica, que incluyen bibliotecas de presentación en fagos (véanse, por ejemplo, Hoogenboom y Winter, 1991, J. Mol. Biol. 227:381; Marks *et al.*, 1991, J. Mol. Biol. 222:581; Cole *et al.*, 1985, en: Monoclonal antibodies and Cancer Therapy, Alan Liss, pág. 77; Boerner *et al.*, 1991, J. Immunol. 147:86-95, Soderlind *et al.*, 2000, Nat Biotechnol 18:852-6 y el documento de patente WO 98/32845).

El término "aminoácido", como se usa en el presente documento, incluye los veinte aminoácidos estándar genéticamente codificados y sus estereoisómeros correspondientes en la forma 'D' (en comparación con la forma 'L' natural), omega-aminoácidos distintos de los aminoácidos que existen de forma natural, aminoácidos no convencionales (por ejemplo, aminoácidos α,α -disustituídos, N-alquilaminoácidos, etc.) y aminoácidos químicamente derivatizados.

Cuando un aminoácido se enumera específicamente, tal como "alanina" o "Ala" o "A", el término se refiere a tanto L-alanina como D-alanina, a menos que se establezca explícitamente de otro modo. Otros aminoácidos no convencionales también pueden ser componentes adecuados para los polipéptidos de la presente invención, en tanto que se retenga la propiedad funcional deseada por el polipéptido. Para los péptidos mostrados, cada resto de aminoácido codificado, cuando corresponda, se representa por la designación de una sola letra, correspondiente a la denominación común del aminoácido convencional.

En una realización, los polipéptidos como se define en el presente el documento comprenden o consisten en L-aminoácidos.

Una vez se obtienen anticuerpos adecuados, se pueden probar para actividad, tal como especificidad de unión o una actividad biológica del anticuerpo, por ejemplo, por ELISA, inmunohistoquímica, citometría de flujo, inmunoprecipitación, transferencias Western, etc. Se puede probar la actividad biológica en diferentes ensayos con lecturas para esa característica particular.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un polinucleótido que codifica un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención.

Se describe en el presente documento un polinucleótido aislado que comprende o que consiste en las secuencias de nucleótidos:

i)

GACATCCAGATGACACAGACTCCATCTTCCATGTATGCATCTCTAGGAGAGAGAGTCACT
ATCACTTGCAAGGCGAGTCAGGACATTAATAGCTATTTAACCTGGTTCCAGCAGAAACCA
GGGAAATCTCCTAAGACCCTGATCTATCGTACAAATAGATTGTTTGATGGGGTCCCATCC
AGGTTCACTGGCAGTGGATCTGGGCAAGATTTTTTCTCACCATCAGCAGCCTGGAATAT
GAAGATATGGGAATTTATTATTGTCTACAGTATGATGACTTTCCGTACACGTTCCGGAGGG
GGGACCAAATGGAATAAAA; y/o

ii)

GAAGTACAGCTGGAGGAGTCAGGGGGGGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTC
TCCTGTGCAGCCTCTGGATTCAGTCTCAGTTCCTCTGCCATGTCTTGGGTTCCGCCAGACT
CCGGACAGGAGGCTGGAGTGGGTCGCAACCATTAGTGTTGGTGGTAAACCTACTAT
CCAGACAGTGTGAAGGGTCGCTTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACACCCTCTAT
CTGCAAATGAACAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCAAACTAATC
AGTCTCTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA.

También se describe en el presente documento un polinucleótido aislado que comprende o que consiste en cualquiera de las secuencias de ácidos nucleicos enumeradas en cualquiera de las Figuras 18 a 28.

Así, se describe en el presente documento un polinucleótido aislado que comprende o que consiste en las secuencias de nucleótidos:

i)

GCCATCAAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCATGTATGCATCTCTAGGAGAGAGAGTCACT
ATCACTTGCAAGGCGAGTCAGGACATAAATAGTTATTTAACCTGGTTCCAACAGAAACCA
GGAAAGTCTCCTAAGACCCTGATCTATCTTACAAATAGATTGATGGATGGGGTCCCATCA
AGGTTCACTGGCAGTGGATCTGGGCAAGAATTTTTACTCACCATCAGCGGCCTGGAACAT
GAAGATATGGGCATTTATTATTGTCTCCAGTATGTTGACTTTCCGTACACGTTCCGGAGGG
GGGACCAAGCTGGAATAAAA; y/o

ii)

GCAGTGCAACTGGTAGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTC
TCCTGTGCAGCCTCTGGAATCATTTTCAGTTCCTCTGCCATGTCTTGGGTTCCGCCAGACT

CCGGAAGAGACTGGAGTGGGTCGCAACTATTAGTAGTGGTGGTCGTTCCACCTACTAT
 CCAGACAGTGTGAAGGGTCGATTACCGTCTCCAGAGACAGTGCCAAGAACACCCTATAC
 CTGCAAATGGACAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATTTATTACTGTGCAAACTAATC
 AGTCCCTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA.

5

Se describe además en el presente documento un polinucleótido aislado que comprende o que consiste en las secuencias de nucleótidos:

i) GACATCACGATGACCCAGTCTCCATCTTCCATATATGCATCTCTGGGAGAGAGAGTCACT
 10 ATCACTTGCAAGGCGAGTCAGGACATTAATAGCTATTTAACCTGGTTCCAGCAGAAACCA
 GGGAAATCTCCTAAGATCCTGATCTATCTTGAAATAGATTGGTAGATGGGGTCCCATCA
 AGGTTCACTGGCAGTGGATCTGGGCAAGATTATGCTCTCACCATCAGCAGTCTGGAATAT
 GAAGATATGGGAATTTATTATTGTCTACAATATGATGACTTTCCGTACACGTTCCGAGGG
 15 GGGACCAAGCTGGAATAAAAA; y/o

15

ii)

GAAGTGCAGTTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTC
 20 TCCTGTGCAGCCTCTGGATTCAGTCTCAGTACCCATGCCATGTCTTGGGTTCCGAGACT
 CCGGAGAAGAGGCTGGAGTGGGTCGCAACCATTAGTAGTGGTGGTCGTTCCACCTACTAT
 CCAGACAGTGTGAAGGGTCGATTCACTATCTCCAGAGACAATGTCAAGAACACCCTATAT
 CTGCAACTGAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCGTGATTTCTGTGCAAGACTAATC
 25 AGTACCTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA.

25

El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención inhibe la actividad de TG2. El anticuerpo de la invención inhibe la actividad enzimática de TG2 y así previene que funcione para reticular restos de lisina y glutamina con enlaces isopeptídicos de Nε-(γ-glutamil)lisina. Se prefiere que la actividad enzimática de TG2 sea completamente abolida, pero se prevé que la inhibición puede ser inhibición parcial en casos donde esta inhibición parcial sea suficiente para proporcionar un resultado terapéutico o no terapéutico útil. El experto sería capaz de determinar si el grado de inhibición es eficaz para lograr el resultado deseado.

30

Se prefiere que el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo sea específico para la inhibición de TG2. Así, se prefiere que el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo no inhiba actividad de TG1, TG3, TG13 y/o TG7. Se prevé que un anticuerpo que inhibe eficazmente actividad de TG2 pero es suficientemente selectivo de manera que no inhibe significativamente actividad de TG1, TG3, TG13 y/o TG7 pueda ser particularmente útil en medicina. Así, se prefiere que el anticuerpo inhiba exclusivamente actividad de TG2.

35

También se describe en el presente documento un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo cuya unión a TG2 (por ejemplo, TG2 humana) se inhibe o reduce cuando un anticuerpo según cualquier aspecto precedente se une a TG2 (por ejemplo, TG2 humana).

40

Así, se describe en el presente documento cualquier anticuerpo que se une selectivamente a un epítipo dentro de la región de TG2 de forma que pueda competir con y romper la unión de cualquier anticuerpo de los aspectos precedentes.

45

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un compuesto que comprende un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de la presente invención y un resto adicional.

50

El resto adicional puede ser un resto directamente o indirectamente citotóxico.

Por "directamente citotóxico" los presentes inventores incluyen el significado de que el resto es uno que en sí mismo es citotóxico. Por "indirectamente citotóxico" los presentes inventores incluyen el significado de que el resto es uno, aunque no es en sí mismo citotóxico, puede inducir citotoxicidad, por ejemplo, por su acción sobre una molécula adicional o por acción adicional sobre él.

55

El resto citotóxico se puede seleccionar de, pero no se limita a, el grupo que comprende un agente quimioterapéutico directamente citotóxico, un polipéptido directamente citotóxico, un resto que es capaz de convertir un profármaco relativamente no tóxico en un fármaco citotóxico, un radiosensibilizador, un ácido nucleico directamente citotóxico, una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido directamente o indirectamente citotóxico, una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido terapéutico, o un átomo radiactivo. Se prevé que el átomo radiactivo pueda ser una cualquiera de fósforo-32, yodo-125, yodo-131, indio-111, renio-186, renio-188 o itrio-90.

60

Los agentes quimioterapéuticos citotóxicos, tales como agentes antineoplásicos, incluyen: agentes alquilantes que incluyen mostazas nitrogenadas tales como mecloretamina (HN₂), ciclofosfamida, ifosfamida, melfalán (L-sarcolisina)

65

y clorambucilo; etileniminas y metilmelaminas tales como hexametilmelamina, tiotepa; alquilsulfonatos tales como busulfán; nitrosoureas tales como carmustina (BCNU), lomustina (CCNU), semustina (metil-CCNU) y estreptozocina (estreptozotocina); y triazenos tales como decarbazina (DTIC; dimetiltriazenoimidazol-carboxamida); antimetabolitos que incluyen análogos de ácido fólico tales como metotrexato (ametofterina); análogos de pirimidina tales como fluorouracilo (5-fluorouracilo; 5-FU), floxuridina (fluorodesoxiuridina; FUdR) y citarabina (arabinósido de citosina); y análogos de purina e inhibidores relacionados tales como mercaptopurina (6-mercaptopurina; 6-MP), tioguanina (6-tioguanina; TG) y pentostatina (2'-desoxicoformicina). Productos naturales que incluyen alcaloides de la vinca tales como vinblastina (VLB) y vincristina; epipodofilotoxinas tales como etopósido y tenipósido; antibióticos tales como dactinomicina (actinomicina D), daunorubicina (daunomicina; rubidomicina), doxorubicina, bleomicina, plicamicina (mitramicina) y mitomicina (mitomicina C); enzimas tales como L-asparaginasa; y modificadores de la respuesta biológica tales como alfenomas de interferón. Diversos agentes que incluyen complejos de coordinación de platino tales como cisplatino (*cis*-DDP) y carboplatino; antracenodiona tal como mitoxantrona y antraciclina; urea sustituida tal como hidroxiurea; derivado de metilhidracina tal como procarbazona (N-metilhidracina, MIH); y supresor adrenocortical tal como mitotano (*o,p'*-DDD) y aminoglutetimida; taxol y análogos/derivados; y agonistas/antagonistas de hormona tales como flutamida y tamoxifeno.

Diversos de estos agentes se han unido previamente a anticuerpos y otros agentes de administración a sitio diana, y así los compuestos de la invención que comprenden estos agentes pueden ser fácilmente preparados por el experto en la técnica. Por ejemplo, se puede usar conjugación de carbodiimida (Bauminger y Wilchek (1980) *Methods Enzymol.* 70, 151-159) para conjugar una variedad de agentes, que incluyen doxorubicina, con anticuerpos.

Los péptidos citotóxicos o restos de polipéptidos incluyen cualquier resto que conduzca a muerte celular. Se conocen bien en la técnica los restos de péptidos citotóxicos y de polipéptidos e incluyen, por ejemplo, ricina, abrina, exotoxina de *Pseudomonas*, factor tisular y similares. También se conocen en la técnica métodos de unión a los restos de direccionamiento, tales como anticuerpos. El uso de ricina como agente citotóxico se describe en Burrows y Thorpe (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 8996-9000, y el uso de factor tisular, que conduce a la coagulación localizada de la sangre y el infarto de un tumor, se ha descrito por Ran *et al.* (1998) *Cancer Res.* 58, 4646-4653 y Huang *et al.* (1997) *Science* 275, 547-550. Tsai *et al.* (1995) *Dis. Colon Rectum* 38, 1067-1074 describe la cadena A de abrina conjugada con un anticuerpo monoclonal. Se describen otras proteínas inactivantes del ribosoma como agentes citotóxicos en el documento de patente WO 96/06641. También se puede usar exotoxina de *Pseudomonas* como resto de polipéptido citotóxico (véase, por ejemplo, Aiello *et al.* (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 10457-10461).

También pueden ser útiles ciertas citocinas, tales como TNF α y IL-2, como agentes citotóxicos.

También pueden ser citotóxicos ciertos átomos radiactivos si se administran en dosis suficientes. Así, el resto citotóxico puede comprender un átomo radiactivo que, en uso, administra una cantidad suficiente de radiactividad al sitio diana de manera que sea citotóxico. Los átomos radiactivos adecuados incluyen fósforo-32, yodo-125, yodo-131, indio-111, renio-186, renio-188 o itrio-90, o cualquier otro isótopo que emita suficiente energía para destruir las células vecinas, orgánulos o ácido nucleico. Preferentemente, los isótopos y la densidad de átomos radiactivos en el compuesto de la invención son tales que se administra una dosis de más de 4000 cGy (preferentemente al menos 6000, 8000 o 10000 cGy) al sitio diana y, preferentemente, a las células en el sitio diana y sus orgánulos, particularmente el núcleo. El átomo radiactivo se puede unir al anticuerpo de formas conocidas. Por ejemplo, se puede unir EDTA u otro agente quelante al anticuerpo y se usa para unir ^{111}In o ^{90}Y . Se pueden marcar restos de tirosina con ^{125}I o ^{131}I .

El resto citotóxico puede ser un polipéptido indirectamente citotóxico adecuado. En una realización particularmente preferida, el polipéptido indirectamente citotóxico es un polipéptido que tiene actividad enzimática y puede convertir un profármaco relativamente no tóxico en un fármaco citotóxico. Cuando el resto de direccionamiento es un anticuerpo, este tipo de sistema se denomina frecuentemente ADEPT (terapia de enzima-profármaco dirigido a anticuerpo). El sistema requiere que el resto de direccionamiento localice la porción enzimática en el sitio deseado en el cuerpo del paciente (es decir, el sitio que expresa MR, tal como nuevo tejido vascular asociado a un tumor) y después de dejar el tiempo para que la enzima localice el sitio, administrar un profármaco que es un sustrato para la enzima, siendo el producto final de la catálisis un compuesto citotóxico. El objeto del enfoque es maximizar la concentración de fármaco en el sitio deseado y minimizar la concentración de fármaco en tejidos normales (véase Senter, P.D. *et al.* (1988) "Anti-tumor effects of antibody-alkaline phosphatase conjugates in combination with etoposide phosphate" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 4842-4846; Bagshawe (1987) *Br. J. Cancer* 56, 531-2; y Bagshawe, K.D. *et al.* (1988) "A cytotoxic agent can be generated selectively at cancer sites" *Br. J. Cancer* 58, 700-703.)

La sustancia citotóxica puede ser cualquier fármaco antineoplásico existente tal como un agente alquilante; un agente que se intercala en ADN; un agente que inhibe cualquier enzima clave tal como dihidrofolato reductasa, timidina sintetasa, ribonucleótido reductasa, nucleósido cinasas o topoisomerasa; o un agente que efectúa la muerte celular interactuando con cualquier otro constituyente celular. El etopósido es un ejemplo de un inhibidor de la topoisomerasa.

Los sistemas de profármaco informados incluyen: un profármaco de mostaza de fenol activado por una β -glucuronidasa de *E. coli* (Wang *et al.*, 1992 y Roffler *et al.*, 1991); un profármaco de doxorubicina activado por una β -glucuronidasa humana (Bosslet *et al.*, 1994); profármacos de doxorubicina adicionales activados por α -galactosidasa de grano de café (Azoulay *et al.*, 1995); profármacos de daunorubicina, activados por α -D-galactosidasa de grano de café (Gesson *et al.*, 1994); un profármaco de 5-fluorouridina activado por una β -D-galactosidasa de *E. coli* (Abraham *et al.*, 1994); y profármacos de metotrexato (por ejemplo, metotrexato-alanina) activados por carboxipeptidasa A (Kuefner *et al.*, 1990, Vitols *et al.*, 1992 y Vitols *et al.*, 1995). Estos y otros se incluyen en la Tabla 1.

Tabla 1

Enzima	Profármaco
Carboxipeptidasa G2	Derivados de mostazas de ácido L-glutámico y ácido benzoico, mostazas de anilina, mostazas de fenol y mostazas de fenilendiamina; derivados fluorados de estos
Fosfatasa alcalina	Fosfato de etopósido
	Fosfato de mitomicina
Beta-glucuronidasa	Mostaza de <i>p</i> -hidroxianilina-glucurónido
	Epirubicina-glucurónido
Penicilina-V-amidasa	Adriamicina-N-fenoxiacetilo
Penicilina-G-amidasa	N-(4'-hidroxifenilacetil)palitoxina
	Doxorubicina y melfalán
Beta-lactamasa	Mostaza nitrogenada- <i>p</i> -fenilendiamina de cefalosporina; derivados de doxorubicina; derivado de vinblastina-cefalosporina, mostaza de cefalosporina; un derivado de taxol
Beta-glucosidasa	Ácido cianofenilmetil-beta-D-glucopiranosidurónico
Nitrorreductasa	5-(Azaridin-1-il)-2,4-dinitrobenzamida
Citosina desaminasa	5-Fluorocitosina
Carboxipeptidasa A	Metotrexato-alanina

(Esta tabla está adaptada de Bagshawe (1995) Drug Dev. Res. 34, 220-230, de la que se pueden obtener las referencias completas para estos diversos sistemas; el derivado de taxol se describe en Rodrigues, M.L. *et al.* (1995) Chemistry & Biology 2, 223).

Las enzimas adecuadas para formar parte de la porción enzimática de la invención incluyen: exopeptidasas, tales como carboxipeptidasas G, G1 y G2 (para profármacos de mostazas glutamílicas), carboxipeptidasas A y B (para profármacos basados en MTX) y aminopeptidasas (para profármacos de 2- α -aminocil MTC); endopeptidasas, tales como, por ejemplo, trombolisina (para profármacos de trombina); hidrolasas, tales como fosfatasas (por ejemplo, fosfatasa alcalina) o sulfatasas (por ejemplo, arilsulfatasas) (para profármacos fosfilados o sulfatados); amidasas, tales como amidasas de penicilina y arilacilamidasa; lactamasas, tales como β -lactamasas; glucosidasas, tales como β -glucuronidasa (para antraciclinas de β -glucuronomida), α -galactosidasa (para amigdalina) y β -galactosidasa (para antraciclina de β -galactosa); desaminasas, tales como citosina desaminasa (para 5FC); cinasas, tales como urocinasa y timidina cinasa (para ganciclovir); reductasas, tales como nitroreductasa (para CB1954 y análogos), azoreductasa (para mostazas de azobenceno) y DT-diaforasa (para CB1954); oxidasas, tales como glucosa oxidasa (para glucosa), xantina oxidasa (para xantina) y lactoperoxidasa; DL-racemasas, anticuerpos catalíticos y ciclodextrinas.

El profármaco es relativamente no tóxico en comparación con el fármaco citotóxico. Normalmente, tiene menos de 10 % de la toxicidad, preferentemente menos de 1 % de la toxicidad, como se mide en un ensayo de citotoxicidad *in vitro* adecuado. Es probable que el resto que es capaz de convertir un profármaco en un fármaco citotóxico sea activo en aislamiento del resto del compuesto, pero solo es necesario que sea activo cuando (a) esté en combinación con el resto del compuesto y (b) el compuesto se una a, sea adyacente a o sea internalizado en células diana.

Cuando cada resto del compuesto es un polipéptido, las dos porciones se pueden unir juntas por cualquiera de las formas convencionales de reticulación de polipéptidos, tales como las generalmente descritas en O'Sullivan *et al.* (1979) Anal. Biochem. 100, 100-108. Alternativamente, el compuesto se puede producir como un compuesto de fusión por técnicas de ADN recombinante por las cuales una longitud de ADN comprende regiones respectivas que codifican los dos restos del compuesto de la invención, ya sean adyacentes entre sí o separadas por una región que codifica un péptido conector que no destruye las propiedades deseadas del compuesto. Posiblemente, las dos porciones del compuesto se pueden solapar completa o parcialmente.

El resto citotóxico puede ser un radiosensibilizador. Los radiosensibilizadores incluyen fluoropirimidinas, análogos de timidina, hidroxiurea, gemcitabina, fludarabina, nicotinamida, pirimidinas halogenadas, 3-aminobenzamida, 3-aminobenzodiamida, etanixadol, pimonidazol y misonidazol (véanse, por ejemplo, McGinn *et al.* (1996) J. Natl. Cancer Inst. 88, 1193-11203; Shewach y Lawrence (1996) Invest. New Drugs 14, 257-263; Horsman (1995) Acta Oncol. 34, 571-587; Shenoy y Singh (1992) Clin. Invest. 10, 533-551; Mitchell *et al.* (1989) Int. J. Radiat. Biol. 56, 827-836; Iliakis y Kurtzman (1989) Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 16, 1235-1241; Brown (1989) Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 16, 987-993; Brown (1985) Cancer 55, 2222-2228).

Por tanto, la administración de genes a células puede radiosensibilizarlas, por ejemplo, la administración del gen p53 o ciclina D (Lang *et al.* (1998) J. Neurosurg. 89, 125-132; Coco Martin *et al.* (1999) Cancer Res. 59, 1134-1140).

El resto adicional puede ser uno que se vuelve citotóxico, o libera un resto citotóxico, tras la irradiación. Por ejemplo, el isótopo de boro-10, cuando se irradia apropiadamente, libera partículas α que son citotóxicas (véanse, por ejemplo, el documento de patente US 4.348.376 de Goldenberg; Primus *et al.* (1996) Bioconjug. Chem. 7, 532-535).

Similarmente, el resto citotóxico puede ser uno que es útil en terapia fotodinámica, tal como fotofrina (véase, por ejemplo, Dougherty *et al.* (1998) J. Natl. Cancer Inst. 90, 889-905).

El resto citotóxico puede ser una molécula de ácido nucleico que es directamente o indirectamente citotóxica. Por ejemplo, la molécula de ácido nucleico puede ser un oligonucleótido antisentido que, tras la localización en el sitio diana, es capaz de entrar en las células y conducir a su muerte. El oligonucleótido, por tanto, puede ser uno que previene la expresión de un gen esencial, o uno que conduce a un cambio en la expresión génica que provoca apoptosis.

Ejemplos de oligonucleótidos adecuados incluyen los dirigidos a bcl-2 (Ziegler *et al.* (1997) J. Natl. Cancer Inst. 89, 1027-1036), y ADN polimerasa α y topoisomerasa II α (Lee *et al.* (1996) Anticancer Res. 16, 1805-1811).

Pueden ser útiles los ácidos nucleicos peptídicos en lugar de los ácidos nucleicos convencionales (véase Knudsen y Nielsen (1997) Anticancer Drugs 8, 113-118).

En una realización del compuesto de la invención, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo y el resto citotóxico pueden ser polipéptidos que están fusionados. Así, se describe en el presente documento un polinucleótido que codifica dicho compuesto.

En una realización adicional, el resto adicional puede ser un resto fácilmente detectable. Se prevé que el resto fácilmente detectable pueda comprender una cantidad adecuada de uno cualquiera de yodo-123, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, tecnecio-99m, gadolinio, manganeso o hierro.

Por un "resto fácilmente detectable" los presentes inventores incluyen el significado de que el resto es uno que, cuando se localiza en el sitio diana tras la administración del compuesto de la invención a un paciente, se puede detectar, normalmente no invasivamente desde el exterior del cuerpo y localizar el sitio de la diana. Así, los compuestos de esta realización de la invención son útiles en obtención de imágenes y diagnóstico.

Normalmente, el resto fácilmente detectable es o comprende un átomo radiactivo que es útil en obtención de imágenes. átomos radiactivos adecuados Los incluyen tecnecio-99m o yodo-123 para estudios escintigráficos. Otros restos fácilmente detectables incluyen, por ejemplo, etiquetas de espín para imagen por resonancia magnética (IRM) tales como yodo-123 otra vez, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro. Claramente, el compuesto de la invención debe tener suficiente de los isótopos atómicos apropiados con el fin de que la molécula sea fácilmente detectable.

Se pueden incorporar radiomarcas u otras marcas en el compuesto de la invención de formas conocidas. Por ejemplo, si el anticuerpo es un polipéptido se puede biosintetizar o se puede sintetizar por síntesis química de aminoácido usando precursores de aminoácidos adecuados que implican, por ejemplo, flúor-19 en lugar de hidrógeno. Marcas tales como ^{99m}Tc , ^{123}I , ^{186}Rh , ^{188}Rh y ^{111}In se pueden unir, por ejemplo, mediante restos de cisteína en el anticuerpo. El itrio-90 se puede unir mediante un resto de lisina. Se puede usar el método IODOGEN (Fraker *et al.* (1978) Biochem. Biophys. Res. Comm. 80, 49-57) para incorporar yodo-123. La referencia ("Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy", J-F Chatal, CRC Press, 1989) describe otros métodos con detalle.

Se describe en el presente documento un vector que comprende cualquier polinucleótido de la invención.

Los plásmidos de vectores procariotas típico son: pUC18, pUC19, pBR322 y pBR329 disponibles de Biorad Laboratories (Richmond, CA, EE.UU.); pTrc99A, pKK223-3, pKK233-3, pDR540 y pRIT5 disponibles de Pharmacia (Piscataway, NJ, EE.UU.); vectores pBS, vectores Phagescript, vectores Bluescript, pNH8A, pNH16A, pNH18A, pNH46A disponibles de Stratagene Cloning Systems (La Jolla, CA 92037, EE.UU.).

Un plásmido de vector típico de células de mamífero es pSVL disponible de Pharmacia (Piscataway, NJ, EE.UU.). Un ejemplo de un vector de expresión de mamífero inducible es pMSG, también disponible de Pharmacia (Piscataway, NJ, EE.UU.).

Los vectores de levadura plasmídicos útiles son pRS403-406 y pRS413-416 y generalmente están disponibles de Stratagene Cloning Systems (La Jolla, CA 92037, EE.UU.). Los plásmidos pRS403, pRS404, pRS405 y pRS406 son plásmidos de integración en levadura (Ylps) e incorporan los marcadores de selección de levadura *HIS3*, *TRP1*, *LEU2* y *URA3*. Los plásmidos pRS413-416 son plásmidos centrómeros de levadura (YCps).

Se pueden usar métodos bien conocidos para los expertos en la técnica para construir vectores de expresión que contienen la secuencia codificante y, por ejemplo, controles transcripcionales o traduccionales apropiados.

- 5 Además, se describe en el presente documento una célula hospedadora que comprende cualquier polinucleótido o vector descrito en el presente documento.

Se conocen muchos sistemas de expresión, que incluyen sistemas que emplean: bacterias (por ejemplo, *E. coli* y *Bacillus subtilis*) transformadas con, por ejemplo, bacteriófago recombinante, vectores de expresión de ADN de plásmido o cósmido; levaduras (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*) transformadas con, por ejemplo, vectores de expresión en levadura; sistemas de células de insecto transformados con, por ejemplo, vectores de expresión virales (por ejemplo, baculovirus); sistemas de células de planta transfectados con, por ejemplo, vectores de expresión virales o bacterianos; sistemas de células de animal transfectadas con, por ejemplo, vectores de expresión de adenovirus.

Los vectores pueden incluir un replicón procariota, tal como Col E1 *ori*, para propagación en un procariota, aunque el vector se use para la expresión en otros tipos de células no procariotas. Los vectores también pueden incluir un promotor apropiado tal como un promotor procariota capaz de dirigir la expresión (transcripción y traducción) de los genes en una célula hospedadora bacteriana, tal como *E. coli*, transformada con ellos.

Un promotor es un elemento de control de la expresión formado por una secuencia de ADN que permite que ocurra la unión y la transcripción de ARN polimerasa. Las secuencias promotoras compatibles con hospedadores bacterianos a modo de ejemplo normalmente se proporcionan en vectores plasmídicos que contienen sitios de restricción convenientes para la inserción de un segmento de ADN descrito en el presente documento.

Se puede expresar el polinucleótido en una célula hospedadora adecuada para producir el anticuerpo o compuesto de la invención. Así, el polinucleótido se puede usar según técnicas conocidas, apropiadamente modificadas en vista de las enseñanzas contenidas en el presente documento, para construir un vector de expresión, que entonces se usa para transformar una célula hospedadora apropiada para la expresión y producción del anticuerpo o compuesto de la invención. Dichas técnicas incluyen las desveladas en las patentes de EE.UU. N.º 4.440.859; 4.530.901; 4.582.800; 4.677.063; 4.678.751; 4.704.362; 4.710.463; 4.757.006; 4.766.075; y 4.810.648.

El polinucleótido se puede unir a una amplia variedad de otras secuencias de ADN para introducción en un hospedador apropiado. El ADN acompañante dependerá de la naturaleza del hospedador, el modo de introducción del ADN en el hospedador, y si se desea mantenimiento episómico o integración.

Generalmente, el polinucleótido se inserta en un vector de expresión, tal como un plásmido, en orientación adecuada y marco de lectura correcto para la expresión. Si fuera necesario, el ADN se puede unir a las secuencias de nucleótidos de control reguladoras transcripcionales y traduccionales apropiadas reconocidas por el hospedador deseado, aunque dichos controles generalmente están disponibles en el vector de expresión. Así, la inserción de ADN se puede unir operativamente a un promotor apropiado. Los promotores bacterianos incluyen los promotores *lacI* y *lacZ* de *E. coli*, los promotores T3 y T7, el promotor *gpt*, los promotores PR y PL del fago λ , el promotor pHoA y el promotor *trp*. Los promotores eucariotas incluyen el promotor temprano inmediato del CMV, el promotor de timidina cinasa de VHS, los promotores tardíos y tempranos SV40 y los promotores de LTR retrovirales. Otros promotores adecuados serán conocidos por el experto. Las construcciones de expresión también contendrán deseablemente sitios para el inicio y la terminación de la transcripción, y en la región transcrita, un sitio de unión al ribosoma para la traducción (Hastings *et al.*, patente internacional N.º WO 98/16643, publicada el 23 de abril de 1998).

Entonces, el vector se introduce en el hospedador mediante técnicas convencionales. Generalmente, no todos los hospedadores se transformarán por el vector y, por tanto, será necesario seleccionar las células hospedadoras transformadas. Una técnica de selección implica incorporar en el vector de expresión un marcador de secuencia de ADN, con cualquier elemento de control necesario, que codifique un rasgo de selección en la célula transformada. Estos marcadores incluyen dihidrofolato reductasa, G418 o resistencia a neomicina para cultivo celular eucariota, y tetraciclina, kanamicina o genes de resistencia a ampicilina para cultivar en *E. coli* y otras bacterias. Alternativamente, el gen para dicho rasgo de selección puede estar en otro vector, que se usa para co-transformar la célula hospedadora deseada.

Entonces, las células hospedadoras que han sido transformados por el ADN recombinante se cultivan durante un tiempo suficiente y en condiciones apropiadas conocidas por los expertos en la técnica en vista de las enseñanzas desveladas en el presente documento para permitir la expresión del polipéptido, que entonces se puede recuperar.

El anticuerpo o compuesto se puede recuperar y purificar de cultivos celulares recombinantes por métodos bien conocidos que incluyen precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción con ácido, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía en fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía de hidroxilapatita y cromatografía de lectina. Lo más preferentemente, se

emplea cromatografía líquida de alta resolución ("HPLC") para la purificación.

Se describe aún más en el presente documento una línea estable de células hospedadoras que produce un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo según cualquiera aspecto precedente o un compuesto de la invención resultante de la incorporación en la línea celular de un polinucleótido exógeno o vector descrito en el presente documento.

La célula hospedadora puede ser cualquier procariota o eucariota. Las células bacterianas son las células hospedadoras procariotas preferidas y normalmente son una cepa de *Escherichia coli* tal como, por ejemplo, las cepas CH5 de *E. coli* disponibles de Bethesda Research Laboratories Inc., Bethesda, MD, EE.UU., y RR1 disponible de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) de Rockville, MD, EE.UU. (Nº ATCC 31343). Las células hospedadoras eucariotas preferidas incluyen levadura y células de mamífero, preferentemente células de vertebrados tales como las de un ratón, rata, mono o línea de células fibroblásticas humanas. Las células hospedadoras de levadura incluyen YPH499, YPH500 y YPH501, que generalmente están disponibles de Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, EE.UU.. Las células hospedadoras de mamífero preferidas incluyen células de ovario de hámster chino (CHO) disponibles de ATCC como CCL61, células NIH/3T3 de embrión de ratón NIH Swiss disponibles de ATCC como CRL 1658, y células COS-1 derivadas de riñón de mono disponibles de ATCC como CRL 1650.

Además de las propias células hospedadoras transformadas, la presente divulgación también contempla un cultivo de las células, preferentemente un cultivo monoclonal (clonalmente homogéneo), o un cultivo derivado de un cultivo monoclonal, en un medio nutritivo.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición/formulación farmacéutica que comprende un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo según cualquier aspecto de la invención, o un polinucleótido según la invención, o un compuesto según la invención, en mezcla con un excipiente, adyuvante, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

Por "farmacéuticamente aceptable" se incluye que la formulación es estéril y libre de pirógenos. Se conocen bien en la técnica de la farmacia los vehículos farmacéuticos adecuados. El (Loa) vehículo(s) deben ser "aceptables", en el sentido de ser compatibles con el compuesto de la invención y no perjudiciales para los receptores del mismo. Normalmente, los vehículos serán agua o solución salina que será estéril y libre de pirógenos; sin embargo, se pueden usar otros vehículos aceptables.

En una realización, la composición/formulación farmacéutica de la invención puede comprender además un principio activo adicional, es decir, un agente terapéuticamente activo distinto del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención. Se prevé que uno o más agentes activos adicionales puedan aumentar la eficacia de la composición/formulación farmacéutica contra la enfermedad dirigida según convenga. En una realización, el principio activo adicional puede ser un agente terapéutico seleccionado de un agente implicado en reducir la cicatrización de tejido, reducir los ovillos neurofibrilares y/o reducir la resistencia a quimioterapia.

En una realización preferida, la composición/formulación farmacéutica se puede formular para administración intravenosa, intramuscular o subcutánea a un paciente.

Se prefiere que la composición/formulación farmacéutica comprenda una cantidad del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la invención eficaz para tratar las diversas afecciones descritos anteriormente y adicionalmente más adelante.

Un aspecto adicional de la invención proporciona un kit de partes que comprende un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo según cualquier aspecto de la invención, o un polinucleótido según la invención, o un compuesto de la invención; y uno o más agentes adicionales. Se prevé que los agentes adicionales puedan ser uno cualquiera de los principios activos adicionales descritos anteriormente, o cualquier otro agente adecuado.

En otro aspecto adicional la invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo según cualquier aspecto de la invención, o un polinucleótido de la invención, o un compuesto, composición/formulación farmacéutica, para su uso en medicina.

TG2 es claramente una enzima multifunción y se ha asociado a un intervalo de funciones celulares que incluyen estabilización y transporte nuclear [28, 29], endocitosis [30, 31], señalización de GTPasa [32-34], apoptosis [35, 36], adhesión celular [37-39], integridad citoesquelética [28, 29] y estabilización de ECM [9]. Un inhibidor de molécula pequeña puede impedir todas estas funciones ya que en general tienen acceso libre al espacio extracelular y el interior de la célula. Un anticuerpo no puede entrar en la célula y como tales no se afectarían las funciones intracelulares de TG2 por el anticuerpo específico de TG2 administrado *in vivo*.

Y, lo que es más importante, la mayoría de las funciones patológicas de TG2 parecen ser extracelulares, tales como su función en la cicatrización de tejido y fibrosis, celiaquía y cáncer. Así, el uso de un anticuerpo que se une

selectivamente a TG2 en medicina traería un grado adicional de selectividad que prevendría los efectos intracelulares no deseados, que se podrían traducir en efectos secundarios no deseados de la terapia.

Por tanto, los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos de la invención ofrecerían ventajas clínicas con respecto a los fármacos previamente disponibles, por ejemplo, en el bloqueo de TG2 en enfermedades fibróticas y de cicatrización donde TG2 reticula proteínas de ECM, en celiacía donde la gliadina se desamida en el espacio extracelular y en quimiorresistencia en cáncer donde la adhesión celular parece ser el factor protector. Además, los pequeños fragmentos de anticuerpos de la invención, por ejemplo, los fragmentos Fab, podrían atravesar la barrera hematoencefálica e inhibir TG2 en el cerebro y posiblemente ofrecer terapias eficaces para patologías neurológicas con participación de TG2.

Así, se describe además en el presente documento un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo según cualquier aspecto de la invención, o un polinucleótido de la invención, o un compuesto, composición/formulación farmacéutica, o kit de partes de la invención, para su uso en reducir o inhibir la actividad enzimática de TG2 en un individuo en necesidad del mismo.

Se describe además en el presente documento el uso de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo según cualquier aspecto de la invención, o un polinucleótido de la invención, o un compuesto, composición/formulación farmacéutica, o kit de partes de la invención, en la fabricación de un medicamento para reducir o inhibir la actividad enzimática de TG2 en un individuo en necesidad del mismo.

También se describe en el presente documento un método de reducción o inhibición de la actividad enzimática de TG2 en un individuo en necesidad del mismo, comprendiendo el método la etapa de administrar un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, o una variante, fusión o su derivado según cualquier aspecto de la invención, o un polinucleótido de la invención, o un compuesto, composición/formulación farmacéutica, o kit de partes de la invención, al individuo.

Un aspecto adicional de la invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo según cualquier aspecto de la invención, o un polinucleótido de la invención, o un compuesto, composición/formulación farmacéutica, para su uso en el tratamiento y/o diagnóstico de celiacía, curación anormal de heridas, cicatrización, cicatrices hipertróficas, cicatrización ocular, enfermedad inflamatoria del intestino, degeneración macular, psoriasis, enfermedades relacionadas con la fibrosis (por ejemplo, fibrosis hepática, fibrosis pulmonar tal como enfermedad pulmonar intersticial y enfermedad pulmonar fibrótica, fibrosis cardíaca, fibrosis de la piel, mielofibrosis, fibrosis renal tal como glomeruloesclerosis y fibrosis tubulointersticial), aterosclerosis, reestenosis, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades neurodegenerativas/neurológicas (por ejemplo, enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad por poliglutaminas, atrofia muscular espinobulbar, atrofia dentato-rubro-pálido-luisiana, ataxias espinocerebelosas 1, 2, 3, 6, 7 y 12, atrofia rubropálida, parálisis espinocerebelosa), glioblastomas tales como glioblastoma en síndrome de Li-Fraumeni y glioblastoma esporádico, melanomas malignos, adenocarcinomas ductales pancreáticos, leucemia mieloide, leucemia mielógena aguda, síndrome mielodisplásico, síndrome mieloproliferativo, cáncer ginecológico, sarcoma de Kaposi, enfermedad de Hansen y/o colitis colagenosa.

También se describe en el presente documento el uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo según cualquier aspecto de la invención, o un polinucleótido de la invención, o un compuesto, composición/formulación farmacéutica, o kit de partes de la invención, en la fabricación de un medicamento para tratar y/o diagnosticar celiacía, curación anormal de heridas, cicatrización, esclerodermia, queloides y cicatrices hipertróficas, cicatrización ocular, enfermedad inflamatoria del intestino, degeneración macular, oftalmopatía de Graves, ergotismo inducido por fármacos, psoriasis, enfermedades relacionadas con la fibrosis (por ejemplo, fibrosis hepática, fibrosis pulmonar tal como enfermedad pulmonar intersticial y enfermedad pulmonar fibrótica, fibrosis cardíaca, fibrosis de la piel, mielofibrosis, fibrosis renal tal como glomeruloesclerosis y fibrosis tubulointersticial), aterosclerosis, reestenosis, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades neurodegenerativas/neurológicas (por ejemplo, enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad por poliglutaminas, atrofia muscular espinobulbar, atrofia dentato-rubro-pálido-luisiana, ataxias espinocerebelosas 1, 2, 3, 6, 7 y 12, atrofia rubropálida, parálisis espinocerebelosa), y/o cáncer (por ejemplo, glioblastomas tales como glioblastoma en síndrome de Li-Fraumeni y glioblastoma esporádico, melanomas malignos, adenocarcinomas ductales pancreáticos, leucemia mieloide, leucemia mielógena aguda, síndrome mielodisplásico, síndrome mieloproliferativo, cáncer ginecológico, sarcoma de Kaposi, enfermedad de Hansen, colitis colagenosa).

Se describe además en el presente documento un método de tratamiento de y/o diagnóstico de celiacía, curación anormal de heridas, cicatrización, esclerodermia, queloides y cicatrices hipertróficas, cicatrización ocular, enfermedad inflamatoria del intestino, degeneración macular, oftalmopatía de Graves, ergotismo inducido por fármacos, psoriasis, enfermedades relacionadas con la fibrosis (por ejemplo, fibrosis hepática, fibrosis pulmonar tal como enfermedad pulmonar intersticial y enfermedad pulmonar fibrótica, fibrosis cardíaca, fibrosis de la piel, mielofibrosis, fibrosis renal tal como glomeruloesclerosis y fibrosis tubulointersticial), aterosclerosis, reestenosis, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades neurodegenerativas/neurológicas (por

ejemplo, enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad por poliglutaminas, atrofia muscular espinobulbar, atrofia dentato-rubro-pálido-luisiana, ataxias espinocerebelosas 1, 2, 3, 6, 7 y 12, atrofia rubropálida, parálisis espinocerebelosa) y/o cáncer (por ejemplo, glioblastomas tales como glioblastoma en síndrome de Li-Fraumeni y glioblastoma esporádico, melanomas malignos, adenocarcinomas ductales pancreáticos, leucemia mieloide, leucemia mielógena aguda, síndrome mielodisplásico, síndrome mieloproliferativo, cáncer ginecológico, sarcoma de Kaposi, enfermedad de Hansen, colitis colagenosa) en un paciente, comprendiendo el método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo según cualquier aspecto de la invención, o un polinucleótido de la invención, o un compuesto, composición/formulación farmacéutica, o kit de partes de la invención, al paciente.

Por "tratamiento" los presentes inventores incluyen tanto el tratamiento terapéutico como profiláctico de un sujeto/paciente. El término "profiláctico" se usa para englobar el uso de un anticuerpo, medicamento, compuesto, composición, o kit descrito en el presente documento que o bien previene o bien reduce la probabilidad de aparición o desarrollo de una afección o trastorno (tal como un trastorno relacionado con fibrosis) en un individuo.

Se prefiere que el paciente sea un ser humano, pero el paciente puede ser cualquier otro mamífero que se pueda beneficiar del tratamiento. Por ejemplo, el paciente puede ser un ratón, una rata, un hámster, un conejo, un gato, un perro, una cabra, una oveja, un mono o un primate superior.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz", o "cantidad eficaz", o "terapéuticamente eficaz", como se usa en el presente documento, se refiere a la cantidad que proporciona un efecto terapéutico para una afección y pauta de administración dadas. Esta es una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir un efecto terapéutico deseado en asociación con el aditivo y diluyente requeridos, es decir, un excipiente o vehículo de administración. Además, pretende significar una cantidad suficiente para reducir o prevenir un déficit clínicamente significativo en la actividad, función y respuesta del hospedador. Alternativamente, una cantidad terapéuticamente eficaz es suficiente para provocar una mejora en una afección clínicamente significativa en un hospedador, por ejemplo, un mamífero.

Los agentes (es decir, anticuerpo, fragmento de unión al antígeno, variante, fusión o su derivado), medicamentos, compuestos, composiciones/formulaciones farmacéuticas y kits de la invención se pueden administrar usando un sistema de administración de fármacos inyectable de liberación sostenida. Estos se diseñan específicamente para reducir la frecuencia de inyecciones. Un ejemplo de dicho sistema es Nutropin Depot que encapsula hormona de crecimiento humana recombinante (rhGH) en microesferas biodegradables que, una vez inyectada, liberan rhGH lentamente durante un periodo sostenido. Preferentemente, la administración se realiza por vía intramuscular (i.m.) y/o por vía subcutánea (s.c.) y/o por vía intravenosa (i.v.).

Los agentes, medicamentos, compuestos, composiciones/formulaciones farmacéuticas y kits de la invención se pueden administrar por un dispositivo quirúrgicamente implantado que libera el fármaco directamente al sitio requerido. Por ejemplo, Vitrasert libera ganciclovir directamente en el ojo para tratar retinitis por CMV. La aplicación directa de este agente tóxico al sitio de enfermedad logra terapia eficaz sin los significativos efectos secundarios sistémicos del fármaco.

Preferentemente, los medicamentos y/o composiciones/formulaciones farmacéuticas de la presente invención son una unidad dosificación que contiene una dosis diaria o unidad, subdosis diaria o una fracción apropiada de la misma, del (de los) principio(s) activo(s).

Los agentes, medicamentos, compuestos, composiciones farmacéuticas y kits de la invención se administrarán normalmente por cualquier vía parenteral, en forma de una composición farmacéutica que comprende el (los) principio(s) activo(s), opcionalmente en forma de un ácido orgánico, o inorgánico, no tóxico, o base, sal de adición, en una forma de dosificación farmacéuticamente aceptable. Dependiendo del trastorno y el paciente que se va a tratar, así como la vía de administración, se pueden administrar las composiciones a dosis variables.

En terapia humana, los agentes, medicamentos, compuestos, composiciones/formulaciones farmacéuticas y kits de la invención se pueden administrar solos, pero generalmente se administrarán en mezcla con un excipiente, diluyente o vehículo farmacéutico adecuado seleccionado con respecto a la vía de administración prevista y la práctica farmacéutica estándar.

Los agentes, medicamentos, compuestos, composiciones/formulaciones farmacéuticas y kits de la invención se pueden administrar por vía parenteral, por ejemplo, por vía intravenosa, por vía intrarterial, por vía intraperitoneal, por vía intratecal, por vía intramuscular o por vía subcutánea, o se pueden administrar por técnicas de infusión. Se usan mejor en forma de una solución acuosa estéril que puede contener otras sustancias, por ejemplo, sales suficientes o glucosa para hacer que la disolución sea isotónica con la sangre. Las soluciones acuosas deben ser adecuadamente tamponadas (preferentemente hasta un pH de desde 3 hasta 9), si fuera necesario. La preparación de formulaciones parenterales adecuadas en condiciones estériles se realiza fácilmente por técnicas farmacéuticas convencionales bien conocidas por los expertos en la técnica.

Los medicamentos y las composiciones farmacéuticas adecuados para administración parenteral incluyen soluciones para inyección estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que convierten la formulación en isotónica con la sangre del receptor previsto; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y espesantes. Los

medicamentos y las composiciones farmacéuticas se pueden presentar en recipientes de dosis unitaria o multi-dosis, por ejemplo, ampollas y viales sellados, y se pueden almacenar en una condición secada por congelación (liofilizada) que solo requiere la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo, agua para inyección, inmediatamente antes de uso. Se pueden preparar soluciones o suspensiones para inyección extemporánea a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos del tipo previamente descrito.

Para administración parenteral a pacientes humanos, el nivel diario de dosificación de los agentes, medicamentos y composiciones farmacéuticas de la invención será normalmente desde 1 µg hasta 10 mg por adulto por día administrado en dosis únicas o divididas. El médico determinará en cualquier caso la dosificación real que será la más adecuada para cualquier paciente individual y variará con la edad, peso y respuesta del paciente particular. Las dosificaciones anteriores son a modo de ejemplo del caso medio. Puede haber, por supuesto, casos individuales donde se merezcan intervalos de dosificación más altos o más bajos, y dichos están dentro del alcance de la presente invención.

Normalmente, los medicamentos, composiciones/formulaciones farmacéuticas y kits de la invención contendrán el agente de la invención a una concentración de entre aproximadamente 2 mg/ml y 150 mg/ml o entre aproximadamente 2 mg/ml y 200 mg/ml. En una realización preferida, los medicamentos, composiciones/formulaciones farmacéuticas y kits de la invención contendrán el agente de la invención a una concentración de 10 mg/ml.

Generalmente, en seres humanos, la administración parenteral de los agentes, medicamentos, compuestos, composiciones/formulaciones farmacéuticas y kits de la invención es la vía preferida, que es la más conveniente.

Para uso veterinario, los agentes, medicamentos, compuestos, composiciones/formulaciones farmacéuticas y kits de la invención se administran como una formulación adecuadamente aceptable según la práctica veterinaria normal y el veterinario determinará la pauta posológica y la vía de administración que será la más apropiada para un animal particular.

La presente invención también incluye composiciones/formulaciones farmacéuticas que comprenden sales de adición de ácido o de base farmacéuticamente aceptables de los restos de unión de polipéptido de la presente invención. Los ácidos que se usan para preparar las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables de los compuestos de base anteriormente mencionados útiles en la presente invención son los que forman sales de adición de ácido no tóxicas, es decir, sales que contienen aniones farmacológicamente aceptables, tales como las sales clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, nitrato, sulfato, bisulfato, fosfato, fosfato ácido, acetato, lactato, citrato, citrato ácido, tartrato, bitartrato, succinato, maleato, fumarato, gluconato, sacarato, benzoato, metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, *p*-toluenosulfonato y pamoato [es decir, 1,1'-metileno-bis-(2-hidroxi-3-naftoato)], entre otras.

También se pueden usar sales de adición de base farmacéuticamente aceptables para producir formas de sal farmacéuticamente aceptables de los agentes (es decir, anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo) según la presente invención.

Las bases químicas que se pueden usar como reactivos para preparar las sales de base farmacéuticamente aceptables de los presentes agentes que son ácidos en la naturaleza son las que forman sales de base no tóxicas con dichos compuestos. Dichas sales de base no tóxicas incluyen, pero no se limitan a, las derivadas de dichos cationes farmacológicamente aceptables tales como cationes de metal alcalino (por ejemplo, potasio y sodio) y cationes de metal alcalinotérreo (por ejemplo, calcio y magnesio), sales de adición de amonio o de amina solubles en agua tales como N-metilglucamina-(meglumina), y el alcanolammonio inferior y otras sales de base de aminas orgánicas farmacéuticamente aceptables, entre otras.

Los agentes y/o restos de unión de polipéptido de la invención se pueden liofilizar para el almacenamiento y reconstituir en un vehículo adecuado antes de uso. Se puede emplear cualquier método de liofilización adecuado (por ejemplo, secado por pulverización, secado de la torta) y/o técnicas de reconstitución. Se apreciará por los expertos en la técnica que la liofilización y la reconstitución pueden conducir a grados variables de pérdida de actividad del anticuerpo (por ejemplo, con inmunoglobulinas convencionales, los anticuerpos IgM tienden a tener mayor pérdida de actividad que los anticuerpos IgG) y esos niveles de uso puede tener que ser ajustados al azar para compensar. En una realización, el resto de unión de polipéptido liofilizado (secado por congelación) pierde no más de aproximadamente 20 %, o no más de aproximadamente 25 %, o no más de aproximadamente 30 %, o no más de aproximadamente 35 %, o no más de aproximadamente 40 %, o no más de aproximadamente 45 %, o no más de aproximadamente 50 % de su actividad (antes de la liofilización) cuando se rehidrata.

Preferentemente, la invención proporciona un anticuerpo, compuesto, composición/formulación farmacéutica, kit, uso

o método en donde la cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo es entre aproximadamente 0,0001 mg/kg y 50 mg/kg del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo.

Como se aprecia por los expertos en la técnica, la cantidad precisa de un compuesto puede variar dependiendo de su actividad específica. Las cantidades de dosificación adecuadas pueden contener una cantidad predeterminada de composición activa calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el diluyente requerido. En los métodos y uso para la fabricación de composiciones de la invención, se proporciona una cantidad terapéuticamente eficaz del componente activo. El médico o veterinario experto habitual puede determinar una cantidad terapéuticamente eficaz basándose en las características del paciente, tales como edad, peso, sexo, afección, complicaciones, otras enfermedades, etc., como se conoce bien en la técnica.

Además se describen en el presente documento un método *in vitro* de reducción o inhibición de la actividad enzimática de TG2, comprendiendo el método administrar un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo según cualquier aspecto de la invención, o un polinucleótido según la invención, o un compuesto o kit de la invención, a una muestra que comprende TG2.

La "muestra" puede ser cualquier muestra obtenida de una fuente apropiada, por ejemplo, una fuente de mamífero. Por ejemplo, la muestra puede ser una muestra de tejido o de células que comprende TG2. Los tejidos a modo de ejemplo incluyen tejido obtenido del cerebro de un paciente, tubo gastrodigestivo, pulmón, páncreas, hígado, piel, riñón, ojo, corazón, vasos sanguíneos, ganglios linfáticos, columna vertebral y músculo esquelético o liso.

También se describe en el presente documento un método de reducción o inhibición de la actividad enzimática de TG2 en un individuo en necesidad del mismo, comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz de un polinucleótido que codifica un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo según cualquier aspecto de la invención, al individuo.

Se describe además en el presente documento el uso de un polinucleótido que codifica un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo según cualquier aspecto de la invención, en la fabricación de un medicamento para reducir o inhibir la actividad enzimática de TG2 en un individuo en necesidad del mismo.

En el presente documento se describe un método *in vitro* de reducción o inhibición de la actividad enzimática de TG2, comprendiendo el método administrar un polinucleótido que codifica un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo según cualquier aspecto de la invención, a una muestra que comprende TG2, por ejemplo, una muestra de tejido o de células que comprende TG2.

También se describe en el presente documento un método de producción de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno según la invención, o un compuesto de la invención que comprende un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno según la invención, comprendiendo el método expresar un polinucleótido de la invención, o cultivar una línea estable de células hospedadoras descrita en el presente documento.

Se describe en el presente documento un método de selección de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une selectivamente a una proteína transglutaminasa, comprendiendo el método la etapa de seleccionar un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une selectivamente al polipéptido que comprende una región de núcleo/dominio catalítico de transglutaminasa, pero que no comprende un barril o dominio de sándwich de transglutaminasa.

Se describe en el presente documento un método de selección de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, o un compuesto que comprende un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, comprendiendo el método la etapa de seleccionar un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une selectivamente a una secuencia de polipéptidos que consiste en la secuencia de polipéptidos de los aminoácidos 143 a 473 de TG2 humana o un fragmento de la misma.

El método se puede llevar a cabo usando presentación en fagos de anticuerpos. Se prefiere que el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo sea un anticuerpo inhibidor que inhibe la actividad catalítica de la proteína transglutaminasa.

Se describe además en el presente documento un método de producción de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une selectivamente a una proteína transglutaminasa, comprendiendo el método administrar a un animal no humano un compuesto que comprende:

- i) un polipéptido que comprende una región de núcleo/dominio catalítico de transglutaminasa, pero que no comprende un barril o dominio de sándwich de transglutaminasa, o un fragmento de la misma; y, opcionalmente,
- ii) un adyuvante.

Se prevé que el polipéptido que comprende una región de núcleo/dominio catalítico de transglutaminasa, pero que no comprende un barril o dominio de sándwich de transglutaminasa, comprenderá la tríada catalítica descrita

anteriormente, y opcionalmente, también el sitio de unión a GTP de la proteína transglutaminasa.

El método puede comprender además la etapa de seleccionar un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo basándose en su unión selectiva a una proteína transglutaminasa.

Se describe en el presente documento un método de selección de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une selectivamente a una proteína transglutaminasa, comprendiendo el método la etapa de seleccionar un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une selectivamente a una secuencia de polipéptidos que consiste en la secuencia de polipéptidos de los aminoácidos 143 a 473 de TG2 humana o un fragmento de la misma.

Se describe en el presente documento un método de producción de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno que comprende administrar a un animal no humano un compuesto que comprende:

- i) una secuencia de polipéptidos que consiste en la secuencia de polipéptidos de los aminoácidos 143 a 473 de TG2 humana o un fragmento de la misma; y opcionalmente,
- ii) un adyuvante.

El método puede comprender además la etapa de seleccionar un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo basándose en su unión selectiva a TG2, por ejemplo, TG2 humana.

Se describe además en el presente documento un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo obtenible por cualquiera de los métodos precedentes de producción o selección de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo.

Por "adyuvante" los presentes inventores incluyen cualquier agente farmacológico o inmunológico que potencie la respuesta inmunitaria del receptor al polipéptido de la invención. Se añaden adyuvantes inmunológicos a las vacunas para estimular la respuesta del sistema inmunitario al antígeno diana, pero por sí mismos no confieren inmunidad. Los ejemplos de adyuvantes incluyen emulsiones de aceite, compuestos inorgánicos tales como sales de aluminio, por ejemplo, hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio, compuestos orgánicos tales como escualeno, virosomas, o cualquier otro compuesto o compuestos adecuados como sería entendido por un experto en la técnica.

Se describe en el presente documento un polipéptido aislado que consiste en:

- i) la secuencia de polipéptidos de los aminoácidos 143 a 473 de TG2 humana;
- ii) la secuencia de polipéptidos de los aminoácidos 304 a 326 de TG2 humana;
- iii) la secuencia de polipéptidos de los aminoácidos 351 a 365 de TG2 humana;
- iv) la secuencia de polipéptidos de los aminoácidos 450 a 467 de TG2 humana; o un fragmento, derivado o peptidomimético del mismo.

También se describe en el presente documento un polinucleótido aislado que codifica el polipéptido del aspecto inmediatamente precedente.

Se describe en el presente documento un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo para su uso en el tratamiento de una afección asociada a actividad de TG2 sustancialmente como se describe en el presente documento con referencia a la descripción y figuras.

Se describe en el presente documento el uso de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo sustancialmente como se describe en el presente documento con referencia a la descripción y figuras.

Como se usa en el presente documento, las formas en singular "un", "una", "el" y "la" incluyen referentes plurales, a menos que el contexto dicte claramente de otro modo. Así, por ejemplo, referencia a "un anticuerpo" incluye una pluralidad de dichos anticuerpos y referencia a "la dosificación" incluye referencia a una o más dosificaciones y equivalentes de las mismas conocidos para los expertos en la técnica, etc.

La invención se describe ahora con más detalle como referencia a las siguientes figuras y ejemplos no limitantes.

Figura 1: Generación de una proteína recombinante TG2 humana

A: Se generó por PCR el ADNc del núcleo catalítico de TG2 a partir del vector pClineo-hTG2 y se insertó en el plásmido pET 21a. Tras la amplificación en *E. coli* este se digirió con Nhe I y Hind III para liberar el ADNc del núcleo de TG2 y se ejecutó en un 1 % de gel de agarosa (carril 3). Las bandas se dimensionaron como referencia a una escalera de 100 pb (carril 1) y un marcador de peso molecular de ADN λ (carril 2).

B: Se usó el vector de núcleo de TG2pET21a para transformar la cepa de *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL. La expresión se indujo usando IPTG durante 4 horas. La proteína del núcleo TG2 formó cuerpos insolubles que se recuperaron de los lisados por centrifugación. Estos se resolubilizaron, y el núcleo de

TG2 marcado con His de 37 kDa se purificó en una columna de níquel. Se separaron 10 ng por SDS-PAGE, se sometieron a transferencia Western y se sondaron con el anticuerpo anti-TG2 CUB7402 (carril 2) con referencia a un marcador de peso molecular Precision Plus (carril 1).

Figura 2: Respuesta inmunológica en ratones a proteína del núcleo rhTG2

A: Se tomaron muestras de sangre de prueba de 4 ratones inmunizados con núcleo catalítico el día 45 después de la primera inmunización y 10 días después del segundo refuerzo. Se diluyó sucesivamente suero y se comprobó la reactividad por ELISA contra proteína de núcleo TG2 inmovilizada.

B: La reactividad se comprobó adicionalmente por cribado contra rhTG2 humana y dominio de núcleo catalítico de rhTG2. Se fraccionaron 20, 40, 80 ng de proteína por SDS PAGE y se sometieron a transferencia Western sobre una membrana de PVDF. Esta se inmunosondó con una dilución 1:1000 de suero. La unión de anticuerpo se reveló usando HRP específica de cadena y anti-ratón. Para la referencia de tamaño se usó un marcador de peso molecular Precision Plus.

Figura 3: Reactividad de hibridomas contra los miembros de la familia TG

A: Se llevaron a cabo ELISA usando placas recubiertas con TG recombinante (100 ng / pocillo) para determinar la especificidad del tipo de TG en 109 sobrenadantes de hibridoma que mostraron buena reactividad con TG2. La unión de anticuerpo se reveló usando HRP específica de cadena y anti-ratón. Se muestra una selección al azar de los cribados que incluyen EF4, CG9 y FD8 que mostraron reactividad cruzada.

B: Se clonaron doblemente nueve hibridomas seleccionados. Se purificó IgG y se probó para la reactividad a 0,1 ug/ml contra TG1, TG2, TG3, TG7 humana recombinante y factor XIIIa usando ELISA con placas recubiertas con 100 ng de cada TG. Los datos representan el valor de DO media de 3 ELISA separados \pm EEM.

El factor XIIIa se indica en los gráficos como TG13.

Figura 4: Identificación de hibridoma con actividad inhibidora contra TG2

Se cribó medio acondicionado de 32 pocillos de hibridoma con especificidad por TG2 para sus efectos en 100 ng de actividad de rhTG2 usando el ensayo de incorporación de ^3H -putrescina. Se usó el inhibidor químico de pan TG2 cloruro de 1,3-dimetil-2-[(2-oxo-propil)tio]imidazolio como control positivo para la inhibición. Se usó RPMI (medio sin acondicionar) como control negativo. Se incluyeron 500 ng de un anticuerpo inhibidor de TG2 dirigido por Quark Biotechnology para la comparación. Los datos representan CPM medias incorporadas en 30 min a partir de al menos tres experimentos hechos por duplicado \pm EEM. Las barras mostradas en gris muestran inhibición significativa de TG2 ($p < 0,05$).

Figura 5: Mapeo de epítomos de anticuerpos inhibidores

Se unió cada anticuerpo monoclonal inhibidor a una placa de ELISA y se inmunopurificó contra una biblioteca de fagos de TG2 humana. Se rescató la unión del fago al anticuerpo, se amplificó y se sometió a 4 rondas adicionales de inmunopurificación. Entonces se secuenciaron los fragmentos de bibliotecas de TG2 en el fago y se usaron las secuencias solapantes para determinar el epítipo para cada anticuerpo. Entonces se usaron secuencias comunes entre los anticuerpos para determinar una secuencia consenso para un epítipo inhibidor particular y los anticuerpos se agruparon en consecuencia. Se identificaron 3 epítomos inhibidores.

Figura 6: Localización estructural de epítomos inhibidores con el núcleo catalítico de TG2

Se entró la secuencia de aminoácidos de TG2 en Pymol y se generó una representación gráfica 3D de la estructura en su estado activado abierto de Ca^{2+} con sitios de unión de calcio putativos (turquesa) y se mostró la tríada catalítica (gris) para referencia (panel izquierdo). Entonces se añadieron los epítomos inhibidores consenso en azul (Grupo 1 de anticuerpos - sitio AB1), rojo (Grupo 2 de anticuerpos - sitio DF4) y amarillo (Grupo 3 de anticuerpos, sitio DD9).

Figura 7: Secuencia VL de anticuerpos inhibidores

Se extrajo ARN de cada hibridoma inhibidor, se transcribió de forma inversa y se amplificó por PCR usando cebadores degenerados FR1, cebadores MH1 y MH2 y 3 cebadores de la región constante para amplificar los genes VH. Se muestran las secuencias VH y VK resultantes para AB1.

Figura 8. Eficacia de AB1 para inhibir la actividad de TG2 en un homogeneizado celular

A: Se lisaron células Hep2G y se mezclaron 45 ug de proteína con 750 ng de IgG de AB1, DH2, DD9, BB7, DC1 y EH6 durante 20 minutos. Esto se ensayó posteriormente usando el ensayo de actividad de TG por incorporación de ^3H -putrescina con muestreo durante 1 hora. Se calculó la velocidad de reacción y se expresó como un porcentaje del mismo lisado incubado con un anticuerpo al azar (MAB002). Los datos representan la inhibición media en porcentaje \pm EEM de 2 experimentos separados hechos por duplicado. * $p < 0,05$

B: Se expusieron células HepG2 a concentraciones crecientes de glucosa durante 96 horas para regular

por incremento la expresión de TG2. Se recogieron las células, se lisaron y 25 ug de lisado se fraccionaron por SDS-PAGE, se sometieron a transferencia Western y luego se inmunosondaron con 1 ng/ml de solución de IgG AB1 usando un punto final quimioluminiscente.

Figura 9. (Tabla 1): Valores comparativos de CI50 para anticuerpos inhibidores de TG2

Para determinar un valor de CI50 para cada anticuerpo contra humano, rata y ratón, se usó el ensayo de ³H-putrescina. Se usaron 100 ng de TG2 humana o 25 ng de TG2 de ratón y de rata para generar una reacción donde aproximadamente 3000 cpm de putrescina se incorporaron por hora en 10 ul de la mezcla de reacción. Entonces se aplicaron diluciones sucesivas de cada anticuerpo a partir de añadir 500 ng (concentración final 5 ug/ml) a la mezcla de reacción y se incubaron con la TG2 durante 20 minutos antes de activar la reacción. Se calcularon los valores de CI50 determinando la concentración a la que la velocidad de reacción enzimática se redujo el 50 % usando un ajuste de curva apropiado en GraphPad Prism. Los valores se expresan como la cantidad de IgG en mg/ml en la reacción que inhibiría 1 ng de TG2.

Figura 10. Actividad de TG extracelular en células HK2 en respuesta a la inhibición de TG2.

Se sembraron sobre fibronectina células HK2 y se incubaron durante 2 horas en presencia de biotina cadaverina 0,1 M con ya fuera 4 ng/ul de anticuerpo anti-TG2 humana (AB1) (**parte A**), 4 ng/ul de anticuerpo anti-TG2 humana (DC1) (**parte B**) o 400 μM del inhibidor de pan TG específico de sitio cloruro de 1,3-dimetil-2-[(2-oxo-propil)tio]imidazolio. Se midió la actividad de TG extracelular por la incorporación de biotina cadaverina en fibronectina con incorporación revelada usando extravidina-HRP y un sustrato TMB. Se midieron los cambios en la densidad óptica a 450 nm en un lector de placas de 96 pocillos. Los datos representan la DO media a 450 nm corregida hasta 1 mg de proteína celular. n = 6 pocillos por grupo experimental.

Figura 11. Comparación de la inhibición de TG2 por anticuerpo AB1 con un fragmento fab de anticuerpo inhibidor de TG2 de Quark usando un ensayo de incorporación de ³H-putrescina

Se ensayaron 100 ng de hTG2 para la actividad de TG2 basándose en la incorporación de ³H-putrescina en dimetilcaseína durante un periodo de 60 minutos con la adición de ya fuera 1 μg de un fragmento fab de un anticuerpo descrito por Quark en el documento de patente WO2006/100679 y sintetizado en la Universidad de Sheffield o 500 ng de AB1. Los datos representan la actividad media de TG como la incorporación de ³H-putrescina (CPM) ± EEM de 3 experimentos independientes hechos por duplicado.

Figura 12. Comparación en porcentaje de la inhibición de TG2 por el anticuerpo AB1 con un fragmento fab de anticuerpo inhibidor de TG2 de Quark usando un ensayo de incorporación de ³H-putrescina

Los datos de la Figura 11 se expresan alternativamente como un porcentaje de actividad de TG en cada momento de tiempo para mostrar la inactivación comparativa relativa de la actividad de TG2 por aplicación de AB1 y el fragmento fab de anticuerpo de Quark.

Figura 13. Comparación de la inhibición de TG2 por el anticuerpo AB1 con una IgG de rata recombinante del anticuerpo inhibidor de TG2 de Quark usando un ensayo de incorporación de ³H-putrescina

Se ensayaron 100 ng de hTG2 para la actividad de TG2 basándose en la incorporación de ³H-putrescina en dimetilcaseína durante un periodo de 60 minutos con la adición de ya fuera 500 ng de una versión recombinante de rata de un anticuerpo inhibidor de TG2 descrito por Quark en el documento de patente WO2006/100679 y sintetizado en Medical Research Council Technology o 500 ng de AB1. Los datos representan la actividad media de TG como la incorporación de ³H-putrescina (CPM) ± EEM de 3 experimentos independientes hechos por duplicado.

Figura 14. Comparación en porcentaje de la inhibición de TG2 por el anticuerpo AB1 con una IgG de rata recombinante del anticuerpo inhibidor de TG2 de Quark usando un ensayo de incorporación de ³H-putrescina

Los datos de la Figura 13 se expresan alternativamente como un porcentaje de actividad de TG en cada momento de tiempo para mostrar la inactivación comparativa relativa de la actividad de TG2 por aplicación de AB1 e IgG de rata recombinante de Quark.

Figura 15. Efecto de AB1 sobre los niveles de ECM en células HK2

Se midieron los niveles de colágeno maduro en células HK-2 por la incorporación de ³H-prolina en la ECM durante un periodo de 76 horas ya fuera con o sin la adición de anticuerpo inhibidor de TG2 AB1. Los datos representan la incorporación de ³H-prolina por mg de proteína celular expresados como un porcentaje del nivel medio en células sin tratar ± EEM. n=2.

Figura 16. ELISA de unión de versiones humanizadas de anticuerpos.

Se ensayaron sobrenadantes de células HEK293F cotransfectadas con diferentes combinaciones de vectores de cadenas ligeras y cadenas pesadas humanizadas en un ELISA anti-IgG humana para determinar la concentración y en un ELISA anti-huTG2. Cada sobrenadante se ensayó por triplicado y se determinó CI50. Se seleccionó la combinación más potente para estudios adicionales y como el anticuerpo humanizado candidato.

Figura 17. Ensayo de MRC Quark CTD190 en TG2 humana por ELISA.

Se sembraron placas de 96 pocillos con hTG2 (1 µg/ml) en tampón carbonato durante la noche y se realizó detección por ELISA usando 100 ng/ml de anticuerpo primario. La detección se realizó usando anti-IgG de ratón (SIGMA 3673) para CUB y anti-IgG de rata (SIGMA A5795) para Quark (ambos 1:5000). El anticuerpo de Quark preparado por MRC T reacciona con TG2 humana.

Figura 18: Se extrajo ARN del hibridoma de AB1, se transcribió de forma inversa y se amplificó por PCR usando el cebador de secuencia señal degenerada MHV4 con el cebador de la región constante de la cadena pesada MHCG1, o usando el cebador de secuencia señal degenerada MKV4 con un cebador de la región constante de la cadena ligera kappa MKC. Se muestran las secuencias VH y VK resultantes.

Figura 19: Se extrajo ARN del hibridoma de BB7, se transcribió de forma inversa y se amplificó por PCR usando el cebador de secuencia señal degenerada MHV4 con el cebador de la región constante de la cadena pesada MHCG1, o usando el cebador de secuencia señal degenerada MKV4 con un cebador de la región constante de la cadena ligera kappa MKC. Se muestran las secuencias VH y VK resultantes.

Figura 20: Se extrajo ARN del hibridoma de DC1, se transcribió de forma inversa y se amplificó por PCR usando el cebador de secuencia señal degenerada MHV4 con el cebador de la región constante de la cadena pesada MHCG1, o usando el cebador de secuencia señal degenerada MKV4 con un cebador de la región constante de la cadena ligera kappa MKC. Se muestran las secuencias VH y VK resultantes.

Figura 21: Se extrajo ARN del hibridoma de JE12, se transcribió de forma inversa y se amplificó por PCR usando una 5' RACE PCR con el cebador de la región constante de la cadena pesada MHCG1, o usando el cebador de secuencia señal MKV1 con un cebador de la región constante de la cadena ligera kappa MKC. Se muestran las secuencias VH y VK resultantes.

Figura 22: Se extrajo ARN del hibridoma de EH6, se transcribió de forma inversa y se amplificó por PCR usando una 5' RACE PCR con el cebador de la región constante de la cadena pesada MHCG2B, o usando el cebador de secuencia señal MKV con un cebador de la región constante de la cadena ligera kappa MKC. Se muestran las secuencias VH y VK resultantes.

Figura 23: Se extrajo ARN del hibridoma de AG9, se transcribió de forma inversa y se amplificó por PCR usando el cebador de secuencia señal degenerada MHV7 con el cebador de la región constante de la cadena pesada MHCG1, o usando una mezcla de cebadores de secuencia señal degenerada MKV1 - 11 con un cebador de la región constante de la cadena ligera kappa MKC. Se muestran las secuencias VH y VK resultantes.

Figura 24: Se extrajo ARN del hibridoma de AH3, se transcribió de forma inversa y se amplificó por PCR usando el cebador de secuencia señal degenerada MHV7 con el cebador de la región constante de la cadena pesada MHCG2B, o usando el cebador de secuencia señal MKV1 con un cebador de la región constante de la cadena ligera kappa MKC. Se muestran las secuencias VH y VK resultantes.

Figura 25: Se extrajo ARN del hibridoma de DD9, se transcribió de forma inversa y se amplificó por PCR usando una 5' RACE PCR con el cebador de la región constante de la cadena pesada MHCG2A, o usando el cebador de secuencia señal degenerada MKV5 con un cebador de la región constante de la cadena ligera kappa MKC. Se muestran las secuencias VH y VK resultantes.

Figura 26: Se extrajo ARN del hibridoma de DH2, se transcribió de forma inversa y se amplificó por PCR usando una 5' RACE PCR con el cebador de la región constante de la cadena pesada MHCG2B, o usando el cebador de secuencia señal degenerada MKV45 con un cebador de la región constante de la cadena ligera kappa MKC. Se muestran las secuencias VH y VK resultantes.

Figura 27: Se extrajo ARN del hibridoma de DD6, se transcribió de forma inversa y se amplificó por PCR usando una 5' RACE PCR con el cebador de la región constante de la cadena pesada MHCG2B, o usando una 5' RACE PCR con un cebador de la región constante de la cadena ligera lambda MLC. Se muestran las secuencias VH y VL resultantes.

Figura 28: Se extrajo ARN del hibridoma de IA12, se transcribió de forma inversa y se amplificó por PCR usando el cebador de secuencia señal degenerada MHV9 con el cebador de la región constante de la cadena pesada MHCG1, o usando el cebador de secuencia señal degenerada CL14 con un cebador de la región constante de la cadena ligera kappa MKC. Se muestran las secuencias VH y VK resultantes.

Figura 29. Curvas de respuesta a dosis y valores de CI50 para la inhibición enzimática de TG2 humana recombinante por anticuerpos anti-TG2 quiméricos, (a) cAB003, (b) cBB001, (c) cDC001, (d) cDD9001, (e) cDH001 y (f) el anticuerpo de TG2 comercial CUB7402. Los valores de CI50 son la media de 3 experimentos independientes.

Figura 30. Curvas de respuesta a dosis y valores de CI50 para la inhibición enzimática de TG2 de mono

cinomolgo recombinante por anticuerpos anti-TG2 quiméricos (a) cDC001 y (b) el anticuerpo de TG2 comercial CUB7402.

Figura 31. Curvas de respuesta a dosis y valores de CI50 para la inhibición enzimática de TG2 humana recombinante por anticuerpos anti-TG2 humanizados, (a) hBB001AA, (b) hBB001BB, (c) hAB005 y (d) hAB004.

Figura 32. Curvas de respuesta a dosis y valores de CI50 para la inhibición enzimática de TG2 de mono cinomolgo recombinante por anticuerpos anti-TG2 humanizados (a) hBB01AA y (b) hAB004.

Figura 33. Curvas de respuesta a dosis y valores de CI50 para la inhibición enzimática de TG2 humana recombinante por anticuerpos anti-TG2 monoclonales murinos, (a) mAB003, (b) mBB001, (c) mDC001, (d) mDD9001, (e) mDH001 y (f) mDD6001.

Fig 34 - ELISA de unión de versiones humanizadas de anticuerpos AB1.

Se ensayaron sobrenadantes de células HEK293F cotransfectadas con diferentes combinaciones de vectores de cadenas ligeras de AB1 y cadenas pesadas de AB1 humanizadas en un ELISA anti-IgG humana para determinar la concentración y en un ELISA anti-huTG2. Cada sobrenadante se ensayó por triplicado y se determinó CI50. Se seleccionó la combinación más potente para estudios adicionales y como el anticuerpo humanizado candidato.

Figura 35. Curvas de unión de ELISA de respuesta a dosis y datos de CE50 para la unión de anticuerpos a TG2 humana (a) anticuerpos quiméricos cDD9001, cDH001, cDC001, anticuerpo de TG2 comercial CUB7402 y control del mismo isotipo, (b) anticuerpo quimérico cBB001 y control del mismo isotipo y (c) anticuerpo quimérico cAB003 y control del mismo isotipo.

Figura 36. Curvas de unión de ELISA de respuesta a dosis y datos de CE50 para la unión de anticuerpos a TG2 de mono cinomolgo (a) anticuerpos quiméricos cDD9001, cDH001, cDC001, anticuerpo de TG2 comercial CUB7402 y control del mismo isotipo, (b) anticuerpo quimérico cBB001 y control del mismo isotipo y (c) anticuerpo quimérico cAB003 y control del mismo isotipo.

Figura 37. Curvas de unión de ELISA de respuesta a dosis y datos de CE50 para la unión de anticuerpos a TG2 humana (a) anticuerpos humanizados hBB001AA, hBB001BB, anticuerpo de TG2 comercial CUB7402 y control del mismo isotipo y (b) anticuerpo humanizado hAB004.

Figura 38. Curvas de unión de ELISA de respuesta a dosis y datos de CE50 para la unión de anticuerpos a TG2 de mono cinomolgo (a) anticuerpos humanizados hBB001AA, hBB001BB, anticuerpo de TG2 comercial CUB7402 y control del mismo isotipo y (b) anticuerpo humanizado hAB004 y control del mismo isotipo.

Figura 39: Actividad de unión de AB1 humanizado con TG2 extracelular

Se ensayó la inhibición de la actividad de TG2 extracelular producida por células HK2 usando un ELISA que mide la incorporación de biotina cadaverina en fibronectina. Se muestra una curva ejemplar que muestra la inhibición de actividad de TG2 por AB1 humanizado (hAB005) y la CI obtenida.

Figura 40: Actividad de unión de BB7 humanizado con TG2 extracelular.

Se ensayó la inhibición de la actividad de TG2 extracelular producida por células HK2 usando un ELISA que mide la incorporación de biotina cadaverina en fibronectina. Se muestra una curva ejemplar que muestra la inhibición de actividad de TG2 por versiones de BB7 humanizado (hBB001AA y hBB001BB) y las CI obtenidas.

Figura 41: Resultados del ensayo de rascado con los controles citocalasina D, R281 y ZDON y resultados del ensayo de rascado con anticuerpo comercial CUB7402.

Se realizaron ensayos de heridas por rascado de heridas usando la célula WI-38, después de sembrar y crecer durante la noche, las células se lavaron en medios sin suero y se generó una herida por rascado usando un generador de heridas Essen. Se retiró el medio y se sustituyó con 95 ul/pocillo de medio libre de suero que contenía controles y anticuerpos de prueba. La placa se colocó en un Incyte de Essen y se analizó el cierre de la herida usando el software Incucyte. Se representó la densidad relativa de la herida frente al tiempo para los controles citocalasina D, R281 y Z-Don (panel A) y el anticuerpo comercial CUB7402 y citocalasina (panel B).

Figura 42: Resultados del ensayo de rascado para BB7 humanizado.

Se realizaron ensayos de heridas por rascado usando la célula WI-38, después de sembrar en placa y crecer durante la noche, las células se lavaron en medios sin suero y se generó una herida por rascado usando un generador de heridas Essen. Se retiró el medio y se sustituyó con 95 ul/pocillo de medio libre de suero que contenía controles y anticuerpos de prueba. La placa se colocó en un Incyte de Essen y se analizó el cierre de la herida usando el software Incucyte. Se representó la densidad relativa de la herida frente al tiempo para el AA hBB001 humanizado y el control citocalasina D (panel A) y hBB001BB y el control citocalasina D (panel B).

Figura 43: Resultados del ensayo de rascado para AB1 humanizado.

Se realizaron ensayos de heridas por rascado usando célula WI-38, después de sembrar en placa y crecer durante la noche, las células se lavaron en medios sin suero y se generó una herida por rascado usando un generador de heridas Essen. Se retiró el medio y se sustituyó con 95 µl/pocillo de medio libre de suero que contenía controles y anticuerpos de prueba. La placa se colocó en un Incyte de Essen y se analizó el cierre de la herida usando el software Incucyte. Se representó la densidad relativa de la herida frente al tiempo para hAB005 humanizado y el control citocalasina D

Figura 44: Resultados del ensayo de rascado para DC1 quimérico.

Se realizaron ensayos de heridas por rascado usando célula WI-38, después de sembrar en placa y crecer durante la noche, las células se lavaron en medios sin suero y se generó una herida por rascado usando un generador de heridas Essen. Se retiró el medio y se sustituyó con 95 µl/pocillo de medio libre de suero que contenía controles y anticuerpos de prueba. La placa se colocó en un Incyte de Essen y se analizó el cierre de la herida usando el software Incucyte. Se representó la densidad relativa de la herida frente al tiempo para el anticuerpo quimérico cDC001 y el control citocalasina D

Figura 45: Unión de TG2 humana a anticuerpo cAB003 inmovilizado por Biacore. Se muestran a la izquierda las fases de asociación de inyecciones de TG2 humana sobre el biosensor recubierto con cAB003 a 25, 50, 100 y 200 nM, que incluye por duplicado a 50 nM. A partir del mismo experimento, se recogieron dos fases de disociación largas, como se muestra a la derecha. Los ajustes se muestran como líneas negras continuas y los resultados se muestran en la Tabla 25.

Figura 46: Unión de TG2 de mono cinomolgo a anticuerpo hAB004 inmovilizado por Biacore. Se muestran a la izquierda las fases de asociación de inyecciones de TG2 de mono cinomolgo sobre el biosensor recubierto con hAB004 a 25, 50, 100, 200 y 400 nM, que incluye por duplicado a 50 nM. A partir del mismo experimento, se recogieron dos fases de disociación largas, como se muestra a la derecha. Los ajustes se muestran como líneas negras continuas y los resultados se muestran en la Tabla 26.

Figura 47: Unión de TG2 humana a anticuerpo cDH001 inmovilizado por Biacore en ausencia de calcio. Se muestran a la izquierda las fases de asociación de inyecciones de TG2 humana sobre el biosensor recubierto con cDH001 a 25, 50, 100 y 200 nM, que incluye por duplicado a 50 nM. A partir del mismo experimento, se recogieron dos fases de disociación largas, como se muestra a la derecha. Los ajustes se muestran como líneas negras continuas y los resultados se muestran en la Tabla 25.

Ejemplo 1: Desarrollo de un anticuerpo inhibidor de TG2 adecuado para uso terapéutico en el hombre con la identificación de 3 epítopos inhibidores específicos.

La transglutaminasa tipo 2 (TG2) cataliza la formación de un enlace isopeptídico de ε-(γ-glutamil)-lisina entre péptidos o proteínas adyacentes que incluyen los de la matriz extracelular (ECM). TG2 extracelular elevado conduce a la deposición acelerada de ECM y la reducida eliminación que subyace a la cicatrización de tejido y fibrosis. También se asocia a celiacía, trastornos neurodegenerativos y algunos cánceres. Aunque se han desarrollado numerosos compuestos que inhiben las transglutaminasas, ninguno de estos es específico para TG2, inhibiendo todas las transglutaminasas de algún modo. Aunque estos han permitido estudios de prueba de principio para la función de TG2 en estas patologías, la falta de especificidad por isoforma ha impedido su aplicación en el hombre. Para tratar esto, los presentes inventores plantearon desarrollar un anticuerpo específico de TG2 de alta afinidad TG2 que inhibiera solo la actividad de TG2.

Se produjo en *Escherichia coli* una proteína recombinante que englobaba los aminoácidos 143 a 473 del núcleo de TG2 humana, se replegó y se inyectaron 100 µg en 4 ratones con refuerzos a las 2, 5, 7 y 10 semanas. Se recuperaron los bazo 4 días después del refuerzo final y los esplenocitos se fusionaron con células de mieloma Sp2/0-Ag-14. Setenta y cinco sobrenadantes de hibridoma mostraron especificidad por TG2. Estos sobrenadantes de hibridoma se cribaron para su capacidad para inhibir la actividad de TG2 en un ensayo de incorporación de putrescina que contenía 100 µg de TG2. Diez sobrenadantes específicos de TG2 fueron inhibidores. Estos se clonaron doblemente posteriormente. Usando presentación en fagos para cribar una biblioteca de fragmentos de TG2, se mapeó cada anticuerpo con un epítopo preciso en el dominio de núcleo de TG2 y se determinaron 3 epítopos inhibidores distintos. Se determinó la cantidad de anticuerpo para reducir al 50 % la actividad desde 100 ng de TG2.

Los 2 anticuerpos más eficaces, AB1 y DC1, se unieron a los aminoácidos 304 a 327 y tuvieron una CI₅₀ de $1,1 \times 10^{-5}$ mg/ml de IgG por ng de TG2 recombinante. La aplicación de AB1 y DC1 fue capaz de inhibir TG2 satisfactoriamente en células Hep2G humanas y TG2 extracelular en células HK-2 humanas cuando se aplicó a los medios de cultivo.

Así, la inmunización de ratones con el dominio de núcleo de TG2 permitió sorprendentemente la generación de anticuerpos monoclonales que se dirigían previamente a epítopos no informados dentro del núcleo catalítico. Estos anticuerpos son específicos, inhiben la actividad de TG2 eficazmente y son adecuados para aplicación *in vivo*.

Materiales y métodos

Producción de dominios de núcleo catalítico de transglutaminasa 2

- 5 Se expresó el dominio de núcleo catalítico de TG2 humana (restos Cys143 - Met 473 de TG2), se replegó y se purificó para permitir la inmunización en ratones. Se clonó el dominio de núcleo catalítico (cebador de sentido directo de PCR GCG CGC GCT AGC TGC CCA GCG GAT GCT GTG TAC CTG GAC, sentido contrario GCG CGC AAG CTT CAT CCC TGT CTC CTC CTT CTC GGC CAG) en el vector de expresión pET21a(+) y se expresó como cuerpos de inclusión insolubles en la cepa de *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL (Agilent Technologies). En
- 10 resumen, se transformaron 50 µl de células BL21 (DE3) pLysS competentes con 1 µl del plásmido de expresión (30 ng/µl) y se sembraron en placas de LB-agar que contenían los antibióticos selectivos (100 µg/ml de ampicilina, 34 µg/ml de cloranfenicol) y 1 % de glucosa y se incubaron durante la noche a 37 °C. Se recogió una única colonia para sembrar 10 ml de medio LB fresco que contenía 100 µg/ml de ampicilina, 34 µg/ml de cloranfenicol y 1 % de glucosa en estufa de incubación con agitación a 37 °C y a 200 rpm. Después del crecimiento durante la noche, los
- 15 cultivos se transfirieron a 100 ml de medios 2xYT con 1 % de glucosa y crecieron hasta una DO_{600nm} de 0,8 y entonces se transfirieron a 1 l de medio 2xYT hasta que la DO_{600nm} alcanzó 0,8 otra vez. Después de 4 horas de inducción bajo IPTG 1 mM para estimular la expresión, se sedimentaron y las bacterias se lisaron por sonicación en tampón A (Tris 10 mM; EDTA 1 mM; DTT 10 mM; PMSF 1 mM; 0,5 mg/ml de comprimidos de inhibidor de proteasas lisozimas (Roche), pH 8,0). Se recogieron por centrifugación a 40.000 x g los cuerpos de inclusión y se lavaron tres
- 20 veces en tampón de lavado B (Tris 50 mM; EDTA 1 mM; DTT 10 mM; 2 % de desoxicolato de sodio, pH 8,0) antes de un lavado final en agua desionizada.

- Se solubilizaron los cuerpos de inclusión en 3,5 ml de tampón de resolubilización (Tris-HCl 40 mM, urea 8 M y DTT 10 mM a pH 12) y se replegaron durante un periodo de 16 horas en tampón de replegamiento (Tris HCl 40 mM; NaCl 150 mM; 20 % de glicerol; cisteína 5 mM; cistina 0,5 mM a pH 8) a 4 °C en la oscuridad.
- 25

- Los cuerpos de inclusión resolubilizados se cargaron sobre una columna de níquel de 1 ml. Brevemente, la columna se equilibró previamente con tampón de unión (Tris 40 mM; NaCl 300 mM; imidazol 10 mM) y se aplicaron los cuerpos de inclusión. Se lavó ampliamente la columna (Tris 40 mM; NaCl 300 mM; imidazol 30 mM). La proteína recombinante se eluyó por tampón imidazol de alta concentración (Tris 40 mM; NaCl 300 mM; imidazol 300 mM). Se reunieron las fracciones que contenían la proteína eluida y se dializaron durante la noche contra un tampón apropiado (Tris 40 mM; NaCl 300 mM a pH 8). La proteína se evaluó usando el ensayo Bradford de proteínas.
- 30

Cultivo celular y lisados de HepG2

- 35 Las células HepG2 fueron amablemente suministradas por Richard Ross (Universidad de Sheffield). Las células se cultivaron rutinariamente a 37 °C en una atmósfera humidificada al 95 % de 5 % de CO₂ en DMEM/4,5 g por litro de glucosa complementada con 10 % de suero bovino fetal (FCS), 100 UI de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin, l-glutamina 2 mM (todos de GIBCO). Se sembraron dos millones células en placas de 10 cm y se cultivaron durante
- 40 48 horas. Las células se lisaron en 250 µl de tampón STE (sacarosa 0,32 M, Tris 5 mM, EDTA 1 mM que contiene inhibidores de la proteasa fluoruro de fenilmetilsulfonilo (1 mM), benzamidina (5 mM) y leupeptina (10 µg/ml) y se sonicaron sobre hielo para producir un lisado celular utilizable en el ensayo de actividad de TG2.

Células renales humanas 2 (HK2):

- 45 Se compraron células HK-2 (epitelio tubular proximal de riñón) de la Colección Europea de Cultivos Celulares en el pase 3. Las células se cultivaron rutinariamente a 37 °C en una atmósfera humidificada al 95 % de 5 % CO₂ en medio libre de suero de queratinocito (KSFM, Gibco 17005-042) con L-glutamina complementada con EGF recombinante (0,1-0,2 ng/ml) y extracto de pituitaria bovina (20-30 ug/ml). Para el pase, se retiró el medio y se lavó una vez con 1 x PBS antes de tripsinar con 1 ml de 0,25 % de tripsina/EDTA (matraz T75) durante 1 minuto a 37 °C. Las células se resuspendieron en 10 ml de KSFM y se centrifugaron a 400 g durante 1 minuto. Se retiró el medio y las células se sembraron en KSFM (es normal la división 1:3 a 1:5). Las células se usaron experimentalmente en los pases 5-14. Las células crecieron normalmente bien hasta 95 % de confluencia.
- 50

Tinción con Coomassie y transferencia Western

- 55 Se comprobó la pureza de las proteínas recombinantes ejecutando 5 µg de la proteína recuperada sobre un gel desnaturizante de poliacrilamida al 10 % (p/v) y tinción con solución de tinción Coomassie Brilliant Blue R (Sigma).
- 60 La confirmación de la síntesis de proteínas del núcleo TG2, así como los niveles de reactividad de TG2 y de núcleo de TG2 tras la inmunización, se midieron todos por transferencia Western. Se cargaron proteínas recombinantes (10 a 80 ng) sobre un gel desnaturizante o no desnaturizante de poliacrilamida al 10 % (p/v) según se requiriera y se transfirieron sobre membranas de PVDF (Transblot SD, Biorad, RU) durante una hora a 100 V. Las membranas se bloquearon durante la noche a 4 °C con 3 % (p/v) de BSA en TBS/0,1 % (v/v) de Tween 20. Entonces, las
- 65 membranas se lavaron y se sondaron con anticuerpos monoclonales anti-transglutaminasa de ratón en TBS/Tween que contenía 1 % de BSA. Para probar la proteína de núcleo TG2 recombinante y como control positivo para el

cribado de anticuerpos, se usó el anticuerpo comercial Cub7402 (Neomarkers) a una dilución 1:1000. Se detectó la unión de anticuerpo primario con el anticuerpo secundario unido a anti-HRP de cadena gamma de ratón (Sigma, Pool, RU). Las bandas se visualizaron usando sistema de detección quimioluminiscente ECL (Amersham, RU).

5 Inmunización de ratones y fusión

Se inmunizó cada ratón con una mezcla de 50 µg de antígeno (enrasado hasta 50 µl con PBS estéril) y 50 µl de adyuvante completo de Freund. Se inyectaron cuatro ratones BALB/C (8-12 semanas de edad). Se llevaron a cabo dos inmunizaciones de refuerzo (día 14 y día 35) usando el mismo procedimiento, con la excepción de que se usó adyuvante incompleto de Freund para estas inyecciones. En el día 45, se tomaron muestras de sangre de todos los animales y se evaluaron para reactividad a TG2 por ELISA.

Los dos mejores respondedores se reforzaron adicionalmente por inyección de 100 µg de proteína de núcleo (en PBS) nuevamente mezclada con adyuvante incompleto de Freund a las 10 semanas, y 4 días después los animales se sacrificaron para la recuperación de esplenocitos y fusión con células de mieloma Sp2/0-Ag-14. A partir de esta fusión, se cribaron aproximadamente 1000 pocillos para reactividad a proteína TG2 por ELISA.

Cribado para la especificidad de TG2

Se probaron medio acondicionado o IgG purificada para reactividad a los miembros de la familia de transglutaminasa. Se determinó la capacidad de cada uno para unirse a cada transglutaminasa (TG1, TG2, TG3, TG5, TG7 y factor XIIIa; todos de Zedira) usando un ensayo de unión a placa. Se recubrieron placas de microtitulación (Costar, Cambridge, RU) con TG recombinante (Zedira, Darmstadt, Alemania) en 50 µl de tampón bicarbonato/carbonato 0,1 M (pH 9,6) durante la noche a 4 °C. Las placas se bloquearon durante 2 h a 37 °C con 200 µl de PBS que contenía 3 % p/v de BSA. Se lavaron tres veces las placas con PBS que contenía 0,05 % de Tween 20 (tampón de lavado) y 100 µl de medio acondicionado diluido (dilución 1:5 a 1:20) o se añadieron mAbs anti-núcleo catalítico de TG2 purificados. Las placas se incubaron durante 1 h adicional a temperatura ambiente. Se repitió la etapa de lavado y se añadió anti-cadena gamma de ratón-peroxidasa de rábano picante (1:5000) en PBS que contenía 0,05 % de Tween 20 (v:v) y 1 % de BSA (w:v) (Sigma, Pool RU) durante 1 h. Después de ocho lavados, se reveló la unión con 50 µl de sustrato de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina. La reacción se detuvo añadiendo 25 µl de H₂SO₄ 0,1 M y se determinó la absorbancia a 450 nm.

Cribado para la inhibición de TG2

Se mide la actividad de TG por la incorporación dependiente de Ca²⁺ de ³H-putrescina en N',N'-dimetilcaseína. Se preincubó TG2 humana recombinante (100 ng) durante veinte minutos a temperatura ambiente con la muestra de prueba (medio acondicionado o IgG purificada) antes del comienzo de la reacción. Se añadieron veinticinco µl de mezcla de reacción (5 µl de CaCl₂ 25 mM, 5 µl de ditiotreitól 40 mM, 5 µl de mezcla ³H-putrescina y 10 µl de 25 mg/ml de N',N'-dimetilcaseína (sustituir CaCl₂ 25 mM con EDTA 100 mM para un control no enzimático) para empezar la reacción y las muestras se incubaron a 37 °C durante hasta 1 hora. Se aplicaron alícuotas de 10 µl sobre una tira de papel de filtro 3 MM Whatman y se sumergieron inmediatamente en 10 % de ácido tricloroacético (TCA) frío en hielo para precipitar las proteínas reticuladas normalmente en el tiempo 0, 10, 30 y 60 minutos en la reacción. Después de tres amplios lavados en 5 % de TCA frío en hielo, seguido por 3 aclarados con 95 % de etanol frío en hielo, se contó el filtro secado al aire en 2 ml de fluido de centelleo (Ultima Gold Packard, Perkin Elmer). Se calculó la velocidad de reacción. 1 unidad de TG es equivalente a la incorporación de 1 nmol de putrescina por hora a 37 °C.

Se usó el mismo protocolo para evaluar la inhibición de TG en lisados celulares reemplazando los 25 µl de proteína recombinante con 25 µl de lisado celular.

50 Clonación y purificación de hibridomas de anticuerpos a partir de medio acondicionado

Se realizó el aislamiento de anticuerpos monoclonales a partir de los hibridomas inhibidores clonados. Se clonaron doblemente los pocillos de hibridomas inicialmente identificados por un proceso de dilución limitante (para garantizar la estabilidad y clonalidad) según métodos convencionales (Loirat MJ *et al.*, 1992) con subclones probados como se describe por cribados de ELISA y de actividad. Se expandieron los clones productores de anticuerpos seleccionados en matraces de 25 y 75 cm² y se alimentaron con medio libre de suero (Hyclone, Fisher Scientific, Loughborough, RU). A medida que se expandieron las células, se recogió medio acondicionado para la purificación de IgG usando cromatografía de afinidad en columna de proteína G (Amersham Life Sciences). Se diluyó el medio acondicionado en un volumen igual de fosfato de sodio 10 mM, pH 7,25, y se aplicó a la columna de proteína G a un caudal de 1,0 a 2,0 ml/min. La columna se lavó ampliamente con 10 volúmenes de columna del mismo tampón. Se eluyó el anticuerpo unido en solución de glicina (0,1 M; pH 2,7) y se neutralizó por 0,15 % de volúmenes de Tris / HCl 1 M a pH 9. Las muestras se dializaron contra 1000 volúmenes de solución salina de tampón fosfato durante 24 horas con 2 cambios de tampón.

65 Mapeo de presentación en fagos de epítomos de anticuerpos

Se amplificó la secuencia codificante de TG2 humana de longitud completa por reacción en cadena de la polimerasa usando los siguientes cebadores; TG2-FL-1 5' ATGGCCGAGGAGCTGGTCTTAGAGA 3' y TG2-FL-2 5' GGCGGGGCCAATGATGACATTCCGGA 3'. Se purificó el producto de amplificación de aproximadamente 2 kb usando el kit Quiagen PCR cleanup (Quiagen) y se digirió en fragmentos aleatorios usando RQ DNase I (Promega).

La reacción de RQ DNase se trató con fragmento de Klenow de ADN polimerasa I y ADN polimerasa T4 para generar fragmentos de extremos romos. Estos se purificaron por electroforesis en gel, y los fragmentos en el intervalo de 50-150 pb se extrajeron usando el kit de recuperación en gel de Quiagen (Quiagen, Crawley UK).

Se digirió un vector de presentación en fagos con EcoRV, se trató con fosfatasa alcalina y se purificó por electroforesis en gel y el kit de recuperación en gel de Quiagen. Se ligaron 100 ng de vector purificado a 15 ng de fragmentos romos preparados de ADNc de TG2 humana. La ligación resultante se sometió a electroforesis en células electrocompetentes XL1-Blue (Agilent Technologies) y se rescató la biblioteca de fragmentos con fago auxiliar VCSM13 (Agilent). Las partículas de fagos se precipitaron con 2 % de glucosa y 4 % de PEG 6000 y se resuspendieron en PBS 0,1 % de Tween 20 (v:v) 1 % de BSA (w:v).

Se llevó a cabo el mapeo de epítomos usando el siguiente procedimiento. Se recubrieron pocillos de ELISA durante la noche a 4 °C con 30 µg de anticuerpo monoclonal en 100 µl de tampón de recubrimiento. El pocillo recubierto se lavó con PBS/Tween y se bloqueó con 400 µl de 3 % de BSA en PBS (p:v) durante 1 h a temperatura ambiente. Se añadieron aproximadamente 10¹⁰ partículas de fago (100 µl) al pocillo bloqueado y se incubó a temperatura ambiente durante 1 h. El pocillo se lavó 8 veces con 400 µl de PBS/0,5 % de Tween (v:v) y el fago adherente se eluyó con glicina 0,2 M a pH 2,2. Se usó el fago eluido para infectar 1 ml de hospedador XL1-Blue y las muestras se sembraron en LB-agar (60 µg/ml de ampicilina, 15 µg/ml de tetraciclina), el hospedador restante se añadió a 100 ml de medio LB (60 µg/ml de ampicilina, 15 µg/ml de tetraciclina) y se cultivó durante la noche a 37 °C en una estufa de incubación con agitación a 200 rpm para generar la biblioteca enriquecida de fragmentos seleccionados. Este proceso de enriquecimiento se repitió 5 veces y se seleccionaron colonias aleatorias de la ronda final para la secuenciación.

Determinación de la secuencia de la región VL de anticuerpo

Cebadores

Cebadores de sentido directo de cadena pesada - Se combinaron un par de cebadores FR1 altamente degenerados, MH1 y MH2 (Wang *et al.* 2000), con 3 cebadores de la región constante para amplificar genes VH.

MH1	5' CGCGCGCTCGAGSARGTNMAGCTGSAGTC 3'
MH2	5'CGCGCGCTCGAGSARGTNMAGCTGSAGSAGTC 3'
Ratón-G1	5' AGGCGCAGTACTACAATCCCTGGGCACAATTTCTTGTCACC 3'
Ratón-G2a	5' AGGCGCAGTACTACAGGGCTTGATTGTGGGCCCTCTGGG 3'
Ratón-G2b	5' AGGCGCAGTACTACAGGGGTTGATTGTTGAAATGGGCCCG 3'

Cebadores de kappa

VK1 5'	CGCTGCGAGCTCGATATTGTGATGACBCAGDC 3'
VK2 5'	CGCTGCGAGCTCGAGRTTKTGATGACCCARAC 3'
VK3 5'	CGCTGCGAGCTCGAAAATGTGCTCACCCAGTC 3'
VK4 5'	CGCTGCGAGCTCGAYATTGTGATGACACAGTC 3'
VK5 5'	CGCTGCGAGCTCGACATCCAGATGACACAGAC 3'
VK6 5'	CGCTGCGAGCTCGAYATTGTGCTSACYCARTC 3'
VK7 5'	CGCTGCGAGCTCGACATCCAGATGACYCARTC 3'
VK8 5'	CGCTGCGAGCTCCAAATTGTTCTCACCCAGTC 3'
K-CONST	5' GCGCCGTCTAGAATTAACACTCATTCTGTTGAA 3'

Se extrajo ARN total de células de hibridoma monoclonales (~ 10⁵ células) usando Trizol (GIBCO) según el protocolo del fabricante y se cuantificó por A_{260nm}. Se sintetizó ADNc usando transcriptasa inversa ImProm II (Promega) y cebadores hexámeros aleatorios. La mezcla de reacción fue del siguiente modo; 1 µg de ARN total, 0,1 µg de oligonucleótido (dN)₆, 12 µl de tampón ImProm II, 1 µl de dNTPs 10 mM (Promega), 8 µl de MgCl₂ 25 mM, 4 µl de transcriptasa inversa ImProm II (Promega), H₂O tratada con DEPC hasta volumen de reacción total de 60 µl. Se calentó el ARN y la mezcla de cebadores aleatorios hasta 70 °C durante 10 min y luego se puso sobre hielo. Se añadieron los componentes de reacción restantes y entonces se incubaron a 20 °C durante 10 min, luego a 40 °C durante 40 min adicionales.

La amplificación de genes VH y VK se llevó a cabo con polimerasa GoTaq (Promega). Cada 50 µl de reacción contuvieron lo siguiente; ADNc 2 µl, 20 pmoles de cebadores de sentido directo y de sentido contrario, 10 µl de tampón de reacción GoTaq, 1 µl de dNTPs 10 mM, 5 µl de MgCl₂ 25 mM, 2,5 u de polimerasa GoTaq, H₂O hasta un volumen final de 50 µl. Las reacciones se sometieron a 35 ciclos usando las siguientes condiciones: desnaturalización inicial 95 °C 2 min; desnaturalización 94 °C 1 min, hibridación 56 °C 1 min, extensión 72 °C 1 min.

Se analizaron los productos de PCR por electroforesis en gel y se clonaron usando el kit de clonación TOPO TA (Invitrogen). Se seleccionaron minipreparaciones aleatorias de productos de PCR de cadena pesada y ligera para la secuenciación.

5 Medición de la actividad de TG extracelular

Se midió la actividad de TG extracelular por ELISA de células modificado. Se recogieron células epiteliales HK-2 usando EDTA 0,1 M o 0,25 % de tripsina/EDTA y se sembraron a una densidad de 8×10^4 células/pocillo en medio libre de suero sobre una placa de 96 pocillos que se había recubierto durante la noche con 100 µl/pocillo de fibronectina (5 µg/ml en Tris-HCl 50 mM a pH 7,4) (Sigma, Pool RU). Se dejó que las células se unieran durante 2,5 h a 37 °C en presencia de biotina cadaverina 0,1 mM [ácido N-(5 aminopentilbiotinamida)trifluoroacético] (Molecular Probes, Eugene OR, EE.UU.). Las placas se lavaron dos veces con EDTA/PBS 3 mM y las células se retiraron con 0,1 % (p/v) de desoxicolato en EDTA/PBS 5 mM. Se recogió el sobrenadante y se usó para la determinación de proteína. Se lavaron las placas con Tris-HCl 50 mM y se incorporó biotina cadaverina revelada usando 1:5000 de extravidina HRP (Sigma, Pool, RU) durante 1 h a temperatura ambiente, seguido por un sustrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina). La reacción se detuvo con 50 µl de H₂SO₄ 2,5 M y se leyó la absorbancia a 450 nm.

Medición de los niveles de colágeno por radiomarcado

Se sembraron células a una densidad de $3,75 \times 10^6/10$ cm² de placa de Petri o 1×10^6 /pocillo de una placa de 6 pocillos. Se evaluó colágeno de ECM por marcado con 20 iCi de ³H prolina (1,0 mCi/ml, ICN). El marcado se realizó durante 72 h en condiciones estándar de cultivo celular. Tras el marcado, se retiró el medio, las células se lavaron con PBS y se retiraron con 2 ml de hidróxido de amonio 0,25 M en Tris 50 mM a pH 7,4 a 37 °C durante 10 min. Se recogió la fracción soluble y se determinó la concentración de proteína usando el ensayo de ácido bicinónico (BCA). Las placas se lavaron ampliamente con volúmenes crecientes de PBS antes de que ECM se solubilizara con 2 ml de 2,5 % (p/v) de SDS en Tris 50 mM a pH 6,8. Se raspó la placa para garantizar la completa retirada de ECM y se midió 200 il para radioactividad en un contador de centelleo beta. Los recuentos se corrigieron por mg de proteína de célula solubilizada y se expresaron como un porcentaje del valor de control medio.

Generación de IgG de Quark recombinante ratificado

Se generó para fines experimentales un anticuerpo quimérico humano-rata a partir de secuencia de un Fv monocatenario 'humano' de un anticuerpo contra transglutaminasa humana tipo II. El anticuerpo se denomina QPCDTGII (abreviado QCT), y las secuencias de las regiones variables están disponibles en el documento de patente WO 2006/100679A2.

Se seleccionó una subclase γ2a de rata para las regiones constantes de la cadena pesada, retirando el sitio de glucosilación para reducir la probabilidad de una reacción de ADCC en los animales de prueba de rata. La región constante de rata seleccionada para la cadena pesada fue 013593 (Bruggemann, M. Gene 74: 473-482 (1988); Bruggemann, M., Free, J., Diamond, A., Howard, J., Cobbold, S. y Waldmann, H. Proc. Natl. Acad. Sci USA 83: 6075-6079 (1986)) de la base de datos de Kabat (Kabat, E. A., Wu, T. T., Perry, H. M., Gottesman, K. S. y Foeller, C. Sequences of Proteins of Immunological Interest. (NIH National Technical Information Service, 1991)). Aquella para la cadena ligera kappa fue 013718 (Sheppard, H. W. y Gutman, G. A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 7064-7068 (1981)) de Kabat.

En resumen, se generaron secuencias codificantes de la cadena pesada y cadena kappa por síntesis de ADN (se adaptó el uso de codones a una preferencia codónica de mamífero).

Se amplificó por PCR el producto de síntesis del gen de la cadena pesada usando los cebadores QCT_HindIII y QCT_H_rev. Se cortó el producto de PCR con HindIII y NgoMIV y se ligó en el vector de expresión MRCT. Los clones de bacterias DH5α competentes transformados químicamente por el producto de ligación se cribaron por PCR usando los cebadores HCMVi y rata_gamma1. Se secuenciaron tres clones que generaron un producto de PCR del tamaño predicho.

Se amplificó por PCR el producto de síntesis del gen de la cadena kappa usando los cebadores QCT_HindIII y QCT_L_rev. Se cortó el producto de PCR con HindIII y PpuMI y se ligó en el vector de expresión pKN100. Los clones de bacterias DH5α competentes transformados químicamente por el producto de ligación se cribaron por PCR usando los cebadores HCMVi y rata_kappa. Se secuenciaron tres clones que generaron un producto de PCR del tamaño predicho.

Se generó un vector de expresión de inserto doble que codificaba tanto las cadenas pesadas como kappa y se transfeció en células HEK 293T. Se reunió el sobrenadante de cultivo celular de dos transfecciones de HEK293T a gran escala y se purificaron por afinidad en una columna de 1 ml de L-agarosa de proteína usando un sistema de cromatografía ÄKTA Explorer, según el protocolo del fabricante. Eluyó un único pico a DO 280 nm con tampón de elución de IgG, y se dializó contra dos cambios de PBS. Este se ensayó tanto por absorción de UV a 280 nm, como

por ELISA de IgG_{2a} de rata. El rendimiento total fue aproximadamente 700 µg (por DO_{280nm}); 303,5 µg (por ELISA).

Humanización de anticuerpo AB1

5 **Bases de datos de ADNc de VH y VK humano**

Se usaron las secuencias de proteínas de inmunoglobulinas humanas y de ratón de International Immunogenetics Database 2009¹⁰¹ y Kabat Database Release 5 of Sequences of Proteins of Immunological Interest (última actualización 17-Nov-1999)¹⁰² para compilar una base de datos de secuencias de inmunoglobulina humana en un alineamiento de Kabat. La base de datos de los presentes inventores contiene 10.606 secuencias VH y 2.910 VK.

Modelo molecular de AB1

Se ha calculado un modelo de homología de las regiones variables del anticuerpo AB1 de ratón usando el programa Modeller¹⁰³ ejecutado en modo automático. Las coordenadas atómicas de 1 MQK.pdb, 3LIZ.pdb y 1MQK.pdb fueron los moldes de secuencia de mayor identidad para la interfase, VL y VH, respectivamente, como se ha determinado por análisis Blast de la base de datos de estructuras Accelrys antibody pdb. Estos moldes se usaron para generar 20 modelos iniciales, el mejor de los cuales se refinó modelando cada bucle de CDR con sus 3 mejores moldes de bucle.

Selección de la región estructural de hAB1

Se usó el programa de análisis de secuencias, gibsSR, para interrogar las bases de datos de VH y VK humanas con las secuencias de proteínas de VHc, VKc y VKc₁ de AB1 usando diversos criterios de selección. Se identificaron restos de FW dentro de 5 Å de un resto de CDR (definición de Kabat) en el modelo de homología de anticuerpo AB1 de ratón, y se designaron los restos "Proximidad 5 Å".

Se eligió AF06220 como FW sobre el que basar la construcción inicial de VHc de AB1 humanizado. La Tabla 1 muestra el alineamiento y la identidad de restos de AF06220 para Ab1 murino. La Tabla 2 muestra la envoltura de proximidad 5 Å de las secuencias. AF062260 solo tiene 1 mutación somática lejos de su gen VH de la línea germinal Z12347 (Tabla 3).

Se eligió AY247656 como FW sobre el que basar la construcción inicial de VKc de AB1. El alineamiento y la identidad de restos con AB1 murino se muestran en la Tabla 4; la Tabla 5 muestra la envoltura de proximidad 5 Å de las secuencias. La secuencia muestra 5 mutaciones somáticas de su gen VK de la línea germinal X93620 (Tabla 6).

Se eligió AF193851 como FW sobre el que basar la construcción inicial de VKc₁ de AB1. El alineamiento y la identidad de restos con AB1 murino se muestran en la Tabla 7. La Tabla 8 muestra la envoltura de proximidad 5 Å de las secuencias. La secuencia no muestra mutaciones somáticas de su gen VK de la línea germinal J00248 (Tabla 9).

ELISA de unión

Se cotransfectaron células HEK 293F con combinaciones de diferentes vectores de la cadena ligera humanizada en asociación con diferentes vectores de la cadena pesada humanizada. Se usó TG2 humana recombinante para medir la unión de anticuerpo por ELISA. Los resultados indicaron que la versión de cadena pesada RHA (Tabla 10), en combinación con cualquier de las versiones de cadena ligera RKE y RKJ (Tabla 11) (que representan las diferentes versiones de la cadena ligera humanizada) mostraron unión óptima (Figura 16).

La versión de cadena pesada RHA es un injerto no modificado de regiones CDR de ratón del anticuerpo AB1 en la secuencia de donante humano. Sin embargo, ambas versiones de cadena ligera RKE y RKJ tienen la misma retromutación que reside solo en la proximidad 5 Å, F72 (numeración de Kabat - mostrada en verde). Esta retromutación se encuentra fuera de los restos de Vernier¹⁰⁴, Canónicos¹⁰⁵ o de Interfase¹⁰⁶ (véase la Tabla 11).

101. Lefranc, M.P. IMGT, the international ImMunoGeneTics database(R). Nucleic Acids Res. 31, 307-310 (2003).

102. Kabat, E.A., Wu, T.T., Perry, H. M., Gottesman, K. S. y Foeller, C. Sequences of Proteins of Immunological Interest. NIH National Technical Information Service, (1991).

103. Eswar, N. *et al.* Comparative protein structure modeling using Modeller. Curr. Protoc. Bioinformatics. Capítulo 5: Unidad 5.6., Unit (2006).

104. Foote, J. y Winter, G. (1992). Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops. J Mol. Biol. 224, 487-499.

105. Morea, V., Lesk, A. M. y Tramontano, A. (2000). Antibody modeling: implications for engineering and design. *Methods* 20, 267-279.

5 106. Chothia, C., Novotny, J., Brucoleri, R. y Karplus, M. (1985). Domain association in immunoglobulin molecules. The packing of variable domains. *J Mol. Biol.* 186, 651-663.

TABLAS

Tabla 1[illegible]

Tabla 2

	Restos de proximidad 5 Å
AB VHC	EVQLCAFTLSWVRWVARFTISRNLYCAKWG
AF062260F.....S.....

Tabla 3

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	
Z12347.seq	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTFS	SYAMSWVRQAPGK	GLEWVSAISGSGG	STYYADSVKGRFTI	SRD	NSKNTLYLQMN	SLRAEDTAVYYCAK		
AF062260.seqR
	<--->			<----->						

Tabla 4

Números de Kabat ²	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Vernier ⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Canónicos ⁵	-	..*
Interfase ⁶	-
Proximidad 5 Å	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
AB VKc	-	EIVLTQSSMYASLGERVTITCKASQ	DINSYLTWFOOKGKSKLLIYKINRLFDGV	SRFSGSGSGQDEF	LTIS	SL	VEDMGIYYCLOYDDFP	YIFGGTKLEI-K
AY247656	-LS..V.D.....	Q.....	..SN..N.Y.....	..A..L.L..	DASN..EI..	Q..F.T..	Q..NTY..

Tabla 5

	Restos de proximidad 5 Å
AB VKc	EIVLTQTCTCWFTLLIYGVFSGSGSGQDFFYCFG
AY247656YL.....T..T....

Tabla 6

X93620.seq DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQAQSIDI SNYLNWYQQKPKAPKLIIYDASNLETGVPFRFSGSGGTDTFTTISLQPEDIATYYCQYDNLP
AY247656.seq E.VL.....<-----><----->

Tabla 7

Números de Kabat ²	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Vernier ⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Canónicos ⁵	-	*	*
Interfase ⁶	-	I
Proximidad 5 Å	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
AB VKC	-	DIQMTQSPSSMYASLGERTVITCKASQ	DINSYLTWFQOKPGKSEKTLTYRNRLFDGV	SRFSGSGSGQDFLTIS	SLEYEDMGIIYYCIQYDDFP	YIFGGGTKLEI-K
AF193851	-	LS.V.D	R.....	G:RN.A	A.S.....	AASN.QS

Tabla 8

	Restos de proximidad 5 Å
AB VKc	DIQMTQTCWFTLLYGVPFSGSGSGQDFFYCFG
AF193851S.....T..T....

Tabla 9

```

J00248.seq      +--+--+--+--+--+--+--+--+--+--+--+--+--+--+--+
                  10  20  30  40  50  60  70  80  90
                  +--+--+--+--+--+--+--+--+--+--+--+--+--+--+
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWFOQPKAPKSLIYAASLSQSGVPSRFGSGSGTDFLTITLTISSLPEDFATYCCQYNISYPP
AF193851.seq    .....R.....N.....H.T.W
                  <-----> <----->

```

Tabla 10[illegible]

RESULTADOS

Generación de proteína de núcleo rhTG2.

- 5 Para forzar la generación de anticuerpos que fuera más probable que eligieran como diana epítomos críticos para la actividad de TG2, en vez de sitios favorecidos en la molécula de TG2, los presentes inventores inmunizaron ratones con el núcleo catalítico de TG2 en vez de la molécula de TG2 de longitud completa. Para generar el dominio de TG2 recombinante, se generó una construcción de PCR ejecutando desde las bases 329 hasta 1419 y se insertó en el vector Pet21+(a) (Figura 1A). La inserción y expresión de este vector en bacterias BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL
- 10 produjo la generación de una proteína insoluble que abarcaba los aminoácidos 143 a 473 que engloban todo el núcleo catalítico. Esta proteína se solubilizó y replegó en Tris HCl 40 mM; NaCl 150 mM; 20 % de glicerol; cisteína 5 mM; cistina 0,5 mM a pH 8. Se ejecutaron 10 ng de esta en un gel de poliacrilamida no reductor, se realizó transferencia Western y se inmunosondó con CUB7402. Fue visible una banda clara a 37 kDa que está de acuerdo con el tamaño predicho del núcleo de TG2 (Figura 1B). También fueron inmunorreactivas bandas más grandes para
- 15 CUB7402, que lo más probablemente representan agregados de la proteína de núcleo ya que estos no estaban presentes cuando se ejecutó un gel reductor (datos no mostrados).

Inmunización y fusión.

- 20 Se inmunizaron cuatro ratones con 50 µg de núcleo de rhTG2. Aproximadamente cinco y nueve semanas después de la inmunización, se tomó una muestra de suero de cada ratón y se probó para la reactividad contra rhTG2 por ELISA usando una dilución sucesiva del suero. Todos los ratones mostraron una fuerte reacción inmunitaria al núcleo de rhTG2, incluso a la mayor dilución usada (1:51.000) (Figura 2A). Para confirmar que los anticuerpos también reconocerían la TG2 de longitud completa, se ejecutaron rhTG2 y proteína de núcleo rhTG2 sobre un gel no
- 25 desnaturizante, se realizó transferencia Western y se inmunosondaron con una dilución 1 en 1000 de suero de ratón (Figura 2B). Se reforzó el ratón con la reactividad más fuerte (ratón C) contra ambas proteínas y se recuperaron los esplenocitos para la fusión usando el Servicio de Hibridomas de la Universidad de Sheffield, Bioserv.

Selección de hibridoma positivo y clonación.

- De los 400 pocillos de hibridomas seleccionados por Bioserv como los más positivos, los sobrenadantes de 109 mostraron reactividad persistente a TG2, sin embargo solo 34 no reaccionaron con otros miembros clave de la familia de TG cuando se probaron en ELISA (ejemplos representativos mostrados en la Figura 3A). Se cribó el
- 35 sobrenadante de los que fueron específicos para TG2 por ensayo de incorporación de ³H-putrescina para la capacidad para inhibir la actividad de TG2 resultante de 100 ng de TG2 (Figura 4). Este cribado inicial indicó que los 10 sobrenadantes de hibridomas fueron capaces de inhibir la actividad de TG2 (AB1; DC1; BB7; EH6; DH2; DD9; JE12; AG9; AH3; DF4). Nueve de los diez se clonaron satisfactoriamente por dilución limitada. Para el clon DF4, aunque los clones se aislaron después de la clonación, no pareció que fueran inhibidores. Después de la clonación,
- 40 se purificó IgG de hibridoma clonado y se volvió a probar para reactividad selectiva a TG2 (Figura 3B).

Potencial inhibidor de TG2.

- Se probó la IgG de cada hibridoma clonado para actividad inhibidora de TG2 contra TG2 humana, de rata y de ratón
- 45 y se calcularon las CI50 basándose en la cantidad de IgG requerida para inhibir 1 ng de TG2. Hubo aproximadamente un intervalo de 12 veces en los valores de CI50 contra TG2 humana que varió desde el más eficaz AB-1 a $1,1 \times 10^{-5}$ mg/ml de IgG hasta el menos eficaz JE12 a $12,3 \times 10^{-5}$ mg/ml de IgG (Figura 9; Tabla 1). De forma interesante, los presentes inventores solo fueron capaces de determinar una CI50 para 4 anticuerpos (DH2, DD9, EH6 y BB7) contra TG2 de rata, teniendo el mejor, DH2, una CI50 de $2,23 \times 10^{-4}$ mg/ml de IgG que es
- 50 unas 6 veces menos activo que contra TG2 humana y comparativamente 38 veces menos activo que el mejor inhibidor de AB-1 contra TG2 (Figura 9; Tabla 1). Ninguno de los anticuerpos inhibidores fue capaz de inhibir TG2 de ratón, probablemente debido a la inmunotolerancia.

Mapeo de los epítomos de anticuerpos inhibidores

- 55 Para establecer qué epítomos en TG2 fueron inmunológicamente únicos para TG2 a la vez que inhibidores, así como establecer si estos 10 anticuerpos se dirigieron al mismo sitio o diferentes sitios, se mapeó cada anticuerpo usando presentación en fagos. Se construyó una biblioteca de fagos de TG2 y se inmunopurificó contra cada mAAb. Entonces se determinó el epítomo por secuenciación consenso de los fagos de unión.

- 60 AB1, AG1, AH1, BB7, DC1, EH6 y JE12 todos parecen unirse en total o parte a un único epítomo (Figura 5) que engloba los aminoácidos 304 a 326 y parece que se sientan en frente del sitio activo dentro de un sitio de unión a sustrato (Figura 6). Los presentes inventores denominaron esta región el sitio AB-1 y denominaron los anticuerpos que se dirigen a este sitio los anticuerpos del Grupo 1.

- 65 DF4 se dirigió únicamente a una secuencia que va desde el aminoácido 351 hasta 365 (Figura 5) que va desde la

parte delantera hasta la posterior del núcleo que engloba Asp 358 en la tríada catalítica (Figura 6). Los presentes inventores denominaron esto el Grupo 2.

DH2 y DD9 se unieron a una secuencia que abarcaba los aminoácidos 450 a 467 (Figura 5). Estos anticuerpos del Grupo 3 se unen a una región en la parte posterior del núcleo cerca de la intersección con el barril 1 β , que los presentes inventores denominaron el sitio DH2. El epítipo engloba un sitio de unión de calcio putativo (Figura 6).

Secuenciación de anticuerpos

Para establecer la secuencia de la cadena ligera variable para cada anticuerpo, se extrajo ARN de cada hibridoma inhibidor, se transcribió de forma inversa y se amplificó por PCR usando un par de cebadores FR1 altamente degenerados, combinándose los cebadores MH1 y MH2 con 3 cebadores de la región constante para amplificar genes VH.

Se muestran las secuencias VH y VK resultantes en la Figura 7 para AB1.

La capacidad de AB1 para inhibir la actividad de TG2 en una mezcla de proteínas *in vitro*

El anticuerpo inhibidor más potente contra TG2 recombinante es AB1. Para ser de valor terapéutico, debe ser capaz de no solo inhibir la actividad de TG2 en una solución pura, sino también en una solución compleja de proteínas y no asociarse de ninguna forma con otras proteínas. Para probar esto, se preparó un homogeneizado de la línea celular humana de hepatocitos HepG2. La aplicación de 0,5 μ g de AB1 fue capaz de inhibir 70 % de la actividad de TG2 (Figura 8A). Sin embargo, BB7 produjo una inhibición significativamente rebajando 90 % la actividad de TG2. El inmunosondeo de 25 μ g de este lisado con AB1 no mostró asociación inespecífica con una única banda inmunorreactiva a un tamaño correspondiente a TG2 (Figura 8B).

La capacidad de AB1 y DC1 para inhibir la actividad de TG2 extracelular.

Para evaluar si estos anticuerpos podrían inhibir la actividad de TG2 en un sistema de células, se aplicaron AB1 (Figura 10a) y DC1 (Figura 10b) a células epiteliales tubulares de riñón humano 2 (HK-2) en cultivo y se ensayó la actividad de TG extracelular usando el ensayo de biotina cadaverina. AB1 fue capaz de lograr un 60 % de inhibición y DC1 un 55 % de inhibición de la actividad cuando se aplicaron a 4 ng/ μ l en los medios de cultivo que fue comparable al inhibidor químico de pan TG cloruro de 1,3-dimetil-2-[(2-oxo-propil)tio]imidazolio aplicado a 400 μ M.

Comparación del anticuerpo AB1 con otros anticuerpos inhibidores conocidos

Para probar la eficacia de AB1 en comparación con otros anticuerpos inhibidores de TG2 conocidos, se probaron tanto fragmentos fab (Figuras 11, 12) como IgG completas (Figuras 13, 14) de un anticuerpo como se describe por Quark Biotechnology en la solicitud de patente número WO2006/100679 para inhibir la actividad de TG2 en el ensayo de incorporación de 3 H-putrescina. Se pudo inhibir 60 a 80 % de la actividad de 100 ng de TG2 humana por 500 ng de AB1. En comparación, ninguno del fragmento fab o la IgG completa del anticuerpo de Quark pudo inhibir TG2 significativamente en este ensayo.

Discusión

Existe una clara necesidad de validar TG2 como diana terapéutica en el hombre a través de una variedad de enfermedades donde estudios experimentales han sugerido su participación. Estos incluyen cicatrización de tejido, celiaquía, enfermedades neurodegenerativas y quimiorresistencia en algunos cánceres. La limitación de esto ha sido la falta de compuestos verdaderamente específicos de TG2 que pudieran inhibir selectivamente la actividad de TG2 en el hombre.

En este estudio, los presentes inventores han inmunizado por primera vez ratones con un fragmento de TG2 con el objetivo de ser capaces de aislar un intervalo más amplio de anticuerpos anti-TG2 contra el núcleo catalítico de la enzima en la búsqueda de un epítipo inhibidor. Esto provocó una buena respuesta inmunitaria con anticuerpos que reconocen tanto el núcleo de rhTG2 como TG2 nativo, pero no otras TG.

10 de los anticuerpos aislados mostraron actividad inhibidora. Estos se mapearon posteriormente con 3 epítopos específicos de TG2, pero inhibidores. Estos anticuerpos se han clonado, secuenciado y aislado, calculándose los valores de CI50. Tres anticuerpos (AB1, DC1 y BB7) que se dirigen a un sitio de sustrato demostraron ser inhibidores particularmente eficaces. Y, lo que es más importante, estos anticuerpos también funcionaron bien tanto en un lisado celular como en cultivo celular, que indica que estos anticuerpos tienen el potencial de funcionar en un entorno rico en proteínas que es crítico para la aplicación *in vivo*.

Los presentes inventores creen que un elemento clave en la generación satisfactoria de estos anticuerpos inhibidores ha sido la decisión de inmunizar con solo la proteína de núcleo. Que sepan los presentes inventores, ninguno de los anticuerpos de TG2 comerciales tiene potencial inhibidor de cualquier significancia. Los propios

intentos de los presentes inventores para usar TG2 de longitud completa produjeron un gran número de anticuerpos, algunos de los cuales fueron específicos para TG2 y ninguno de los cuales fue inhibidor. Esto parecería ser debido a una clara preferencia inmunogénica por bucles de proteína dentro de TG2 de longitud completa, muchos de los cuales caen en la parte posterior del núcleo catalítico en posiciones similares a las del anticuerpo anti-TG2 más ampliamente usado, CUB7402 (aa447 aa478).

Es sorprendente que el enfoque de los presentes inventores haya conducido a la producción de anticuerpos mucho más eficaces. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, los presentes inventores creen que produciendo simplemente anticuerpos para una proteína más pequeña que cubre solo el núcleo central, no solo eliminan algunos de los epítomos inmunológicos favorecidos, sino que también fuerzan al direccionamiento del núcleo. Esto solo aumenta la variedad de anticuerpos disponibles para la selección y así cobertura más amplia del núcleo. Sin embargo, el inmunizar con solo el núcleo significa que se pierde gran parte del plegamiento del núcleo y así algunos de los epítomos que quizás puedan estar menos disponibles dentro de una molécula de TG2 total puedan ser epítomos más atractivos con el núcleo en este formato. Dado que los 10 anticuerpos reconocieron epítomos lineales (es decir, unidos a TG2 sobre un gel reductor), mientras que 80 % de los anticuerpos que los presentes inventores aislaron previamente usando TG2 de longitud completa como inmunógeno fueron dependientes de la conformación, sugiere que esto puede ser un factor importante.

Ha habido previamente otros estudios que han postulado la idea de un anticuerpo inhibidor de TG2 para aplicación humana. Esposito y colaboradores desarrollaron anticuerpos recombinantes a partir de pacientes con celiacía donde se ha propuesto que los anticuerpos de TG2 pueden tener una función inhibidora [19]. Uno de estos anticuerpos se desarrolló para aplicación comercial por Quark Biotechnology y una solicitud de patente presentada (WO2006/100679). Este anticuerpo demostró algunos primeros datos interesantes en la prevención de fibrosis renal en el modelo de rata UO. Sin embargo, los presentes inventores produjeron una versión recombinante de este anticuerpo y aunque reaccionó con TG2 en ELISA (Figura 17) y transferencia Western, lograron poca inhibición hasta 500 ng de IgG por ng de TG2 para este anticuerpo, a la que todos los anticuerpos desarrollados en este estudio bloquean esencialmente toda la actividad de TG2. Además, el documento de patente WO2006/100679 describe la generación de una versión de ratón de este anticuerpo humano, y como tal sería difícil la larga aplicación en modelos reconocidos de rata de enfermedad renal.

Es de notar en el presente estudio el mapeo de los 3 epítomos inhibidores dentro del núcleo de TG2. El epítomo de AB1 es, de lejos, el más potente para elegir como diana, que es quizás sorprendente dada la posición del epítomo. El examen de su posición dentro de la estructura activa de TG2 predicha [20] sugiere que se une en el puerto de entrada a la tríada catalítica en lo que puede ser un sitio de sustrato. Dado que los sustratos que los presentes inventores usaron en su ensayo de cribado son relativamente pequeños (putrescina y dimetilcaseína), es quizás sorprendente que este sitio sea tan eficaz. Sin embargo, la posición del epítomo debe ser tal que la gran IgG (150 kDa) se sitúe firmemente en el sitio catalítico. A partir de los datos de epítomos se puede predecir que el sitio de DD9 puede ser más eficaz, ya que está asociado con un sitio de unión de calcio putativo [21]. Sin embargo, el examen de la bibliografía sugiere 5 o más sitios de unión de Ca^{2+} putativos [21] y, aunque tiene claramente un espectacular efecto, no es crítico para toda la actividad de TG2.

El sitio de DF4 sería hipotéticamente el epítomo más eficaz, ya que el anticuerpo se une a 1 de los aminoácidos esenciales en la tríada catalítica. Sin embargo, no ha sido posible clonar satisfactoriamente DF4 que produce este anticuerpo inhibidor y, como tal, no ha sido posible la producción de IgG suficiente para realizar adecuadamente pruebas de CI50. De hecho, puede ser muy difícil clonar anticuerpos que tienen eficacia demasiado alta debido al trabajo de Gunzler *et al.* (1982) FEBS Lett. 150(2): 390-6, que sugirió que los que linfocitos necesitaban actividad de TG2 para proliferar y así los anticuerpos con mejor potencial inhibidor solo podían ser posibles usando enfoques recombinantes o un sistema de extracción continua de IgG.

Uno de los problemas más frustrantes en la realización de este trabajo ha sido la aparente incapacidad de todos los anticuerpos desarrollados para bloquear eficientemente la actividad de TG2 no humana, que es crítico para las pruebas preclínicas. Todos reaccionaron con TG2 de rata y de ratón en tanto transferencia Western como ELISA, en algunos casos con poca diferencia de intensidad. Sin embargo, de los 9 anticuerpos para los que los presentes inventores produjeron IgG, solo fue posible determinar una CI50 para 4 en rata y ninguno en ratón. Los 4 donde se calculó una CI50 contra TG2 de rata mostraron una CI50 30 veces o más baja contra TG2 de rata que AB1 contra TG2 humana, que significa que cualquier dosis *in vivo* sería prohibitivamente grande. Además, ninguno inhibiría en absoluto en un lisado celular de rata. Dada la reactividad en ELISA y transferencias Western, más que existen solo 5 apareamientos entre especies para AB1 y 3 para DD9, fue sorprendente la significativa especificidad de especies para la inhibición y demuestra claramente la importancia crítica de la afinidad para la inhibición eficaz. Así, habiendo identificado estos epítomos inhibidores para TG2 humana, ahora es crítico que se desarrollen anticuerpos análogos para estos sitios en TG2 de rata si su valor se va a establecer en modelos preclínicos *in vivo* de enfermedad.

Está disponible un amplio intervalo de inhibidores de TG. En particular, los compuestos basados en tiomidazol originalmente desarrollados por Merke Sharpe Dome [22], los análogos de CBZ-glutamilo desarrollados por Griffin y colaboradores [23] que los presentes inventores han usado muy satisfactoriamente para tratar cicatrización de riñón experimental [16], y los inhibidores de tipo dihidroisoxazol desarrollados por Khosla y colaboradores [24-27] usados

satisfactoriamente en diversos modelos de cáncer. Hay esperanza de que el continuo refinamiento de estos compuestos pueda dar un inhibidor de TG2 humana viable, pero la reactividad cruzada de la familia de TG o la potencial naturaleza tóxica de los compuestos parece haber impedido esto. Más recientemente, se han descrito acilidenoxoindoles como una nueva clase reversible de inhibidores de TG2 [24], pero faltan datos referentes a su reactividad cruzada con otros miembros de la familia de TG. En la conferencia de Gordon de 2010 sobre TG2 en enfermedad humana, Pasternack y colaboradores de Zedira presentaron detalles de una gama de compuestos que usan aceptores de Michael de la cadena lateral como inhibidores de TG2 con reivindicaciones de idoneidad para la aplicación *in vivo* y selectividad de TG2, sin embargo, hasta la fecha no se ha materializado una publicación completa sobre esto. En la misma reunión, trabajo previo de Macdonald *et al.* demostró algunos desarrollos interesantes en el diseño de un inhibidor de TG2 para el tratamiento de corea de Huntington, pero nuevamente todavía se espera una publicación completa. Indudablemente, sería altamente deseable un inhibidor de molécula pequeña de TG2 en caso de que pudiera lograrse. La penetración de tejido, la capacidad para cruzar la barrera hematoencefálica, producción, coste y fácil dosificación son solo algunos de los beneficios. Sin embargo, un anticuerpo inhibidor como se ha desarrollado aquí puede ser en cierta forma preferible.

TG2 es claramente una enzima multifuncional y se ha asociado a una variedad de funciones celulares que incluyen estabilización y transporte nuclear [28, 29], endocitosis [30, 31], señalización de GTPasa [32-34], apoptosis [35, 36], adhesión celular [37-39], integridad citoesquelética [28, 29] y estabilización de ECM [9]. Claramente, un inhibidor de molécula pequeña puede impedir todas estas funciones, ya que en general tienen acceso libre al espacio extracelular y el interior de la célula. Un anticuerpo no puede entrar en la célula y como tales no se afectarían las funciones intracelulares de TG2. Y, lo que es más importante, la mayoría de las funciones patológicas de TG2 parecen ser extracelulares, tales como su función en la cicatrización de tejido y fibrosis, celiaquía y cáncer. Así, el uso de un anticuerpo traería un grado adicional de selectividad que prevendría los efectos intracelulares no deseados. Por tanto, un anticuerpo ofrecería ventajas en el bloqueo de TG2 en enfermedades fibróticas y de cicatrización donde TG2 reticula proteínas de ECM, en celiaquía donde la gliadina se desamida en el espacio extracelular y en quimiorresistencia en cáncer donde la adhesión celular parece ser el factor protector. Sin embargo, a menos que se pueda diseñar un pequeño fragmento Fab que pueda cruzar la barrera hematoencefálica, un anticuerpo inhibidor de TG2 sería de poco uso en el tratamiento de patologías neurológicas.

En conclusión, los presentes inventores han sido capaces de desarrollar por primera vez anticuerpos inhibidores de TG2 que se dirigen selectivamente a TG2. Los presentes inventores también han identificado 3 epítomos inhibidores novedosos dentro del dominio de núcleo de TG2. La humanización del anticuerpo AB1 abrirá la posibilidad por primera vez de terapia dirigida de TG2 en el hombre.

Referencias

1. Tissue transglutaminase in normal and abnormal wound healing: review article. Verderio, E.A., T. Johnson, y M. Griffin, *Amino Acids*, 2004. 26(4): p. 387-404.
2. Transglutaminase-mediated cross-linking is involved in the stabilization of extracellular matrix in human liver fibrosis. Grenard, P., S. Bresson-Hadni, S. El Alaoui, M. Chevallier, D.A. Vuitton, y S. Ricard-Blum, *J Hepatol*, 2001. 35(3): p. 367-75.
3. Changes in transglutaminase activity in an experimental model of pulmonary fibrosis induced by paraquat. Griffin, M., L.L. Smith, y J. Wynne, *Br J Exp Pathol*, 1979. 60(6): p. 653-61.
4. Cardiac specific overexpression of transglutaminase II (G(h)) results in a unique hypertrophy phenotype independent of phospholipase C activation. Small, K., J.F. Feng, J. Lorenz, E.T. Donnelly, A. Yu, M.J. Im, G.W. Dorn, 2nd, y S.B. Liggett, *J Biol Chem*, 1999. 274(30): p. 21291-6.
5. Tissue transglutaminase and the progression of human renal scarring. Johnson, T.S., A.F. El-Koraie, N.J. Skill, N.M. Baddour, A.M. El Nahas, M. Njloma, A.G. Adam, y M. Griffin, *J Am Soc Nephrol*, 2003. 14(8): p. 2052-62.
6. Thrombin upregulates tissue transglutaminase in endothelial cells: a potential role for tissue transglutaminase in stability of atherosclerotic plaque. Auld, G.C., H. Ritchie, L.A. Robbie, y N.A. Booth, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001. 21(10): p. 1689-94.
7. Cross-linking of fibronectin to collagenous proteins. Mosher, D.F., *Mol Cell Biochem*, 1984. 58(1-2): p. 63-8.
8. Transglutaminases. Lorand, L. y S.M. Conrad, *Mol Cell Biochem*, 1984. 58(1-2): p. 9-35.
9. Modulation of tissue transglutaminase in tubular epithelial cells alters extracellular matrix levels: a potential mechanism of tissue scarring. Fisher, M., R.A. Jones, L. Huang, J.L. Haylor, M. El Nahas, M. Griffin, y T.S. Johnson, *Matrix Biol*, 2009. 28(1): p. 20-31.
10. Transglutaminase transcription and antigen translocation in experimental renal scarring. Johnson, T.S., N.J. Skill, A.M. El Nahas, S.D. Oldroyd, G.L. Thomas, J.A. Douthwaite, J.L. Haylor, y M. Griffin, *J Am Soc Nephrol*, 1999. 10(10): p. 2146-57.
11. Do changes in transglutaminase activity alter latent transforming growth factor beta activation in experimental diabetic nephropathy? Huang, L., J.L. Haylor, M. Fisher, Z. Hau, A.M. El Nahas, M. Griffin, y T.S. Johnson, *Nephrol Dial Transplant*, 2010. 25(12): p. 3897-910.
12. Expression induced by interleukin-6 of tissue-type transglutaminase in human hepatoblastoma HepG2 cells. Suto, N., K. Ikura, y R. Sasaki, *J Biol Chem*, 1993. 268(10): p. 7469-73.
13. TNF-alpha modulates expression of the tissue transglutaminase gene in liver cells. Kuncio, G.S., M. Tsyganskaya, J. Zhu, S.L. Liu, L. Nagy, V. Thomazy, P.J. Davies, y M.A. Zern, *Am J Physiol*, 1998. 274(2 Pt 1):

p. G240-5.

14. Inhibition of transglutaminase activity reduces extracellular matrix accumulation induced by high glucose levels in proximal tubular epithelial cells. Skill, N.J., T.S. Johnson, I.G. Coutts, R.E. Saint, M. Fisher, L. Huang, A.M. El Nahas, R.J. Collighan, y M. Griffin, J Biol Chem, 2004. 279(46): p. 47754-62.

15. Transglutaminase inhibition reduces fibrosis and preserves function in experimental chronic kidney disease. Johnson, T.S., M. Fisher, J.L. Haylor, Z. Hau, N.J. Skill, R. Jones, R. Saint, I. Coutts, M.E. Vickers, A.M. El Nahas, y M. Griffin, J Am Soc Nephrol, 2007. 18(12): p. 3078-88.

16. Transglutaminase inhibition ameliorates experimental diabetic nephropathy. Huang, L., J.L. Haylor, Z. Hau, R.A. Jones, M.E. Vickers, B. Wagner, M. Griffin, R.E. Saint, I.G. Coutts, A.M. El Nahas, y T.S. Johnson, Kidney Int, 2009. 76(4): p. 383-94.

17. Tissue transglutaminase contributes to interstitial renal fibrosis by favoring accumulation of fibrillar collagen through TGF-beta activation and cell infiltration. Shweke, N., N. Boulos, C. Jouanneau, S. Vandermeersch, G. Melino, J.C. Dussaule, C. Chatziantoniou, P. Ronco, y J.J. Boffa, Am J Pathol, 2008. 173(3): p. 631-42.

18. GPR56, an atypical G protein-coupled receptor, binds tissue transglutaminase, TG2, and inhibits melanoma tumor growth and metastasis. Xu, L., S. Begum, J.D. Hearn, y R.O. Hynes, Proc Natl Acad Sci USA, 2006. 103(24): p. 9023-8.

19. Anti-tissue transglutaminase antibodies from celiac patients inhibit transglutaminase activity both in vitro and in situ. Esposito, C., F. Paparo, I. Caputo, M. Rossi, M. Maglio, D. Sblattero, T. Not, R. Porta, S. Auricchio, R. Marzari, y R. Troncone, Gut, 2002. 51(2): p. 177-81.

20. Transglutaminase 2 undergoes a large conformational change upon activation. Pinkas, D.M., P. Strop, A.T. Brunger, y C. Khosla, PLoS Biol, 2007. 5(12): p. e327.

21. Functional significance of five noncanonical Ca²⁺-binding sites of human transglutaminase 2 characterized by site-directed mutagenesis. Kiraly, R., E. Csosz, T. Kurtan, S. Antus, K. Szigeti, Z. Simon-Vecsei, I.R. Korponay-Szabo, Z. Keresztessy, y L. Fesus, Febs J, 2009. 276(23): p. 7083-96.

22. **3,5 substituted 4,5-dihydroisoxazoles as transglutaminase inhibitors.** Syntex, US Patent 4, 912, 120, 1990. March.

23. Griffin M, Coutts I G, y S. R, Nuevos compuestos y métodos de uso de los mismos, en *Número de publicación internacional* WO 2004/113363, 2004: patente de GB PCT/GB2004/002569.

24. Acylideneoxindoles: a new class of reversible inhibitors of human transglutaminase 2. Klock, C., X. Jin, K. Choi, C. Khosla, P.B. Madrid, A. Spencer, B.C. Raimundo, P. Boardman, G. Lanza, y J.H. Griffin, Bioorg Med Chem Lett. 21(9): p. 2692-6.

25. Transglutaminase 2 inhibitors and their therapeutic role in disease states. Siegel, M. y C. Khosla, Pharmacol Ther, 2007. 115(2): p. 232-45.

26. Structure-based design of alpha-amido aldehyde containing gluten peptide analogues as modulators of HLA-DQ2 and transglutaminase 2. Siegel, M., J. Xia, y C. Khosla, Bioorg Med Chem, 2007. 15(18): p. 6253-61.

27. Novel therapies for celiac disease. Sollid, L.M. y C. Khosla, J Intern Med. 269(6): p. 604-13.

28. Transglutaminase 2: an enigmatic enzyme with diverse functions. Fesus, L. y M. Piacentini, Trends Biochem Sci, 2002. 27(10): p. 534-9.

29. Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. Lorand, L. y R.M. Graham, Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. 4(2): p. 140-56.

30. Transglutaminase 2 is needed for the formation of an efficient phagocyte portal in macrophages engulfing apoptotic cells. Toth, B., E. Garabuczi, Z. Sarang, G. Vereb, G. Vamosi, D. Aeschlimann, B. Blasko, B. Becsi, F. Erdodi, A. Lacy-Hulbert, A. Zhang, L. Falasca, R.B. Birge, Z. Balajthy, G. Melino, L. Fesus, y Z. Szondy, J Immunol, 2009. 182(4): p. 2084-92.

31. Transglutaminase is essential in receptor-mediated endocytosis of alpha 2-macroglobulin and polypeptide hormones. Davies, P.J., D.R. Davies, A. Levitzki, F.R. Maxfield, P. Milhaud, M.C. Willingham, y I.H. Pastan, Nature, 1980. 283(5743): p. 162-7.

32. GTP binding and signaling by Gh/transglutaminase II involves distinct residues in a unique GTP-binding pocket. Iismaa, S.E., M.J. Wu, N. Nanda, W.B. Church, y R.M. Graham, J Biol Chem, 2000. 275(24): p. 18259-65.

33. The core domain of the tissue transglutaminase Gh hydrolyzes GTP and ATP. Iismaa, S.E., L. Chung, M.J. Wu, D.C. Teller, V.C. Yee, y R.M. Graham, Biochemistry, 1997. 36(39): p. 11655-64.

34. Gh: a GTP-binding protein with transglutaminase activity and receptor signaling function. Nakaoka, H., D.M. Perez, K.J. Baek, T. Das, A. Husain, K. Misono, M.J. Im, y R.M. Graham, Science, 1994. 264(5165): p. 1593-6.

35. Searching for the function of tissue transglutaminase: its possible involvement in the biochemical pathway of programmed cell death. Fesus, L. y V. Thomazy, Adv Exp Med Biol, 1988. 231: p. 119-34.

36. Induction and activation of tissue transglutaminase during programmed cell death. Fesus, L., V. Thomazy, y A. Falus, FEBS Lett, 1987. 224(1): p. 104-8.

37. Fibronectin-tissue transglutaminase matrix rescues RGD-impaired cell adhesion through syndecan-4 and beta1 integrin co-signaling. Telci, D., Z. Wang, X. Li, E.A. Verderio, M.J. Humphries, M. Baccarini, H. Basaga, y M. Griffin, J Biol Chem, 2008. 283(30): p. 20937-47.

38. Regulated expression of tissue transglutaminase in Swiss 3T3 fibroblasts: effects on the processing of fibronectin, cell attachment, and cell death. Verderio, E., B. Nicholas, S. Gross, y M. Griffin, Exp Cell Res, 1998. 239(1): p. 119-38.

39. A novel RGD-independent cell adhesion pathway mediated by fibronectin-bound tissue transglutaminase rescues cells from anoikis. Verderio, E.A., D. Telci, A. Okoye, G. Melino, y M. Griffin, J Biol Chem, 2003. 278(43): p. 42604-14.

Ejemplo 2: Secuenciación de novedosos anticuerpos inhibidores de TG2 de la invención.**Secuenciación de anticuerpos**

Para establecer las secuencias de las regiones variables de cada anticuerpo de la invención, se procesó un sedimento de las células de hibridoma usando el kit Qiagen RNeasy Mini para extraer el ARN siguiendo los protocolos del fabricante. El ARN extraído se transcribió de forma inversa para producir un ADNc usando un kit de síntesis de ADNc de la 1ª hebra (GE Healthcare), usando un cebador NotI-dT₁₈, según los protocolos del fabricante.

Para determinar la secuencia de la cadena pesada, se amplificó el ADNc de ratón por PCR usando un conjunto de cebadores degenerados (MHV1-12) con un cebador de la región constante (MHCG1, MHCG2A, MHCG2B, MHCG3, o una mezcla de los cuatro) como se muestra en la Tabla 12. Similarmente, para determinar la secuencia de la cadena ligera, se amplificó el ADNc de ratón usando un conjunto de cebadores degenerados (MKV1-11) con un cebador de la región constante MKC como se muestra en la Tabla 13.

Si no se observaron productos de amplificación usando el conjunto inicial de PCR de la cadena pesada, se llevó a cabo una 5' RACE PCR (Invitrogen), usando el cebador NotI-dT₁₈ para generar ADNc; y los cebadores de la región constante (MHCG1, MHCG2A, MHCG2B, MHCG3, o una mezcla de los cuatro) y el cebador de ancla 5' RACE, GGCCACGCGTCTGACTAGTACGGGIIIGGGIIIGGGIIIG (donde I es la base para desoxiinosina) para la PCR.

Se ligaron las bandas de amplificación resultantes en el vector pCR2.1®-TOPO® usando el kit TOPO-TA Cloning® (Invitrogen) usando el protocolo del fabricante y se enviaron a GATC Biotech AG para la secuenciación.

Tabla 12: Cebadores de PCR para clonar regiones variables de la cadena pesada de ratón

Nombre	Secuencia
MHV1	ATGAAATGCAGCTGGGGCATCTTCTTC
MHV2	ATGGGATGGAGCTRTATGATOSYTCTT
MHV3	ATGAAGWTGTGGTTAAACTGGGTTTTT
MHV4	ATGRACCTTGGGYTCAGCTTGRITT
MHV5	ATGGACTCCAGGCTCAATTTAGTTTTCTT
MHV6	ATGGCTGTCYTRGSGCTRCTCTTCTGC
MHV7	ATGGRATGGAGCKGGRTCTTTMTCTT
MHV8	ATGAGAGTGCTGATTCTTTTGTC
MHV9	ATGGMTTGGGTGTGGAMCTTGCTATTCCTG
MHV10	ATGGGCAGACTTACATTCTCATTCTCTG
MHV11	ATGGATTTTGGGCTGATTTTTTTTATTG
MHV12	ATGATGGTGTTAAGTCTTCTGTACCTG
MHCG1	CAGTGGATAGACAGATGGGGG
MHCG2A	CAGTGGATAGACCGATGGGGC
MHCG2b	CAGTGGATAGACTGATGGGGG
MHCG3	CAAGGGATAGACAGATGGGGC

Códigos de ambigüedad: R = A o G; Y = C o T; M = A o C; K = G o T; S = G o C; W = A o T. MHV indica cebadores que se hibridan con las secuencias conductoras de los genes de la región variable de la cadena pesada de ratón, MHCG indica cebadores que se hibridan con los genes de la región constante de ratón.

Tabla 13: Cebadores de PCR para clonar regiones variables de la cadena ligera kappa de ratón

Nombre	Tamaño	Secuencia
MKV1	30-mero	ATGAAGTTGVVTGTTAGGCTGTTGGTGCTG
MKV2	29-mero	ATGGAGWCAGACACACTCCTGYTATGGGTG
MKV3	30-mero	ATGAGTGTGCTCACTCAGGTCTGSGTTG
MKV4	33-mero	ATGAGGRCCCCTGCTCAGWTTTGGMWTCTTG
MKV5	30-mero	ATGGATTTWAGGTGCAGATTWTCAGCTTC
MKV6	27-mero	ATGAGGKCKKTGKTSAGSTCTGRGG
MKV7	31-mero	ATGGGCWTCAAGATGGAGTCACAKWYYCWGG
MKV8	31-mero	ATGTGGGGAYCTKTTYCMMTTTTTCAATTG
MKV9	25-mero	ATGGTRTCCWCASCTCAGTTCCTTG
MKV10	27-mero	ATGTATATATGTTTGTGTCTATTTCT
MKV11	28-mero	ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTTCC
CL12A		ATGRAGTYWCAGACCCAGGTCTTYRT
CL12B		ATGGAGACACATTCTCAGGTCTTTGT

(continuación)

Nombre	Tamaño	Secuencia
CL13		ATGGATTCACAGGCCAGGTTCTTAT
CL14		ATGATGAGTCCTGCCAGTTCCTGTT
CL15		ATGAATTTGCCTGTTTCATCTCTTGGTGCT
CL16		ATGGATTTTCAATTGGTCCTCATCTCCTT
CL17A		ATGAGGTGCCTARCTSAGTTCCTGRG
CL17B		ATGAAGTACTCTGCTCAGTTTCTAGG
CL17C		ATGAGGCATTCTCTTCAATTCTTGGG
MKC	20-mero	ACTGGATGGTGGGAAGATGG
Códigos de ambigüedad: R = A o G; Y = C o T; M = A o C; K = G o T; S = G o C; W = A o T. MKV indica cebadores que se hibridan con las secuencias conductoras de los genes de la región variable de la cadena ligera kappa de ratón, MKC indica el cebador que se hibrida con el gen de la región constante kappa de ratón.		

Datos de secuencias

- 5 Se secuenció el anticuerpo AB1, además de los anticuerpos BB7, DC1, JE12, EH6, AG9, AH3, DD9, DH2, DD6 y IA12. Las secuencias se proporcionan en las Figuras 18 a 28.

Ejemplo 3: Construcción y caracterización de novedosos anticuerpos anti-TG2 quiméricos y humanizados de la invención.

10 Para caracterizar adicionalmente los anticuerpos de la invención y para permitir la clasificación y la priorización de anticuerpos para la humanización, se construyó un panel de anticuerpos de TG2 quiméricos (regiones variables murinas e IgG1 humana y kappa humana). La metodología usada para producir los anticuerpos quiméricos se explica a continuación.

Métodos*Bases de datos de ADNc de VH y VK humano*

20 Se usaron las secuencias de proteínas de inmunoglobulinas humanas y de ratón de International Immunogenetics Database 2009¹ y Kabat Database Release 5 of Sequences of Proteins of Immunological Interest (última actualización 17-Nov-1999)² para compilar una base de datos de secuencias de inmunoglobulina humana en un alineamiento de Kabat. La base de datos de los presentes inventores contiene 10.606 secuencias VH y 2.910 VK.

Modelo molecular de AB1

30 Como representante de los anticuerpos del Grupo 1 (es decir, anticuerpos que se unen al epítipo que abarca los aminoácidos 304 a 326 de TG2 humana), se ha calculado un modelo de homología de las regiones variables del anticuerpo AB1 de ratón usando el programa Modeller³ ejecutado en modo automático. Las coordenadas atómicas de 1 MQK.pdb, 3LIZ.pdb y 1MQK.pdb fueron los moldes de secuencia de mayor identidad para la interfase, VL y VH, respectivamente, como se ha determinado por análisis Blast de la base de datos de estructuras Accelrys antibody pdb. Estos moldes se usaron para generar 20 modelos iniciales, el mejor de los cuales se refinó modelando cada bucle de CDR con sus 3 mejores moldes de bucle.

Selección de la región estructural de hAB1

40 Se usó el programa de análisis de secuencias, gibsSR, para interrogar las bases de datos de VH y VK humanas con las secuencias de proteínas de VHc, VKc y VKc₁ de AB1, VHc y VKc de BB7 y VHc y VKc de DC1 usando diversos criterios de selección. Se identificaron restos de FW dentro de 5 Å de un resto de CDR (definición de Kabat) en el modelo de homología de anticuerpo AB1 de ratón, y se designaron los restos "Proximidad 5 Å".

45 Se eligió AF06220 como FW sobre el que basar las versiones de cadena pesada humanizadas iniciales. La Tabla 14 muestra el alineamiento y la identidad de restos de AF06220 para anticuerpos murinos. La Tabla 15 muestra la envoltura de proximidad 5 Å de las secuencias. AF062260 solo tiene 1 mutación somática lejos de su gen VH de la línea germinal Z12347 (Tabla 16).

50 Se eligió AY247656 como FW sobre el que basar la cadena ligera kappa humanizada de AB1 inicial. El alineamiento y la identidad de restos con la cadena ligera kappa del anticuerpo AB1 murino se muestran en la Tabla 17; la Tabla 18 muestra la envoltura de proximidad 5 Å de las secuencias. La secuencia muestra 5 mutaciones somáticas de su gen VK de la línea germinal X93620 (Tabla 19).

Se eligió AF193851 como FW sobre el que basar las otras construcciones de cadena ligera kappa humanizada. El

alineamiento y la identidad de restos con los anticuerpos murinos se muestran en la Tabla 20. La Tabla 21 muestra la envoltura de proximidad 5 Å de las secuencias. La secuencia no muestra mutaciones somáticas de su gen VK de la línea germinal J00248 (Tabla 22).

5 Generación de vectores de expresión

La construcción de vectores de expresión quiméricos implica añadir una secuencia conductora adecuada a VH y VL, precedida por un sitio de restricción Hind III y una secuencia de Kozak. La secuencia de Kozak garantiza la eficiente traducción de la secuencia de la región variable. Define el correcto codón AUG a partir del cual un ribosoma puede comenzar la traducción, y la base más crítica es la adenina en la posición -3, en la dirección 5' del inicio AUG.

Para la cadena pesada, la construcción de los vectores de expresión quiméricos implica introducir un fragmento 5' de la región constante $\gamma 1$ humana, hasta un sitio de restricción Apal natural, contiguo al extremo 3' de la región J de la región variable. CH se codifica en el vector de expresión en la dirección 3' de la secuencia VH insertada, pero carece del intrón V-C.

Para la cadena ligera, se añade el sitio donante de corte y empalme natural y un sitio BamHI en la dirección 3' de la región V. La secuencia donante de corte y empalme facilita el corte y empalme del intrón V:C kappa que es necesario para la unión en marco de VL a la región constante.

Se optimizaron y sintetizaron las secuencias de ADN de las regiones variables por GeneArt®. La secuencia conductora se ha seleccionado como una que da buena expresión de anticuerpo en células de mamífero cultivadas.

Se escindieron las construcciones de la región variable de la cadena pesada del vector de clonación usando digestión con HindIII + Apal, se purificaron y se ligaron en el vector de expresión de la cadena pesada MRCT similarmente cortado y tratado con fosfatasa, y se usaron para transformar bacterias TOP10.

Se escindieron las construcciones de la región variable de la cadena kappa usando digestión con HindIII + BamHI, se purificaron y se ligaron en el vector de expresión de la cadena ligera kappa MRCT similarmente cortado y tratado con fosfatasa, y se usaron para transformar bacterias TOP10.

Expresión de anticuerpos

Se generó un vector de expresión de inserto doble que codificaba tanto las cadenas pesadas como kappa y se transfectó en células HEK293T. Se purificó sobrenadante de cultivo celular por cromatografía de afinidad en proteína G-agarosa según los protocolos del fabricante.

ELISA de unión

Se cotransfectaron células HEK 293F con combinaciones de diferentes vectores de la cadena ligera humanizada en asociación con diferentes vectores de la cadena pesada humanizada. Se usó TG2 humana recombinante para medir la unión de anticuerpo por ELISA. Los resultados indicaron que la versión de cadena pesada RHA (Tabla 23), en combinación con cualquiera de las versiones de cadena ligera RKE y RKJ (Tabla 24) (que representan las diferentes versiones de cadena ligera humanizada), mostraron unión óptima (Figura 34), y, por tanto, se seleccionaron para caracterización adicional. Se usó un enfoque similar para identificar pares óptimos de cadenas pesadas y ligeras de BB7 humanizadas, y cadenas pesadas y ligeras de DC1 humanizadas.

La versión de cadena pesada RHA es un injerto no modificado de regiones CDR de ratón del anticuerpo AB1 en la secuencia de donante humano. Sin embargo, ambas versiones de cadena ligera RKE y RKJ tienen la misma retromutación que reside solo en la proximidad 5 Å, F72 (Tabla 24). Esta retromutación se encuentra fuera de los restos de Vernier⁴, Canónicos⁵ o de Interfase⁶.

Referencias

1. Lefranc, M.P. IMGT, the international ImMunoGeneTics database(R). Nucleic Acids Res. 31, 307-310 (2003).
2. Kabat, E.A., Wu, T.T., Perry, H.M., Gottesman, K.S. y Foeller, C. Sequences of Proteins of Immunological Interest. NIH National Technical Information Service, (1991).
3. Eswar, N. *et al.* Comparative protein structure modeling using Modeller. Curr. Protoc. Bioinformatics. Capítulo 5:Unidad 5.6., Unit (2006).
4. Foote, J. y Winter, G. (1992). Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops. J Mol. Biol. 224, 487-499.
5. Morea, V., Lesk, A. M. y Tramontano, A. (2000). Antibody modeling: implications for engineering and design. Methods 20, 267-279.
6. Chothia, C., Novotny, J., Brucoleri, R. y Karplus, M. (1985). Domain association in immunoglobulin molecules. The packing of variable domains. J Mol. Biol. 186, 651-663.

La siguiente Tabla A resume los anticuerpos quiméricos y humanizados producidos con una referencia cruzada a los identificadores usados en las figuras.

Anticuerpo murino	Anticuerpo quimérico	Anticuerpo humanizado
AB1	cAB001 cAB003	hAB004 (hAB001AE) hAB005 (hAB001AJ)
BB7	cBB001	hBB001AA hBB001BB
DC1	cDC001	hDC001AA hDC001BB
DD6	cDD6001	
DD9	cDD9001	
DH2	cDH001	

5 TABLAS

Tabla 14

Números de Kabat ²	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
Vernier ⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Canónicos ³	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Interfase ⁵	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Proximidad 5 Å	***	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CDR	<----->											
AB Vhc (mAB001VH)	-	EVQLVDSGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTLSSSAMS	-	WVROTPDRRLRWVATISV	-	GGGKTYYPDSVKGRTISRDNKNTLYLQMSLSRSEDATVYCAKLI	-	SLYWGQGTTLTVSS	-			
BB7 Vhc (mBB7001VH)	-	AVQLVDSGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTLSSSAMS	-	WVROTPDKRLRWVATISV	-	GGRTYYPDSVKGRTISRDNKNTLYLQMSLSRSEDATVYCAKLI	-	SPYWGQGTTLTVSS	-			
DC1 Vhc (mDC001VH)	-	EVQLVDSGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTLSSSAMS	-	WVROTPDKRLRWVATISV	-	GGRTYYPDSVKGRTISRDNKNTLYLQMSLSRSEDATVYCAKLI	-	SLYWGQGTTLTVSS	-			
AF062260	C...	L.....Q.....R.....F..Y.....	-	A.GKG....SA..G..S..S..A.....S.....A...V.....DG	-	GV.....LV....	-		-			

La Tabla 14 muestran el alineamiento y la identidad de restos de AF062260 para los anticuerpos murinos. Se muestran las identidades de restos por un símbolo de punto (.). Se muestran las diferencias de restos, si procede. Se usan huecos (-) para mantener la numeración de Kabat, y para mostrar inserción o delección de restos, si procede.

Tabla 15

	Restos de proximidad 5 Å
AB_Vhc (mAB001VH)	EVQLCAFTLSWVRWVARFTISRNLCAKWG
BB7_Vhc (mBB7001VH)	AVQLCAIFSWVRWVARFTVSRSLCAKWG
DC1_Vhc (mDC001VH)	EVQLCAFTLSWVRWVARFTISRNLFCARWG
AF062260 F..... S.....

La Tabla 15 muestran los restos de la región estructural de la cadena pesada del anticuerpo que se encuentran dentro de una envoltura 5 Å de las CDR. Se muestran las identidades de restos por un símbolo de punto (.). Se muestran las identidades de restos, si procede.

Tabla 16

	10	20	30	40	50	60	70	80	90
Z12347.seq	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTFSYAMSWVRQAPGKLEWVSAISGSGG	STYADSVKGRFTISRDN	SKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCAK					
AF062260.seqR

La Tabla 16 muestra que AF062260 tiene 1 mutación somática lejos del gen VH de la línea germinal Z12347. Se muestran las identidades de restos por un símbolo de punto (.). Se muestran las identidades de restos, si procede.

Tabla 17

Números de Kabat ²	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	A
Vernier ⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Canónicos ³	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Interfase ⁵	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Proximidad 5 Å	*****	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CDR	<----->											
AB Vhc (mAB001VH)	-	EIVLTQSPSSMYASLGERVITICKASQ	-	DINSYLTWFGQKPKGSKPTILYRNLFDGVP	-	SFRSGSGSGQDFLTISSEYEDMGLIYCYLQYDDF	-	YTFGGGTGLEI-K	-			
AY247656	-LS..V..D.....Q.....	-	..SN..N.Y.....A..L..DASN.EF.....T..TF.....QP..F..T...Q..NTY.....L.....	-		-		-			

La Tabla 17 muestran el alineamiento y la identidad de restos de AY247656 para el anticuerpo AB1 murino. Se muestran las identidades de restos por un símbolo de punto (.). Se muestran las identidades de restos, si procede. Se usan huecos (-) para mantener la numeración de Kabat, y para mostrar inserción o delección de restos, si

procede.

Tabla 18

	Restos de proximidad 5 Å
AB_VKc (mAB001VK)	EIVLTQTCWFTLIYGVFSGSGSGQDFFYCFG
AY247656YL.....T..T....

- 5 La Tabla 18 muestra los restos de la región estructural de la cadena ligera kappa del anticuerpo AB1 que se encuentran dentro de una envoltura 5 Å de las CDR. Se muestran las identidades de restos por un símbolo de punto (.). Se muestran las identidades de restos, si procede.

Tabla 19

		10	20	30	40	50	60	70	80	90	
X93620.seq	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQASQDISNYLNWYQKPKGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFLFTISSLPEDIATYYCQYDNLPP										
AY247656.seq	E.VL.....<----->.....<----->.....FG.....NTY.L										5

- 10 La Tabla 19 muestra que AY247656 tiene 5 mutaciones somáticas lejos del gen VK de la línea germinal X93620. Se muestran las identidades de restos por un símbolo de punto (.). Se muestran las identidades de restos, si procede.

Tabla 20

Números de Kabat ²	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	
Vernier ⁴	-	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	A
Canónicos ⁵	-	1	A
Interfase ⁶	-	1	A
Proximidad 5 Å	*****											
CDR												
AB_VKc1 (mAB002VK)	-DIQMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQ-----DINSYLTWFQKPGKSPKTLIYRTNRLFDGVPSPRFSGSGSGQDFFLTISSEYEDMGLIYCLQYDDFF-----YTFGGGKLEI-K											
AB1_VKc2 (mAB003VK)	-DIQMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQ-----DINSYLTWFQKPGKSPKTLIYRTNRLFDGVPSPRFSGSGSGQDFFLTISSEYEDMGLIYCLQYDDFF-----YTFGGGKLEI-K											
BB7_VKc (mBB001VK)	-AIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQ-----DINSYLTWFQKPGKSPKTLIYRTNRLFDGVPSPRFSGSGSGQDFFLTISSEYEDMGLIYCLQYDDFF-----YTFGGGKLEI-K											
DC1_VKc (mDC001VK)	-DITMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQ-----DINSYLTWFQKPGKSPKTLIYRTNRLFDGVPSPRFSGSGSGQDFFLTISSEYEDMGLIYCLQYDDFF-----YTFGGGKLEI-K											
AF193851	...M.....LS..V.D.....R....G.RN..A.....A..S...AASN.QS.....T..T.....QP..FAT...Q.HNTY.....W...Q...V...-											

- 15 La Tabla 20 muestra el alineamiento y la identidad de restos de AF193851 para los anticuerpos murinos. Se muestran las identidades de restos por un símbolo de punto (.). Se muestran las identidades de restos, si procede. Se usan huecos (-) para mantener la numeración de Kabat, y para mostrar inserción o delección de restos, si procede.

20

Tabla 21

	Restos de proximidad 5 Å
AB_VKc1 (mAB002VK)	DIQMTQTCWFTLIYGVFSGSGSGQDFFYCFG
AB1_VKc2 (mAB003VK)	DIQKTQTCWFTLIYGVFSGSGSGQDFFYCFG
BB7_VKc (mBB001VK)	AIKMTQTCWFTLIYGVFSGSGSGQEFLYCFG
DC1_VKc (mDC001VK)	DITMTQTCWFILYGVFSGSGSGQDYAYCFG
AF193851	...M.....5.....T..T....

- 25 La Tabla 21 muestra los restos de la región estructural de la cadena ligera kappa de anticuerpos que se encuentran dentro de una envoltura 5 Å de las CDR. Se muestran las identidades de restos por un símbolo de punto (.). Se muestran las identidades de restos, si procede.

Tabla 22

		10	20	30	40	50	60	70	80	90	
J00248.seq	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNYLAWFQKPKGKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLFTISSLPEDFATYYCQYNSYPP										
AF193851.seqR.....N.....H.T..W										0

- 30 La Tabla 22 muestra que AF193851 no tiene mutación somática lejos del gen VK de la línea germinal J00248. Se muestran las identidades de restos por un símbolo de punto (.). Se muestran las identidades de restos, si procede.

Tabla 23

Números de Kabat	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
Vernier ⁴	-	*
Canónicos ⁵	-
Interfase ⁶	-
Proximidad 5 Å	****											
CDR												
AB_RHA (hAB001HA)	-EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSAMS--WVRQAPGKGLWVSTISV--GGKTYYPDSVGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLI-----SLYWGQGTITVTVSS											
BB7_RHA (hBB001HA)	-EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSAMS--WVRQAPGKGLWVSTISV--GGKTYYPDSVGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLI-----SPYWGQGTITVTVSS											
BB7_RHB (hBB001HB)	-EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSAMS--WVRQAPGKGLWVSTISV--GGKTYYPDSVGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLI-----SPYWGQGTITVTVSS											
DC1_RHA (hDC001HA)	-EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSAMS--WVRQAPGKGLWVSTISV--GGKTYYPDSVGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLI-----STYWGQGTITVTVSS											
DC1_RHB (hDC001HB)	-EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSAMS--WVRQAPGKGLWVSTISV--GGKTYYPDSVGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLI-----STYWGQGTITVTVSS											

La Tabla 23 muestra los alineamientos de secuencias de las versiones humanizadas finales de las cadenas pesadas de AB1, BB7 y DC1. Se usan huecos (-) para mantener la numeración de Kabat, y para mostrar inserción o delección de restos, si procede.

TABLA 24

Números de Kabat	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	A
Vernier ⁴	-
Canónicos ⁵	-
Interfase ⁶	-
Proximidad 5 Å	*****											
CDR												
AB_RKE (hAB001KE)	-EIVLTQSPSSLSASVGRVITICKASQ-----DINSYLTWYQKPGKAPKLLIYRTNRLFDGVPSPRFSFGSGSGTDFFFTISLQPEDFGTYICLYDQDFP-----YTFGGGTGLEI-K											
AB_RKJ (hAB001KJ)	-DIQMTQSPSSLSASVGRVITICKASQ-----DINSYLTWYQKPGKAPKSLIYRTNRLFDGVPSPRFSFGSGSGTDFFLTISLQPEDFATYYCLQYDDFP-----YTFGGGTGLEI-K											
BB7_RKA (hBB001KA)	-DIQMTQSPSSLSASVGRVITICKASQ-----DINSYLTWYQKPGKAPKSLIYRTNRLMDGVPSPRFSFGSGSGTDFFLTISLQPEDFATYYCLQYDDFP-----YTFGGGTGLEI-K											
BB7_RKB (hBB001KB)	-DIQMTQSPSSLSASVGRVITICKASQ-----DINSYLTWYQKPGKAPKLLIYRTNRLMDGVPSPRFSFGSGSGTDFFLTISLQPEDFATYYCLQYDDFP-----YTFGGGTGLEI-K											
DC1_RKA (hDC001KA)	-DIQMTQSPSSLSASVGRVITICKASQ-----DINSYLTWYQKPGKAPKSLIYRTNRLMDGVPSPRFSFGSGSGTDFFLTISLQPEDFATYYCLQYDDFP-----YTFGGGTGLEI-K											
DC1_RKB (hDC001KB)	-DIQMTQSPSSLSASVGRVITICKASQ-----DINSYLTWYQKPGKAPKLLIYRTNRLMDGVPSPRFSFGSGSGTDFFLTISLQPEDFATYYCLQYDDFP-----YTFGGGTGLEI-K											

La Tabla 24 muestra los alineamientos de secuencias de las versiones humanizadas finales de las cadenas ligeras kappa de AB1, BB7 y DC1. Se usan huecos (-) para mantener la numeración de Kabat, y para mostrar inserción o delección de restos, si procede.

TABLA 24A

La Tabla 24a resume la información de secuencias presentadas en las Tablas 23 y 24, mostrando en particular la secuencia de las CDR, y las CDR con regiones flanqueantes, en las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos AB, BB-7 y DC-1.

Cadena pesada - CDR1		
AB	CAASGFTFSSSAMS	WVR o FTFSSSAMS
BB7 RHB	CAASGFTFSSSAMS	WVR o FTFSSSAMS
BB7 RHA	CAASGIIFSSSAMS	WVR o IIFSSSAMS
DC1 RHA	CAASGFTFSTHAMS	WVR o FTFSTHAMS
DC1 RHB	CAASGFTLSTHAMS	WVR o FTLSTHAMS
Cadena pesada - CDR2		
AB	WVSTISVGGGKTYYPDSVKG	RFTISRDNKNTL o WVSTISVGGGKTYYPDSVKG
BB7 RHB	WVSTISVGGGKTYYPDSVKG	RFTISRDNKNTL o WVSTISVGGGKTYYPDSVKG
BB7 RHA	WVSTISVGGGKTYYPDSVKG	RFTISRDNKNTL o WVSTISVGGGKTYYPDSVKG
DC1 RHA	WVSTISVGGGKTYYPDSVKG	RFTISRDNKNTL o WVSTISVGGGKTYYPDSVKG
DC1 RHB	WVSTISVGGGKTYYPDSVKG	RFTISRDNKNTL o WVSTISVGGGKTYYPDSVKG
Cadena pesada - CDR3		
AB	YCAKLISLYWG	o LISLY.
BB7 RHB	YCAKLISPYWG	o LISPY.
BB7 RHA	YCAKLISPYWG	o LISPY.
DC1 RHA	YCAKLISLYWG	o LISLY.
DC1 RHB	FCARLISTYWG	o LISTY.
Cadena ligera - CDR1		

(continuación)

AB RKE	TCKASQDINSYLTWY	o KASQDINSYLT.
AB RKJ	TCKASQDINSYLTWF	o KASQDINSYLT.
BB7 RKB	TCKASQDINSYLTWF	o KASQDINSYLT.
BB7 RKA	TCKASQDINSYLTWF	o KASQDINSYLT.
DC1 RKA	TCKASQDINSYLTWF	o KASQDINSYLT.
DC1 RKB	TCKASQDINSYLTWF	o KASQDINSYLT.
<u>Cadena ligera - CDR2</u>		
AB RKE	LLIYRTNRLFDGVP SRFSGSGSGTDFF	o LLIYRTNRLFDGVP o RTNRLFD
AB RKJ	SLIYRTNRLFDGVP SRFSGSGSGTDFF	o SLIYRTNRLFDGVP o RTNRLFD
BB7 RKB	SLIYLTNRLMDGVPSRFSGSGSGTDFF	o SLIYLTNRLMDGVPSRFSGSGSGTDFF
BB7 RKA	TLIYLTNRLMDGVPSRFSGSGSGQEFL	o TLIYLTNRLMDGVPSRFSGSGSGQEFL
DC1 RKA	SLIYLVNRLVDGVPSRFSGSGSGTDFF	o SLIYLVNRLVDGVPSRFSGSGSGTDFF
DC1 RKB	ILIYLVNRLVDGVPSRFSGSGSGQDYA	o ILIYLVNRLVDGVPSRFSGSGSGQDYA
<u>Cadena ligera - CDR3</u>		
AB RKE	YCLQYDDFPYTFG	o LQYDDFPYT.
AB RKJ	YCLQYDDFPYTFG	o LQYDDFPYT.
BB7 RKB	YCLQYVDFPYTFG	o LQYVDFPYT.
BB7 RKA	YCLQYVDFPYTFG	o LQYVDFPYT.
DC1 RKA	YCLQYDDFPYTFG	o LQYDDFPYT.
DC1 RKB	YCLQYDDFPYTFG	o LQYDDFPYT.

Caracterización de anticuerpos quiméricos y humanizados

- 5 Se ensayaron Abs (forma abreviada de *Antibodies*: anticuerpos) quiméricos y humanizados para unirse a TG2 humana y de mono cinomolgo y para la inhibición enzimática de estas enzimas según la metodología descrita a continuación.

MÉTODOS

10

Ensayo de ELISA para la unión de TG2

Se determinó la unión de anticuerpo a TG2 humana y de mono cinomolgo en un ensayo de ELISA. Se recubrieron placas de 96 pocillos (Nunc) "Maxisorp" de poliestireno transparente con 50 ng de TG2 humana o de mono cinomolgo purificado en 50 µl de tampón carbonato-bicarbonato 0,05 M a pH 9,6 a 4 °C durante la noche. Se recubrieron pocillos de control con 50 µl de 100 µg/ml de albúmina de suero bovino (BSA). Las placas se lavaron 3x con 300 µl de solución salina tamponada con fosfato a pH 7,4 (PBS) que contenía 0,1 % de Tween 20 (PBST) y se bloquearon con 300 µl de 3 % p/v de leche desnatada Marvel en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar 3x con PBST, 50 µl de anticuerpos anti-TG2 quiméricos o humanizados purificados en proteína-A o anticuerpo de control de isotopo kappa IgG1 humana o CUB7402 (Abcam) se diluyeron sucesivamente 4 veces desde una concentración superior a 50 nM en PBS, y se añadieron a la placa por duplicado. Después de 1 hora a temperatura ambiente, las placas se lavaron 3x en PBST y se incubaron con 50 µl de anti-IgG humana de cabra conjugada con peroxidasa (Fc) (Serotec) diluida 1/5.000 en 3 % p/v de leche desnatada Marvel en PBS o para pocillos que contenían anti-IgG de ratón de cabra conjugada con peroxidasa CUB7402 1/5.000 (Fc) (Sigma) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar 3x con PBST, las placas se desarrollaron con 50 µl de sustrato TMB (Sigma) durante 5 min a temperatura ambiente antes de parar la reacción con 25 µl de H₂SO₄ 0,5 M y leer la absorbancia a 450 nm en un lector de placas de microtitulación (BioTek EL808). Se analizaron las curvas de respuesta a dosis y se determinaron valores de CE50 y otros parámetros estadísticos usando un ajuste logístico de 4 parámetros de los datos (GraphPad Prism).

30

Ensayo de transglutaminasa basado en fluorescencia de la inhibición de TG2 por anticuerpos de la invención.

Se midieron las actividades de transglutaminasa de enzimas TG2 humanas (Zedira) o de mono cinomolgo (Trenzyme) purificadas por incorporación de lisina dansilada KxD (Zedira) en caseína *N,N*-dimetilada (DMC, Sigma). Se diluyeron TG2 humana o de mono cinomolgo en tampón de transamidación (HEPES 25 mM a pH 7,4 que contenía NaCl 250 mM, MgCl₂ 2 mM, CaCl₂ 5 mM, DTT 0,2 mM y 0,05 % v/v de Pluronic F-127) a 1 nM y 10 nM, respectivamente, y se mezclaron con diversas concentraciones de anticuerpos de TG2 murinos, quiméricos o humanizados purificados en proteína A durante 180 min a temperatura ambiente en placas de microtitulación negras de 384 pocillos (Corning). Las reacciones se iniciaron mediante la adición de DMC y KxD a una concentración final de 10 µM y 20 µM, respectivamente, y un volumen de reacción final de 30 µl, y se dejó que avanzaran a TA durante 180 min y se monitorizó el aumento en fluorescencia (URF) (excitación a 280 nm, emisión 550 nm) usando un lector de placas Tecan Safire². Los datos se normalizaron al porcentaje de actividad donde % de actividad=(URF de anticuerpo de prueba – URF de controles bajos)/ URF de controles altos - URF de controles bajos) x 100, donde los

40

controles bajos contuvieron todos los componentes, excepto enzima, y los controles altos contuvieron todos los componentes, excepto anticuerpo.

Se representaron las curvas de respuesta a dosis de anticuerpo usando el software GraphPad prism y se ajustaron usando un modelo logístico de 4 parámetros para devolver CI50 y otros parámetros estadísticos. Los resultados se ilustran en las Figuras 29 a 33.

Resultados y discusión de la inhibición enzimática y experimentos de unión de ELISA por anticuerpos anti-TG2 humanizados y murinos

Se determinó la capacidad de anticuerpos de TG2 quiméricos y humanizados para inhibir la transamidación por TG2 humana por inhibición dependiente de la dosis de la incorporación dependiente de TG2 de lisina dansilada en caseína *N,N*-dimetilada (ejemplificado en las Figuras 29 y 31). Tanto los anticuerpos quiméricos como humanizados del Grupo 1 (por ejemplo, cAB003, cBB001, cDC001, hBB001AA, hAB001BB, hAB005 y hAB004) muestran potente inhibición de la actividad de TG2 en el intervalo nanomolar bajo, de acuerdo con datos de ELISA que muestran la unión a TG2 humana inmovilizada en el mismo intervalo (Figuras 35 y 37). A diferencia, el anticuerpo comercial CUB7402 dejó de inhibir actividades enzimáticas de TG2 humana o de mono cinomolgo (Figuras 29F y 30B), a pesar de la unión comparable a anticuerpos del Grupo 1 en los ensayos de ELISA (Figuras 35A, 36A, 37A y 38A) de acuerdo con el reconocimiento por CUB7402 de un epítipo que no interfería con la función de transamidación de la enzima. Por tanto, los anticuerpos del Grupo 1 se pueden distinguir por su capacidad para inhibir la función enzimática de otros anticuerpos tales como CUB7402, que se unen, pero no tienen efecto sobre la actividad enzimática. Similarmente, anticuerpos murinos y quiméricos representativos del Grupo 3 (por ejemplo, mDD9001, mDH001, cDD9001 y cDH001) inhibieron coherentemente la transamidación de TG2 humana, pero con menor potencia que los anticuerpos del Grupo 1 (Figuras 29 y 33). La inhibición de TG2 humana por los anticuerpos monoclonales murinos parentales ejemplificados del Grupo 1 y Grupo 3 (Figura 33) muestran potencias comparables a sus versiones quiméricas y humanizadas, que indica que la potencia funcional de los anticuerpos murinos ha sido retenida en las versiones humanizadas. Similarmente, los datos de unión de ELISA de TG2 humana para los anticuerpos humanizados ejemplificados hBB001AA, hBB001BB y hAB004 (Figura 37) muestran valores de CE50 comparables con los obtenidos para las versiones quiméricas cBB001 y cAB003, que indica que también se ha preservado la afinidad de unión en las versiones humanizadas. Los anticuerpos quiméricos y humanizados también demuestran potente inhibición de TG2 de mono cinomolgo (Figuras 30 y 32) y CE50 de ELISA comparables (Figuras 36 y 38) a través de las especies, de acuerdo con la conservación del epítipo relacionado en TG2 de mono cinomolgo, que tiene en total 99 % de identidad de secuencia. A diferencia, CUB7402 muestra unión comparable a TG2 de ambas especies como los anticuerpos del Grupo 1, pero no inhibe ninguna actividad enzimática (Figuras 35-38 y 29-30).

Ensayos basados en células

Se ensayó la unión de anticuerpos de la invención a TG2 extracelular de células epiteliales HK-2 usando el siguiente protocolo.

Medición de la actividad de TG extracelular

Se midió la actividad de TG extracelular por ELISA de células modificado. Se recogieron células epiteliales HK-2 usando Accutase y se sembraron a una densidad de 2×10^4 células/pocillo en medio libre de suero sobre una placa de 96 pocillos que se había recubierto durante la noche con 100 μ l/pocillo de fibronectina (5 μ g/ml en Tris-HCl 50 mM a pH 7,4) (Sigma, Pool RU). Se dejó que las células se unieran durante la noche a 37 °C. El medio se sustituyó con DMEM (Life Technologies) y se añadieron compuestos, anticuerpos o controles y se dejó que se unieran a 37 °C. Se añadió biotina cadaverina 0,1 mM [ácido N-(5 aminopentilbiotinamida)trifluoroacético] (Zedira) a los pocillos y la placa se giró a 37 °C durante 2 horas. Las placas se lavaron dos veces con EDTA/PBS 3 mM y las células se retiraron con 0,1 % (p/v) de desoxicolato en EDTA/PBS 5 mM. Se recogió el sobrenadante y se usó para la determinación de proteína. Se lavaron las placas con PBS/Tween y se incorporó biotina cadaverina revelada usando 1:5000 de extravidina HRP (Sigma, Pool, RU) durante 1 h a temperatura ambiente seguido por sustrato K Blue (SkyBio). La reacción se detuvo con Red Stop (SkyBio) y la lectura de absorbancia a 4 650 nm. Cada anticuerpo se probó en al menos tres ocasiones separadas.

Los resultados se proporcionan en las Figuras 39 y 40 y muestran una curva ejemplar y tabla de valores de CI50 obtenida para los anticuerpos probados. La Figura 39 muestra los resultados con AB1 humanizado y la Figura 40 muestra los resultados con BB7 humanizado.

hAB005 inhibió TG2 extracelular de las células HK2 con una CI50 de 71,85 nM y una inhibición máxima de aproximadamente 30 % de actividad de control. hBB001AA inhibió la actividad con una CI50 de 19,8 nM y una inhibición máxima de 40 % de actividad de control. hBB001BB tuvo una CI50 menor de 4,9 nM, pero una inhibición máxima de aproximadamente 55 % de control.

Ensayos de rascado

También se realizaron ensayos de herida por rascado para evaluar la actividad de unión de anticuerpos anti-TG2 humanizados y/o quiméricos de la invención.

- 5 Se ha mostrado que TG2 tiene una función importante en la fibrosis pulmonar y los ratones inactivados en TG2 muestran cicatrización reducida y fibrosis en el modelo de bleomicina (Keith C. Olsen, Ramil E. Sapinoro, R. M. Kottmann, Ajit A. Kulkarni, Siiri E. Iismaa, Gail V. W. Johnson, Thomas H. Thatcher, Richard P. Phipps, y Patricia J. Sime. (2011) Transglutaminase 2 and Its Role in Pulmonary Fibrosis. Am. J of Respiratory & Critical Care Med. 184 0699-707). Se redujo la migración de células de ratones inactivados en TG2 en heridas en comparación con el tipo
- 10 no mutado. Se realizaron ensayos de herida por rascado para evaluar el efecto de anticuerpos anti-TG2 humanizados y/o quiméricos de la invención sobre la velocidad de cierre de la herida en una capa de fibroblastos de pulmón normal (células WI-38).

Protocolo del ensayo de rascado:

- 15 Se sembraron células WI-38 (fibroblastos de pulmón humano normal ATCC, Cat N° CCL-75) en una placa de 96 pocillos Imagen Lock (Essen, Cat N° 4379) a 2×10^4 /pocillo en medio α MEM (Life Technologies, Cat N° 32561) con 10 % de FBS y se cultivaron durante la noche hasta >97 % de confluencia. Las células se lavaron 2X con medio α MEM sin suero y se generó una herida por rascado usando un generador de heridas Essen y el protocolo de los
- 20 fabricantes. Se retiró el medio y se sustituyó con 95 μ l/pocillo de medio libre de suero. Se añadieron controles y anticuerpos de prueba a los pocillos. La placa se colocó en un Essen Incucyte y se analizó el cierre de la herida usando el protocolo de heridas por rascado.

- 25 Se usó citocalasina D como control de ensayo a 0,1 μ M. Se probó R281, un inhibidor de transglutaminasa no específico de molécula pequeña, a 100 μ M. Se probó ZDON, un inhibidor de transglutaminasa no reversible de péptido, a 10 μ M y 100 μ M. Se probó el anticuerpo de TG2 comercialmente disponible Cub7402 (Abcam, Cat N° ab2386) a 5 μ g/ml. Se probaron los anticuerpos de la invención en al menos tres ocasiones a diversas concentraciones como se indica. En todos los experimentos, los controles fueron citocalasina D a 0,1 μ M y ZDON a dos concentraciones para mostrar un efecto dependiente de la dosis.

- 30 Se muestran resultados ejemplares de los ensayos de rascado en las Figuras 41 a 44. Como se puede apreciar en la Figura 41, la citocalasina D, R281 y ZDON inhibieron todo el cierre de heridas (se mostró que ZDON inhibió de una manera dependiente de la dosis), pero el anticuerpo Cub7402 no inhibió el cierre de heridas. BB7 humanizado, AB1 humanizado y DC1 quimérico inhibieron todos los cierres de heridas.

Afinidades de Abs anti-TG2 quiméricos y humanizados

- 35 Se evaluaron las afinidades de unión (K_d y constantes de disociación) para un panel de Abs quiméricos y humanizados de la invención contra TG2 humana y TG2 de cinomolgo usando técnicas Biacore. Los protocolos y resultados se describen a continuación y se muestran en las Figuras 45 a 47.

Métodos de Biacore

- 45 Se obtuvo TG2 humana recombinante de Zedira GmbH (Cat N°: T002). Se obtuvo TG2 de mono cinomolgo recombinante de Trenzyme. Se midió la resonancia de plasmones superficiales (SPR) en un instrumento Biacore T200 (GE Healthcare). Se recubrieron chips CM5 (GE Healthcare, Cat N°: BR-1006-68) con anticuerpo anti-IgG1 humana de ratón monoclonal (Fc) (MAH) (GE Healthcare, Cat N°: BR-1008-39) por acoplamiento con amina como se describe en las instrucciones del fabricante. Se compraron tampón HBS-EP+ (HEPES 0,01 M, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, 0,05 % v/v de Tensioactivo P20) y tampón HBS-P+ (HEPES 0,01 M, NaCl 0,15 M, 0,05 % de Tensioactivo P20) de GE Healthcare como disoluciones madre 10x (Cat. N°: BR-1006-69 y BR-1006-71). Se obtuvo solución de cloruro de calcio de Sigma Aldrich (Cat N°: 21115).

- 55 El método empleado para determinar la afinidad de los anticuerpos anti-TG2 implicó la captura de los anticuerpos quiméricos o humanizados sobre un chip CM5 recubierto de MAH, seguido por la inyección de una serie de muestras de TG2 en tampón de electroforesis. El tampón de electroforesis fue 1x HBS-P+ que contenía CaCl_2 1 mM, o 1x HBS-EP+ para experimentos libres de calcio. La captura de anticuerpos se llevó a cabo durante un tiempo de contacto de 120 segundos a un caudal de 10 μ l/min dando como resultado la captura de aproximadamente 40-80 UR. Se inyectó TG2 sobre el anticuerpo inmovilizado a concentraciones que variaban desde 25 nM hasta 400 nM con un tiempo de contacto de hasta 600 segundos a un caudal de 30 μ l/min. La disociación de TG2 se midió
- 60 normalmente durante hasta 5400 segundos (1,5 horas). La regeneración del chip se realizó entonces usando MgCl_2 3 M, durante un tiempo de contacto de 60 segundos a un caudal de 30 μ l/ml, seguido por un periodo de estabilización de 300 s antes de la siguiente muestra. Para cada TG2 humana y de mono cinomolgo, se realizaron al menos 5 inyecciones a una variedad de concentraciones en al menos dos experimentos separados.

- 65 Se exportaron los datos cinéticos del software de evaluación Biacore T200 y se analizaron usando GraphPad Prism, donde las fases de asociación y las fases de disociación se analizaron por separado usando un modelo de

asociación de una fase y modelo de desintegración exponencial de una fase, respectivamente. Se calcularon las constantes de asociación (k_{as}) para cada curva individualmente, y los valores de las velocidades de disociación (k_{dis}) a partir de los datos de la fase de disociación larga recogidos. Si se calculó que los valores de k_{dis} eran $< 1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, los valores se establecieron a 1×10^{-5} para el análisis, ya que velocidades más lentas que estas no podían ser estimadas con exactitud. Los valores para k_{as} y k_{dis} se presentan en las Tablas a continuación como las medias de los valores calculados individuales para cada anticuerpo para cada especie de TG2 a partir de múltiples concentraciones ± 1 desviación estándar. Los valores de K_D se calculan como k_{dis} media / k_{as} media.

Resultados de experimentos Biacore

Tabla 25

Anticuerpo		TG2 humana				
		$k_{dis} (\text{s}^{-1})$	desv. est.	$K_{as} (\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$	desv. est.	$K_D (\text{M})$
cAB003	+ Ca^{2+}	$< 10^{-5}$	-	$1,7 \times 10^5$	$3,2 \times 10^4$	$< 6 \times 10^{-11}$
	- Ca^{2+}	$< 10^{-5}$	-	$8,6 \times 10^4$	$2,1 \times 10^4$	$< 1 \times 10^{-10}$
cBB001	+ Ca^{2+}	$< 10^{-5}$	-	$2,1 \times 10^5$	$6,9 \times 10^4$	$< 5 \times 10^{-11}$
	- Ca^{2+}	$< 10^{-5}$	-	$1,5 \times 10^5$	$1,8 \times 10^4$	$< 7 \times 10^{-11}$
hAB004 (hAB001AE)		$2,4 \times 10^{-5}$	$1,0 \times 10^{-5}$	$2,0 \times 10^5$	$1,4 \times 10^5$	$1,2 \times 10^{-10}$
hAB005 (hA B001AJ)		$< 10^{-5}$	-	$1,9 \times 10^5$	$6,8 \times 10^4$	$< 5 \times 10^{-11}$
hBB001AA		$< 10^{-5}$	-	$2,7 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$	$< 4 \times 10^{-11}$
hBB001BB		$< 10^{-5}$	-	$2,4 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$	$< 4 \times 10^{-11}$
cDC001		$< 10^{-5}$	-	$3,2 \times 10^5$	$5,7 \times 10^4$	$< 3 \times 10^{-11}$
cDH001	+ Ca^{2+}	$1,8 \times 10^{-5}$	$4,9 \times 10^{-6}$	$2,8 \times 10^4$	$1,3 \times 10^4$	$6,4 \times 10^{-10}$
	- Ca^{2+}	$4,9 \times 10^{-4}$	$1,6 \times 10^{-5}$	$2,1 \times 10^4$	$1,2 \times 10^4$	$2,3 \times 10^{-8}$
cDD9001	+ Ca^{2+}	$1,3 \times 10^{-5}$	$1,8 \times 10^{-6}$	$3,0 \times 10^4$	$2,3 \times 10^4$	$4,3 \times 10^{-10}$
	- Ca^{2+}	$7,1 \times 10^{-5}$	$1,6 \times 10^{-5}$	$2,3 \times 10^4$	$7,6 \times 10^3$	$3,1 \times 10^{-9}$

La Tabla 25 muestra los datos cinéticos obtenidos contra TG2 humana. Si se calculó que las velocidades k_{dis} eran inferiores a 10^{-5} s^{-1} , los valores se establecieron a 10^{-5} s^{-1} para el análisis, ya que velocidades más lentas que estas no podían ser estimadas con exactitud.

Tabla 26

Anticuerpo		TG2 de cinomolgo				
		$k_{dis} (\text{s}^{-1})$	desv. est.	$K_{as} (\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$	desv. est.	$K_D (\text{M})$
cAB003	+ Ca^{2+}	$1,2 \times 10^{-5}$	$8,1 \times 10^{-6}$	$2,4 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$	$5,0 \times 10^{-11}$
	- Ca^{2+}	$1,3 \times 10^{-5}$	$1,5 \times 10^{-6}$	$1,4 \times 10^5$	$1,9 \times 10^4$	$9,3 \times 10^{-11}$
cBB001	+ Ca^{2+}	$< 10^{-5}$	-	$2,9 \times 10^5$	$9,0 \times 10^4$	$< 3 \times 10^{-11}$
	- Ca^{2+}	$< 10^{-5}$	-	$1,9 \times 10^5$	$2,1 \times 10^4$	$< 5 \times 10^{-11}$
hAB004 (hAB001AE)		$1,8 \times 10^{-5}$	$2,3 \times 10^{-6}$	$1,6 \times 10^5$	$7,3 \times 10^4$	$1,1 \times 10^{-11}$
hAB005 (hAB 001AJ)		$3,4 \times 10^{-5}$	$4,6 \times 10^{-6}$	$1,4 \times 10^5$	$4,1 \times 10^4$	$2,4 \times 10^{-10}$
hBB001AA		$< 10^{-5}$	-	$3,0 \times 10^5$	$1,4 \times 10^5$	$< 3 \times 10^{-11}$
hBB001BB		$3,7 \times 10^{-5}$	$3,4 \times 10^{-6}$	$2,7 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5$	$1,4 \times 10^{-10}$
cDC001		$< 10^{-5}$	-	$4,2 \times 10^5$	$3,3 \times 10^5$	$2,4 \times 10^{-11}$
cDH001	+ Ca^{2+}	$< 10^{-5}$	-	$1,5 \times 10^4$	$9,5 \times 10^3$	$< 7 \times 10^{-10}$
	- Ca^{2+}	$6,3 \times 10^{-5}$	$1,2 \times 10^{-5}$	$2,6 \times 10^4$	$1,0 \times 10^4$	$2,4 \times 10^{-9}$
cDD9001	+ Ca^{2+}	$1,6 \times 10^{-5}$	$1,4 \times 10^{-5}$	$3,1 \times 10^4$	$1,6 \times 10^4$	$5,2 \times 10^{-10}$
	- Ca^{2+}	$4,1 \times 10^{-5}$	$1,6 \times 10^{-5}$	$4,6 \times 10^4$	$1,3 \times 10^4$	$8,9 \times 10^{-10}$

La Tabla 26 muestra los datos cinéticos obtenidos contra TG2 de cinomolgo. Si se calculó que las velocidades k_{dis} eran inferiores a 10^{-5} s^{-1} , los valores se establecieron a 10^{-5} s^{-1} para el análisis, ya que velocidades más lentas que estas no podían ser estimadas con exactitud.

Las Figuras 45 a 47 proporcionan conjuntos de datos de Biacore de ejemplo. Como se puede apreciar, los anticuerpos humanizados y quiméricos cAB003, cBB001, hAB004, hAB005, hBB001AA, hBB001BB, cDC001 para TG2 tienen excelente afinidad por TG2 humana y de cinomolgo, con valores K_D de 120 pM o mejores. Los anticuerpos quiméricos cDH001 y cDD9001 presentan velocidades de disociación más lentas para TG2 humana y de cinomolgo y afinidad total más débil. El examen de una selección de anticuerpos en ausencia de calcio muestra que existe poco o ningún efecto, excepto en el caso de cDH001 y cDD9001, donde la unión es más débil debido a velocidades de disociación (k_{dis}) más rápidas.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Medical Research Council Technology

<120> Compuestos

<130> MEDBX/P53198PC

5 <140> PCT/GB2013/051373
<141> 24-05-2013

<150> GB1209096.5
<151> 24-05-2012

10 <160> 296

<170> BiSSAP 1.2

15 <210> 1
<211> 2064
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

20 <220>
<221> fuente
<222> 1..2064
<223> /mol_type="ADN no asignado" /nota="secuencia de nucleótidos de TG2 de ser humano"
/organismo="*Homo sapiens*"

25 <400> 1

atggccgagg agctggtctt agagaggtgt gatctggagc tggagaccaa tggccgagac 60

caccacacgg ccgacctgtg ccgggagaag ctggtggtgc gacggggcca gcccttctgg 120

ctgaccctgc actttgaggg ccgcaactac gaggccagtg tagacagtct caccttcagt 180

gtcgtgaccg gccagcccc tagccaggag gccgggacca aggcccgttt tccactaaga 240

gatgctgtgg aggagggtga ctggacagcc accgtggtgg accagcaaga ctgcaccctc 300

tcgctgcagc tcaccacccc ggccaacgcc cccatcggcc tgtatcgcc cagcctggag 360

gcctccactg gctaccaggg atccagcttt gtgctgggcc acttcatttt gctcttcaac 420

gcctggtgcc cagcggatgc tgtgtacctg gactcggaag aggagcggca ggagtatgtc 480

ctcaccacgc agggctttat ctaccagggc tcggccaagt tcatcaagaa cataccttgg 540

aattttgggc agtttgaaga tgggatccta gacatctgcc tgatccttct agatgtcaac 600

cccaagttcc tgaagaacgc cggccgtgac tgctcccgcc gcagcagccc cgtctacgtg 660

ggccgggtgg tgagtggcat ggtcaactgc aacgatgacc aggggtgtgct gctgggacgc 720

tgggacaaca actacgggga cggcgtcagc cccatgtcct ggatcggcag cgtggacatc 780

ctgcggcgct ggaagaacca cggctgccag cgcgtcaagt atggccagtg ctgggtcttc 840

gccgccgtgg cctgcacagt gctgaggtgc ctgggcatcc ctaccgcgt cgtgaccaac 900

tacaactcgg cccatgacca gaacagcaac cttctcatcg agtacttcgg caatgagttt 960

```

ggggagatcc aggggtgacaa gagcgagatg atctggaact tccactgctg ggtggagtcg      1020
tggatgacca ggccggacct gcagccgggg tacgaggget ggcaggccct ggacccaacg      1080
ccccaggaga agagcgaagg gacgtactgc tgtggcccag ttccagttcg tgccatcaag      1140
gagggcgacc tgagcaccaa gtacgatgcg ccctttgtct ttgaggaggt caatgccgac      1200
gtggtagact ggatccagca ggacgatggg tctgtgcaca aatccatcaa ccgttccctg      1260
atcgttgggc tgaagatcag cactaagagc gtgggcccag acgagcggga ggatatcacc      1320
cacacctaca aatacccaga ggggtcctca gaggagaggg aggccttcac aagggcgaac      1380
cacctgaaca aactggccga gaaggaggag acagggatgg ccatgcggat ccgtgtgggc      1440
cagagcatga acatgggcag tgactttgac gtctttgccc acatcaccaa caacaccgt      1500
gaggagtacg tctgccgctt cctgctctgt gcccgaccg tcagctacaa tgggatcttg      1560
gggcccagat gtggcaccaa gtacctgctc aacctcaacc tggagccttt ctctgagaag      1620
agcgttcctc tttgcatcct ctatgagaaa taccgtgact gccttacgga gtccaacctc      1680
atcaaggtgc gggccctcct cgtggagcca gttatcaaca gctacctgct ggctgagagg      1740
gacctctacc tggagaatcc agaaatcaag atccggatcc ttggggagcc caagcagaaa      1800
cgcaagctgg tggctgaggt gtccctgcag aaccgcctcc ctgtggccct ggaaggetgc      1860
accttactg tggagggggc cggcctgact gaggagcaga agacggtgga gatcccagac      1920
cccgtggagg caggggagga agttaaggtg agaatggacc tgctgccgct ccacatgggc      1980
ctccacaagc tgggtggtgaa cttcgagagc gacaagctga aggctgtgaa gggcttccgg      2040
aatgtcatca ttggccccgc ctaa                                             2064

```

<210> 2
 <211> 687
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de TG2 de ser humano
 <400> 2

ES 2 835 383 T3

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

		115					120				125				
Ser	Phe	Val	Leu	Gly	His	Phe	Ile	Leu	Leu	Phe	Asn	Ala	Trp	Cys	Pro
	130					135					140				
Ala	Asp	Ala	Val	Tyr	Leu	Asp	Ser	Glu	Glu	Glu	Arg	Gln	Glu	Tyr	Val
145					150					155					160
Leu	Thr	Gln	Gln	Gly	Phe	Ile	Tyr	Gln	Gly	Ser	Ala	Lys	Phe	Ile	Lys
				165					170					175	
Asn	Ile	Pro	Trp	Asn	Phe	Gly	Gln	Phe	Glu	Asp	Gly	Ile	Leu	Asp	Ile
			180					185					190		
Cys	Leu	Ile	Leu	Leu	Asp	Val	Asn	Pro	Lys	Phe	Leu	Lys	Asn	Ala	Gly
		195					200					205			
Arg	Asp	Cys	Ser	Arg	Arg	Ser	Ser	Pro	Val	Tyr	Val	Gly	Arg	Val	Val
	210					215					220				
Ser	Gly	Met	Val	Asn	Cys	Asn	Asp	Asp	Gln	Gly	Val	Leu	Leu	Gly	Arg
225					230					235					240
Trp	Asp	Asn	Asn	Tyr	Gly	Asp	Gly	Val	Ser	Pro	Met	Ser	Trp	Ile	Gly
				245					250					255	
Ser	Val	Asp	Ile	Leu	Arg	Arg	Trp	Lys	Asn	His	Gly	Cys	Gln	Arg	Val
			260					265					270		
Lys	Tyr	Gly	Gln	Cys	Trp	Val	Phe	Ala	Ala	Val	Ala	Cys	Thr	Val	Leu
		275					280					285			
Arg	Cys	Leu	Gly	Ile	Pro	Thr	Arg	Val	Val	Thr	Asn	Tyr	Asn	Ser	Ala
	290					295					300				
His	Asp	Gln	Asn	Ser	Asn	Leu	Leu	Ile	Glu	Tyr	Phe	Arg	Asn	Glu	Phe
305					310					315					320
Gly	Glu	Ile	Gln	Gly	Asp	Lys	Ser	Glu	Met	Ile	Trp	Asn	Phe	His	Cys
				325					330					335	
Trp	Val	Glu	Ser	Trp	Met	Thr	Arg	Pro	Asp	Leu	Gln	Pro	Gly	Tyr	Glu
			340					345					350		
Gly	Trp	Gln	Ala	Leu	Asp	Pro	Thr	Pro	Gln	Glu	Lys	Ser	Glu	Gly	Thr
		355					360					365			
Tyr	Cys	Cys	Gly	Pro	Val	Pro	Val	Arg	Ala	Ile	Lys	Glu	Gly	Asp	Leu
	370					375					380				
Ser	Thr	Lys	Tyr	Asp	Ala	Pro	Phe	Val	Phe	Ala	Glu	Val	Asn	Ala	Asp
385					390					395					400
Val	Val	Asp	Trp	Ile	Gln	Gln	Asp	Asp	Gly	Ser	Val	His	Lys	Ser	Ile
				405					410					415	
Asn	Arg	Ser	Leu	Ile	Val	Gly	Leu	Lys	Ile	Ser	Thr	Lys	Ser	Val	Gly
			420					425					430		
Arg	Asp	Glu	Arg	Glu	Asp	Ile	Thr	His	Thr	Tyr	Lys	Tyr	Pro	Glu	Gly
		435					440					445			
Ser	Ser	Glu	Glu	Arg	Glu	Ala	Phe	Thr	Arg	Ala	Asn	His	Leu	Asn	Lys
	450					455					460				
Leu	Ala	Glu	Lys	Glu	Glu	Thr	Gly	Met	Ala	Met	Arg	Ile	Arg	Val	Gly
465															

Glu	Gly	Ala	Gly	Leu	Thr	Glu	Glu	Gln	Lys	Thr	Val	Glu	Ile	Pro	Asp
625					630					635					640
Pro	Val	Glu	Ala	Gly	Glu	Glu	Val	Lys	Val	Arg	Met	Asp	Leu	Leu	Pro
				645				650						655	
Leu	His	Met	Gly	Leu	His	Lys	Leu	Val	Val	Asn	Phe	Glu	Ser	Asp	Lys
			660				665						670		
Leu	Lys	Ala	Val	Lys	Gly	Phe	Arg	Asn	Val	Ile	Ile	Gly	Pro	Ala	
		675					680					685			

<210> 3
 <211> 2062
 <212> ADN
 <213> *Rattus*

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..2062
 <223> /mol_type="ADN no asignado" /nota="Secuencia de nucleótidos de TG2 de rata" /organismo="*Rattus*"

<400> 3

```

atggccgagg agctgaacct ggagaggtgc gatttggaga tacaggccaa tggccgtgat      60
caccacacgg ccgacctgtg ccaagagaaa ctggtgctgc ggcgaggcca gcgcttcagg      120
ctgacactgt acttcgaggg ccgtggctat gaggccagcg tggacagact tacatttggg      180
gccgtgaccg gccagatcc cagtgaagag gcagggacca aggcccgctt ctactgtct      240
gacgatgtgg aggagggatc ctggtcagcc tctgtgctgg accaacagga caatgtcctc      300
tcgctgcagc tctgcacccc agccaatgct cctgttggcc agtaccgcct cagcctggag      360
acttctactg gctaccaagg ctccagcttc atgctgggtc acttcatcct gctcttcaat      420
gcctggtgcc cagcgatga cgtgtaccta gattcagagg cggagcgccg ggaatacgtc      480
ctcacacagc agggcttcat ctaccagggc tctgtcaagt tcatcaagag tgtgccttgg      540
aactttgggc agtttgagga tgggatcctg gatgcctgcc tgatgctttt ggatgtgaac      600
cccaagttcc tgaaggaccg tagccgggac tgctcacgac gcagcagtc catctatgtg      660
ggccgcgtgg tgagcggcat ggtcaactgc aatgatgacc aggggtgtgct tctgggtcgc      720
tgggacaaca attatgggga cggtatcagt cccatggcct ggattggcag cgtggacatt      780
ctgcggcgct ggaaggaaca cggtgtcag caagtgaagt atggccagtg ctgggtgttt      840
gcggcggtag cctgcacagt gctgcgggtgc cttggcatcc ctaccagagt ggtgaccaac      900
tacaactccg cccacgacca gaacagcaac ctgctcatcg agtacttccg aaacgagtac      960
ggggagctgg agagcaacaa gagcgagatg atctggaatt tccactgctg ggtggagtcc     1020
tggtatgacca ggccagacct acagccaggc tatgaggggt ggcaggccat tgacccaca     1080
ccgcaggaga agagcgaagg aacatactgt tgtggcccag tctcagtgcg ggccatcaag     1140
gagggtgacc tgagcaccaa gtatgatgcg tccttcgtgt ttgccgaggt caacgctgat     1200
gtgggtggact ggatccggca gtcagatggg tctgtgctca aatccatcaa caattccctg     1260
    
```

```

gtcgtggggc agaagatcag cactaagagc gtggggccgtg atgaccggga ggacatcacc 1320
tataacctaca agtaccacaga ggggtcccca gaggagaggg aagtcttcac cagagccaac 1380
cacctgaaca aactggcaga gaaagaggag acaggggtgg ccatgccgat ccgagtgggg 1440
gatggtatga gcttgggcaa tgactttgac gtgtttgcc acatcggaac cgacacctcg 1500
gagagccgtg agtgccgcct cctgctctgt gccgcactg tcagctacaa cggcgtgctg 1560
gggcccagat gtggcactga ggacatcaac ctgaccctgg atccctactc tgagaacagc 1620
atcccccttc gcacccctca cgagaagtac agcggttgcc tgaccgagtc aaacctcctc 1680
aagggtgcggg gtctcctcgt cgagccagcc gctaacagct acctgctggc tgagagagat 1740
ctctacctgg agaatcctga aatcaagatc cggatcctgg gggagcccaa gcagaacgc 1800
aaactggtgg ctgaggtgtc cctgaagaac ccactttctg attccctgta tgactgtgtc 1860
ttcactgtgg agggggctgg cctgaccaag gaacagaagt ctgtggaggt ctcagacctc 1920
gtgccagcag gagatgcggc caaggtgcgg gttgacctgt tccgactga tattggcctc 1980
cacaagttgg tggatgaact ccagtgtgac aagctgaagt cggatcaagg ttaccggaat 2040
atcatcatcg gcccgcccta ag 2062

```

<210> 4
 <211> 686
 <212> PRT
 <213> *Rattus*

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de TG2 de rata

<400> 4

ES 2 835 383 T3

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

Cys	Leu	Met	Leu	Leu	Asp	Val	Asn	Pro	Lys	Phe	Leu	Lys	Asp	Arg	Ser
		195					200					205			
Arg	Asp	Cys	Ser	Arg	Arg	Ser	Ser	Pro	Ile	Tyr	Val	Gly	Arg	Val	Val
	210					215					220				
Ser	Gly	Met	Val	Asn	Cys	Asn	Asp	Asp	Gln	Gly	Val	Leu	Leu	Gly	Arg
225					230					235					240
Trp	Asp	Asn	Asn	Tyr	Gly	Asp	Gly	Ile	Ser	Pro	Met	Ala	Trp	Ile	Gly
				245					250					255	
Ser	Val	Asp	Ile	Leu	Arg	Arg	Trp	Lys	Glu	His	Gly	Cys	Gln	Gln	Val
			260					265					270		
Lys	Tyr	Gly	Gln	Cys	Trp	Val	Phe	Ala	Ala	Val	Ala	Cys	Thr	Val	Leu
		275					280					285			
Arg	Cys	Leu	Gly	Ile	Pro	Thr	Arg	Val	Val	Thr	Asn	Tyr	Asn	Ser	Ala
	290					295					300				
His	Asp	Gln	Asn	Ser	Asn	Leu	Leu	Ile	Glu	Tyr	Phe	Arg	Asn	Glu	Tyr
305					310					315					320
Gly	Glu	Leu	Glu	Ser	Asn	Lys	Ser	Glu	Met	Ile	Trp	Asn	Phe	His	Cys
				325					330					335	
Trp	Val	Glu	Ser	Trp	Met	Thr	Arg	Pro	Asp	Leu	Gln	Pro	Gly	Tyr	Glu
			340					345					350		
Gly	Trp	Gln	Ala	Ile	Asp	Pro	Thr	Pro	Gln	Glu	Lys	Ser	Glu	Gly	Thr
		355					360					365			
Tyr	Cys	Cys	Gly	Pro	Val	Ser	Val	Arg	Ala	Ile	Lys	Glu	Gly	Asp	Leu
	370					375					380				
Ser	Thr	Lys	Tyr	Asp	Ala	Ser	Phe	Val	Phe	Ala	Glu	Val	Asn	Ala	Asp
385					390				395						400
Val	Val	Asp	Trp	Ile	Arg	Gln	Ser	Asp	Gly	Ser	Val	Leu	Lys	Ser	Ile
			405						410					415	
Asn	Asn	Ser	Leu	Val	Val	Gly	Gln	Lys	Ile	Ser	Thr	Lys	Ser	Val	Gly
			420					425					430		
Arg	Asp	Asp	Arg	Glu	Asp	Ile	Thr	Tyr	Thr	Tyr	Lys	Tyr	Pro	Glu	Gly
		435					440					445			
Ser	Pro	Glu	Glu	Arg	Glu	Val	Phe	Thr	Arg	Ala	Asn	His	Leu	Asn	Lys
	450					455					460				
Leu	Ala	Glu	Lys	Glu	Glu	Thr	Gly	Val	Ala	Met	Arg	Ile	Arg	Val	Gly
465					470					475					480
Asp	Gly	Met	Ser	Leu	Gly	Asn	Asp	Phe	Asp	Val	Phe	Ala	His	Ile	Gly
			485						490					495	
Asn	Asp	Thr	Ser	Glu	Ser	Arg	Glu	Cys	Arg	Leu	Leu	Leu	Cys	Ala	Arg
			500					505					510		
Thr	Val	Ser	Tyr	Asn	Gly	Val	Leu	Gly	Pro	Glu	Cys	Gly	Thr	Glu	Asp
		515					520					525			
Ile	Asn	Leu	Thr	Leu	Asp	Pro	Tyr	Ser	Glu	Asn	Ser	Ile	Pro	Leu	Arg
	530					535					540				
Ile	Leu	Tyr	Glu	Lys	Tyr	Ser	Gly	Cys	Leu	Thr	Glu	Ser	Asn	Leu	Ile
545					550					555					560
Lys	Val	Arg	Gly	Leu	Leu	Val	Glu	Pro	Ala	Ala	Asn	Ser	Tyr	Leu	Leu
			565						570					575	
Ala	Glu	Arg	Asp	Leu	Tyr	Leu	Glu	Asn	Pro	Glu	Ile	Lys	Ile	Arg	Ile
			580					585					590		
Leu	Gly	Glu	Pro	Lys	Gln	Asn	Arg	Lys	Leu	Val	Ala	Glu	Val	Ser	Leu
		595					600					605			
Lys	Asn	Pro	Leu	Ser	Asp	Ser	Leu	Tyr	Asp	Cys	Val	Phe	Thr	Val	Glu
	610					615					620				
Gly	Ala	Gly	Leu	Thr	Lys	Glu	Gln	Lys	Ser	Val	Glu	Val	Ser	Asp	Pro
625					630					635					640
Val	Pro	Ala	Gly	Asp	Ala	Val	Lys	Val	Arg	Val	Asp	Leu	Phe	Pro	Thr
			645						650					655	
Asp	Ile	Gly	Leu	His	Lys	Leu	Val	Val	Asn	Phe	Gln	Cys	Asp	Lys	Leu
			660					665					670		
Lys	Ser	Val	Lys	Gly	Tyr	Arg	Asn	Ile	Ile	Ile	Gly	Pro	Ala		
		675					680					685			

<211> 2061
<212> ADN
<213> *Mus musculus*

5 <220>
<221> fuente
<222> 1..2061
<223> /mol_type="ADN no asignado" /nota="Secuencia de nucleótidos de TG2 de ratón" /organismo="*Mus musculus*"
10
10 <400> 5

```

atggcagagg agctgctcct ggagaggtgt gatttgagaga ttcaggccaa tggccgtgac      60
caccacacgg ccgacctatg ccaagagaaa ctggtgctgc gtcgtggtca gcgcttccgg      120
ctgactctgt acttcgaggg ccgtggctac gaggccagcg tggacagcct cacgttcggt      180
gctgtgaccg gcccgatcc cagtgaagag gcagggacca aggcccgctt ctactgtct      240
gacaatgtgg aggagggatc ttggtcagcc tcagtgtggtg accaacagga caatgtcctc      300
tcgctacagc tctgcacccc agccaatgct cctattggcc tgtaccgtct cagcctagag      360
gcttctactg gctaccaggg ctccagcttt gtgctggggc acttcacctc gctctacaat      420
gcctggtgcc cagccgatga tgtgtacctg gactcagagg aggagcgacg ggaatatgtc      480
cttacgcaac agggcttcat ctaccaaggg tctgtcaagt tcatcaagag tgtgccttgg      540
aactttgggc agttcgagga tggaatcctg gatacctgcc tgatgctctt ggatatgaac      600
cccaagttcc tgaagaaccg tagtcggggc tgctcacgcc gcagcagtc cactctatgtg      660
ggccgcgtgg tgagcgccat ggtcaactgc aatgatgacc aggggtgtgct tctgggccgc      720
tgggacaaca actatgggga tggatatcagt cccatggcct ggattggcag tgtggacatt      780
ctgcggcgct ggaaggaaca cggctgtcag caagtgaagt acgggcagtg ctgggtgttt      840
gcagcgggtg cctgcacagt gctgcgggtg ctcgccatcc ctaccagagt ggtgaccaac      900
tacaactccg ccacgacca gaacagcaac ctgctcatcg agtacttccg aaatgagttc      960
ggggagctgg agagcaacaa gagcgagatg atctggaact tccactgctg ggtggagtcc     1020
tggatgacca ggccagacct acagccgggc tatgaggggt ggcaggccat tgaccccaaca     1080
ccacaggaga agagcgaagg gacatactgt tgtggcccag tctcagtgcg agccatcaag     1140
gagggagacc tgagtaccaa gtatgatgca cccttcgtgt ttgccgaggt caacgctgat     1200
gtggtggact ggatccggca ggaagatggg tctgtgctca aatccatcaa ccgttccttg     1260
gtcgtggggc agaagatcag cactaagagt gtgggcccgtg atgaccggga ggacatcacc     1320
catacctaca agtaccaga ggggtcaccg gagggagagg aagtcttcac caaggccaac     1380
cacctgaaca aactggcaga gaaagaggag acaggggtgg ccatgcgcac ccgagtgggg     1440
gacagtatga gcatgggcaa cgacttcgac gtgtttgccc acatcggcaa cgacacctcg     1500

```

```

gagactcgag agtgtcgtct cctgctctgt gcccgactg tcagctacaa cgggggtgctg 1560
gggccccgagt gtggcactga ggacatcaac ctgaccctgg atccctactc tgagaacagc 1620
atcccacttc gaatcctcta cgagaagtac agcgggtgcc tgacagagtc aaacctcatc 1680
aaggtgcggg gccttctcat cgaaccagct gccaacagct acctgctggc tgagagagat 1740
ctctacctgg agaatcccg aatcaagatc cgggtcctgg gagaacccaa gcaaaaccgc 1800
aaactggtgg ctgaggtgtc cctgaagaac ccactttccg atcccctgta tgactgcac 1860
ttcactgtgg agggggctgg cctgaccaag gagcagaagt ctgtggaagt ctcagaccgc 1920
gtgccagcgg gcgatttgg caaggcacgg gtgcacctgt tcccgactga tattggcctc 1980
cacaagctgg tggatgaact ccagtgtgac aagctgaagt cggatgaagg ttaccggaat 2040
gttatcatcg gcccggccta a 2061

```

<210> 6
 <211> 686
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de TG2 de ratón
 <400> 6

Met	Ala	Glu	Glu	Leu	Leu	Leu	Glu	Arg	Cys	Asp	Leu	Glu	Ile	Gln	Ala
1				5					10					15	
Asn	Gly	Arg	Asp	His	His	Thr	Ala	Asp	Leu	Cys	Gln	Glu	Lys	Leu	Val
			20					25					30		
Leu	Arg	Arg	Gly	Gln	Arg	Phe	Arg	Leu	Thr	Leu	Tyr	Phe	Glu	Gly	Arg
		35					40					45			
Gly	Tyr	Glu	Ala	Ser	Val	Asp	Ser	Leu	Thr	Phe	Gly	Ala	Val	Thr	Gly
	50					55					60				
Pro	Asp	Pro	Ser	Glu	Glu	Ala	Gly	Thr	Lys	Ala	Arg	Phe	Ser	Leu	Ser
65				70						75					80
Asp	Asn	Val	Glu	Glu	Gly	Ser	Trp	Ser	Ala	Ser	Val	Leu	Asp	Gln	Gln
			85						90					95	
Asp	Asn	Val	Leu	Ser	Leu	Gln	Leu	Cys	Thr	Pro	Ala	Asn	Ala	Pro	Ile
			100					105					110		
Gly	Leu	Tyr	Arg	Leu	Ser	Leu	Glu	Ala	Ser	Thr	Gly	Tyr	Gln	Gly	Ser
		115					120					125			
Ser	Phe	Val	Leu	Gly	His	Phe	Ile	Leu	Leu	Tyr	Asn	Ala	Trp	Cys	Pro
	130					135					140				
Ala	Asp	Asp	Val	Tyr	Leu	Asp	Ser	Glu	Glu	Glu	Arg	Arg	Glu	Tyr	Val
145					150					155					160
Leu	Thr	Gln	Gln	Gly	Phe	Ile	Tyr	Gln	Gly	Ser	Val	Lys	Phe	Ile	Lys
				165					170					175	
Ser	Val	Pro	Trp	Asn	Phe	Gly	Gln	Phe	Glu	Asp	Gly	Ile	Leu	Asp	Thr
			180					185					190		
Cys	Leu	Met	Leu	Leu	Asp	Met	Asn	Pro	Lys	Phe	Leu	Lys	Asn	Arg	Ser
		195					200					205			
Arg	Asp	Cys	Ser	Arg	Arg	Ser	Ser	Pro	Ile	Tyr	Val	Gly	Arg	Val	Val
	210					215					220				
Ser	Ala	Met	Val	Asn	Cys	Asn	Asp	Asp	Gln	Gly	Val	Leu	Leu	Gly	Arg
225				230						235					240
Trp	Asp	Asn	Asn	Tyr	Gly	Asp	Gly	Ile	Ser	Pro	Met	Ala	Trp	Ile	Gly
				245					250					255	
Ser	Val	Asp	Ile	Leu	Arg	Arg	Trp	Lys	Glu	His	Gly	Cys	Gln	Gln	Val

			260					265				270			
Lys	Tyr	Gly	Gln	Cys	Trp	Val	Phe	Ala	Ala	Val	Ala	Cys	Thr	Val	Leu
		275					280					285			
Arg	Cys	Leu	Gly	Ile	Pro	Thr	Arg	Val	Val	Thr	Asn	Tyr	Asn	Ser	Ala
	290					295					300				
His	Asp	Gln	Asn	Ser	Asn	Leu	Leu	Ile	Glu	Tyr	Phe	Arg	Asn	Glu	Phe
305					310					315					320
Gly	Glu	Leu	Glu	Ser	Asn	Lys	Ser	Glu	Met	Ile	Trp	Asn	Phe	His	Cys
				325					330					335	
Trp	Val	Glu	Ser	Trp	Met	Thr	Arg	Pro	Asp	Leu	Gln	Pro	Gly	Tyr	Glu
			340					345					350		
Gly	Trp	Gln	Ala	Ile	Asp	Pro	Thr	Pro	Gln	Glu	Lys	Ser	Glu	Gly	Thr
		355					360					365			
Tyr	Cys	Cys	Gly	Pro	Val	Ser	Val	Arg	Ala	Ile	Lys	Glu	Gly	Asp	Leu
	370					375					380				
Ser	Thr	Lys	Tyr	Asp	Ala	Pro	Phe	Val	Phe	Ala	Glu	Val	Asn	Ala	Asp
385					390					395					400
Val	Val	Asp	Trp	Ile	Arg	Gln	Glu	Asp	Gly	Ser	Val	Leu	Lys	Ser	Ile
				405					410					415	
Asn	Arg	Ser	Leu	Val	Val	Gly	Gln	Lys	Ile	Ser	Thr	Lys	Ser	Val	Gly
			420					425					430		
Arg	Asp	Asp	Arg	Glu	Asp	Ile	Thr	His	Thr	Tyr	Lys	Tyr	Pro	Glu	Gly
		435					440					445			
Ser	Pro	Glu	Glu	Arg	Glu	Val	Phe	Thr	Lys	Ala	Asn	His	Leu	Asn	Lys
	450					455					460				
Leu	Ala	Glu	Lys	Glu	Glu	Thr	Gly	Val	Ala	Met	Arg	Ile	Arg	Val	Gly
465					470					475					480
Asp	Ser	Met	Ser	Met	Gly	Asn	Asp	Phe	Asp	Val	Phe	Ala	His	Ile	Gly
				485					490					495	
Asn	Asp	Thr	Ser	Glu	Thr	Arg	Glu	Cys	Arg	Leu	Leu	Leu	Cys	Ala	Arg
			500					505					510		
Thr	Val	Ser	Tyr	Asn	Gly	Val	Leu	Gly	Pro	Glu	Cys	Gly	Thr	Glu	Asp
		515					520					525			
Ile	Asn	Leu	Thr	Leu	Asp	Pro	Tyr	Ser	Glu	Asn	Ser	Ile	Pro	Leu	Arg
	530					535					540				
Ile	Leu	Tyr	Glu	Lys	Tyr	Ser	Gly	Cys	Leu	Thr	Glu	Ser	Asn	Leu	Ile
545					550					555					560
Lys	Val	Arg	Gly	Leu	Leu	Ile	Glu	Pro	Ala	Ala	Asn	Ser	Tyr	Leu	Leu
				565					570					575	
Ala	Glu	Arg	Asp	Leu	Tyr	Leu	Glu	Asn	Pro	Glu	Ile	Lys	Ile	Arg	Val
			580					585					590		
Leu	Gly	Glu	Pro	Lys	Gln	Asn	Arg	Lys	Leu	Val	Ala	Glu	Val	Ser	Leu
		595					600					605			
Lys	Asn	Pro	Leu	Ser	Asp	Pro	Leu	Tyr	Asp	Cys	Ile	Phe	Thr	Val	Glu
	610					615					620				
Gly	Ala	Gly	Leu	Thr	Lys	Glu	Gln	Lys	Ser	Val	Glu	Val	Ser	Asp	Pro
625					630					635					640
Val	Pro	Ala	Gly	Asp	Leu	Val	Lys	Ala	Arg	Val	Asp	Leu	Phe	Pro	Thr
				645					650					655	
Asp	Ile	Gly	Leu	His	Lys	Leu	Val	Val	Asn	Phe	Gln	Cys	Asp	Lys	Leu
			660					665					670		
Lys	Ser	Val	Lys	Gly	Tyr	Arg	Asn	Val	Ile	Ile	Gly	Pro	Ala		
		675					680					685			

<210> 7
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CDR de AB-1, BB-7 y DC-1

<400> 7

Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr Leu Thr
1 5 10

5 <210> 8
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> CDR de AB-1

<400> 8

Arg Thr Asn Arg Leu Phe Asp
1 5

15 <210> 9
<211> 9
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR de AB-1 y DC-1

25 <400> 9

Leu Gln Tyr Asp Asp Phe Pro Tyr Thr
1 5

30 <210> 10
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> CDR de AB-1 y BB-7

<400> 10

Ser Ser Ala Met Ser
1 5

40 <210> 11
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> CDR de AB-1

<400> 11

50 Thr Ile Ser Val Gly Gly Gly Lys Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

55 <210> 12
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR de AB-1

5 <400> 12

Leu Ile Ser Leu Tyr

1 5

10 <210> 13
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> CDR – 1 de BB-7

20 <400> 13

Leu Thr Asn Arg Leu Met Asp

1 5

25 <210> 14
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> CDR – 1 de BB-7

<400> 14

Leu Gln Tyr Val Asp Phe Pro Tyr Thr

1 5

35 <210> 15
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> CDR de BB-7

<400> 15

Thr Ile Ser Ser Gly Gly Arg Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

45 Gly

50 <210> 16
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CDR de BB-7

55 <400> 16

Leu Ile Ser Pro Tyr

1 5

5	<210> 17 <211> 7 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> CDR de DC-1 <400> 17	Leu Val Asn Arg Leu Val Asp 1 5
15	<210> 18 <211> 5 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> CDR de DC-1 <400> 18	Thr His Ala Met Ser 1 5
25	<210> 19 <211> 5 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> CDR de DC-1 <400> 19	
35		Leu Ile Ser Thr Tyr 1 5
40	<210> 20 <211> 331 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i>	
45	<220> <223> Aminoácidos 143 a 473 de TG2 humana <400> 20	

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

5 <210> 21
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <223> Aminoácidos 304 a 326 de TG2 humana
 <400> 21

Ala His Asp Gln Asn Ser Asn Leu Leu Ile Glu Tyr Phe Arg Asn Glu
 1 5 10 15
 Phe Gly Glu Ile Gln Gly Asp
 20

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

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> Aminoácidos 351 a 365 de TG2 humana

5 <400> 22

	Tyr	Glu	Gly	Trp	Gln	Ala	Leu	Asp	Pro	Thr	Pro	Gln	Glu	Lys	Ser
	1				5					10					15

10 <210> 23
<211> 18
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

15 <220>
<223> Aminoácidos 450 a 467 de TG2 humana

<400> 23

	Ser	Glu	Glu	Arg	Glu	Ala	Phe	Thr	Arg	Ala	Asn	His	Leu	Asn	Lys	Leu
	1				5					10					15	

20 **Ala** **Glu**

<210> 24
<211> 15
<212> PRT
25 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo o fragmento de unión al antígeno

30 <400> 24

	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Asn	Ser	Tyr	Leu	Thr	Trp	Phe
	1				5					10					15

35 <210> 25
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
40 <223> Anticuerpo o fragmento de unión al antígeno

<400> 25

	Thr	Leu	Ile	Tyr	Arg	Thr	Asn	Arg	Leu	Phe	Asp	Gly	Val	Pro
	1				5					10				

45 <210> 26
<211> 27
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Anticuerpo o fragmento de unión al antígeno

55 <220>
<221> VARIANTE
<222> 15,16
<223> Puede ser cualquier aminoácido.

<400> 26

Thr Leu Ile Tyr Arg Thr Asn Arg Leu Phe Asp Gly Val Pro Xaa Xaa
 1 5 10 15
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Gln Asp Phe Phe
 20 25

5 <210> 27
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 10 <223> Anticuerpo o fragmento de unión al antígeno
 <400> 27

Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Asp Phe Pro Tyr Thr Phe Gly
 1 5 10

15 <210> 28
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Anticuerpo o fragmento de unión al antígeno
 <400> 28

Phe Thr Leu Ser Ser Ser Ala Met Ser Trp Val Arg
 1 5 10

25 <210> 29
 <211> 17
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> Anticuerpo o fragmento de unión al antígeno
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 2,4,5
 <223> Puede ser cualquier aminoácido.
 40 <400> 29

Cys Xaa Ala Xaa Xaa Phe Thr Leu Ser Ser Ser Ala Met Ser Trp Val
 1 5 10 15
 Arg

45 <210> 30
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Anticuerpo o fragmento de unión al antígeno
 <400> 30

Trp Val Ala Thr Ile Ser Val Gly Gly Gly Lys Thr Tyr Tyr Pro Asp
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
 20 25

<210> 31
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Anticuerpo o fragmento de unión al antígeno

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 27,29,30,31,32
 <223> Puede ser cualquier aminoácido.

<400> 31

Trp Val Ala Thr Ile Ser Val Gly Gly Gly Lys Thr Tyr Tyr Pro Asp
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Xaa Asn Xaa Xaa Xaa Xaa
 20 25 30
 Leu

<210> 32
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Anticuerpo o fragmento de unión al antígeno

<400> 32

Tyr Cys Ala Lys Leu Ile Ser Leu Tyr Trp Gly
 1 5 10

<210> 33
 <211> 74
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de anticuerpo

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,50,51,52,53,
 54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65
 <223> Puede ser cualquier aminoácido.

<400> 33

```

Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr Leu Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1      5      10      15
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Thr Asn Arg Leu Phe
      20      25      30
Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
      35      40      45
Phe Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
      50      55      60
Xaa Leu Gln Tyr Asp Asp Phe Pro Tyr Thr
65      70

```

<210> 34
 <211> 49
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de anticuerpo

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48
 <223> Puede ser cualquier aminoácido.

<400> 34

```

Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr Leu Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1      5      10      15
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
      20      25      30
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
      35      40      45
Phe

```

<210> 35
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de anticuerpo

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22
 <223> Puede ser cualquier aminoácido.

<400> 35

```

Arg Thr Asn Arg Leu Phe Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1      5      10      15
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe
      20

```

<210> 36
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de anticuerpo

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17
 <223> Puede ser cualquier aminoácido.

5

<400> 36

Phe	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
1				5					10					15		
Xaa	Leu	Gln	Tyr	Asp	Asp	Phe	Pro	Tyr	Thr							
			20					25								

10

<210> 37
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Anticuerpo o fragmento de unión al antígeno

<400> 37

Thr	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Asn	Ser	Tyr	Leu	Thr	Trp	Tyr
1				5					10					15

20

<210> 38
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> Anticuerpo o fragmento de unión al antígeno

<400> 38

Leu	Leu	Ile	Tyr	Arg	Thr	Asn	Arg	Leu	Phe	Asp	Gly	Val	Pro
1				5					10				

30

<210> 39
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> Anticuerpo o fragmento de unión al antígeno

<400> 39

Ser	Leu	Ile	Tyr	Arg	Thr	Asn	Arg	Leu	Phe	Asp	Gly	Val	Pro
1				5					10				

40

<210> 40
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> Anticuerpo o fragmento de unión al antígeno

50

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 15,16
 <223> Puede ser cualquier aminoácido.

55

<400> 40

Leu Leu Ile Tyr Arg Thr Asn Arg Leu Phe Asp Gly Val Pro Xaa Xaa
 1 5 10 15
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Gln Asp Phe Phe
 20 25

5 <210> 41
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Anticuerpo o fragmento de unión al antígeno

<220>
 <221> VARIANTE
 15 <222> 15,16
 <223> Puede ser cualquier aminoácido.

<400> 41

Ser Leu Ile Tyr Arg Thr Asn Arg Leu Phe Asp Gly Val Pro Xaa Xaa
 1 5 10 15
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Gln Asp Phe Phe
 20 25

20 <210> 42
 <211> 12
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Anticuerpo o fragmento de unión al antígeno

30 <400> 42

Phe Thr Phe Ser Ser Ser Ala Met Ser Trp Val Arg
 1 5 10

35 <210> 43
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Anticuerpo o fragmento de unión al antígeno

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 2,4,5
 45 <223> Puede ser cualquier aminoácido.

<400> 43

Cys Xaa Ala Xaa Xaa Phe Thr Phe Ser Ser Ser Ala Met Ser Trp Val
 1 5 10 15
 Arg

55 <210> 44
 <211> 26
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anticuerpo o fragmento de unión al antígeno

5

<400> 44

Trp	Val	Ser	Thr	Ile	Ser	Val	Gly	Gly	Gly	Lys	Thr	Tyr	Tyr	Pro	Asp
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg						
			20					25							

10

<210> 45

<211> 33

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Anticuerpo o fragmento de unión al antígeno

<220>

<221> VARIANTE

20

<222> 27,29,30,31,32

<223> Puede ser cualquier aminoácido.

<400> 45

Trp	Val	Ser	Thr	Ile	Ser	Val	Gly	Gly	Gly	Lys	Thr	Tyr	Tyr	Pro	Asp
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Xaa	Asn	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
			20					25				30			
Leu															

25

<210> 46

<211> 107

<212> PRT

30

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Región variable de la cadena ligera de AB-1

35

<400> 46

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

40

<210> 47

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Región variable de la cadena ligera de AB-1

<400> 47

5

```

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

```

<210> 48

<211> 107

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> AB-1_VK

15

<400> 48

```

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

```

20

<210> 49

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> AB-1_VK1

<400> 49

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

<210> 50
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> hAB-1_RKE

<400> 50

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

<210> 51
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> hAB-1_RKJ

<400> 51

ES 2 835 383 T3

```

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

```

<210> 52
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Región variable de la cadena pesada de AB-1
 <400> 52

```

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

```

<210> 53
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Región variable de la cadena pesada de AB-1
 <400> 53

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

<210> 54
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> AB-1_VH

<400> 54

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

<210> 55
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> hAB-1_RHA

<400> 55

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

<210> 56

<211> 74

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de anticuerpo

<220>

<221> VARIANTE

<222> 12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65

<223> Puede ser cualquier aminoácido.

<400> 56

Lys	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Asn	Ser	Tyr	Leu	Thr	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
1				5					10					15	
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Leu	Thr	Asn	Arg	Leu	Met
			20					25					30		
Asp	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Phe
		35					40					45			
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
	50					55					60				
Xaa	Leu	Gln	Tyr	Val	Asp	Phe	Pro	Tyr	Thr						
65				70											

<210> 57

<211> 48

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de anticuerpo

<220>

<221> VARIANTE

<222> 12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47

<223> Puede ser cualquier aminoácido.

<400> 57

Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr Leu Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
20 25 30
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe
35 40 45

<210> 58
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de anticuerpo

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21
 <223> Puede ser cualquier aminoácido.

<400> 58

Leu Thr Asn Arg Leu Met Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe
20

<210> 59
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de anticuerpo

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18
 <223> Puede ser cualquier aminoácido.

<400> 59

Phe Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15
Xaa Xaa Leu Gln Tyr Val Asp Phe Pro Tyr Thr
20 25

<210> 60
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Región variable de la cadena ligera de BB_7

<400> 60

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

<210> 61
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Región variable de la cadena pesada de BB_7

<400> 61

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

<210> 62
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Región variable de la cadena ligera de BB_7 (humanizada)

<400> 62

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

ES 2 835 383 T3

```

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

```

<210> 63
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Región variable de la cadena ligera de BB_7 (humanizada)
 <400> 63

```

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

```

<210> 64
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Región variable de la cadena pesada de BB_7 (humanizada)
 <400> 64

```

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

```

<210> 65

<211> 114
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Región variable de la cadena pesada de BB_7 (humanizada)
<400> 65

```

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

```

10

15 <210> 66
<211> 74
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos de anticuerpo

20 <220>
<221> VARIANTE
<222> 12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,50,51,52,53,
54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65
<223> Puede ser cualquier aminoácido.

25 <400> 66

```

Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr Leu Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1      5      10      15
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Val Asn Arg Leu Val
20      25      30
Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
35      40      45
Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
50      55      60
Xaa Leu Gln Tyr Asp Asp Phe Pro Tyr Thr
65      70

```

30 <210> 67
<211> 49
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos de anticuerpo

<220>
<221> VARIANTE
40 <222> 12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,
46,47,48

<223> Puede ser cualquier aminoácido.

<400> 67

```

Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr Leu Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1          5          10          15
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
20          25          30
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
35          40          45
Ala

```

5

<210> 68

<211> 23

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de anticuerpo

15

<220>

<221> VARIANTE

<222> 8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22

<223> Puede ser cualquier aminoácido.

20

<400> 68

```

Leu Val Asn Arg Leu Val Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1          5          10          15
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ala
20

```

<210> 69

25 <211> 26

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> Secuencia de aminoácidos de anticuerpo

<220>

<221> VARIANTE

<222> 2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17

35 <223> Puede ser cualquier aminoácido.

<400> 69

```

Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1          5          10          15
Xaa Leu Gln Tyr Asp Asp Phe Pro Tyr Thr
20          25

```

40

<210> 70

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

45

<220>

<223> Región variable de la cadena ligera de DC-1

<400> 70

50

```

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

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

```

5 <210> 71
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Región variable de la cadena pesada de DC-1
 <400> 71

```

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

```

15 Ser Ser
 <210> 72
 <211> 107
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Región variable de la cadena ligera de DC-1 (humanizada)
 25 <400> 72


```

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

```

<210> 73
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Región variable de la cadena ligera de DC-1 (humanizada)
 <400> 73

```

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

```

<210> 74
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Región variable de la cadena pesada de DC-1 (humanizada)
 <400> 74

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

<210> 75
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Región variable de la cadena pesada de DC-1 (humanizada)
 <400> 75

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

<210> 76
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Anticuerpo o fragmento de unión al antígeno

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 1,2,6
 <223> Puede ser cualquier aminoácido.

<400> 76

Xaa	Xaa	Asn	Arg	Leu	Xaa	Asp
1				5		

<210> 77
 <211> 9

	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
5	<220>
	<223> Anticuerpo o fragmento de unión al antígeno
	<220>
	<221> VARIANTE
10	<222> 4
	<223> Puede ser cualquier aminoácido.
	<400> 77
	<div> <div>Leu</div> <div>Gln</div> <div>Tyr</div> <div>Xaa</div> <div>Asp</div> <div>Phe</div> <div>Pro</div> <div>Tyr</div> <div>Thr</div> </div> <div> <div>1</div> <div></div> <div></div> <div></div> <div>5</div> <div></div> <div></div> <div></div> <div></div> </div>
15	<210> 78
	<211> 5
	<212> PRT
20	<213> Secuencia artificial
	<220>
	<223> Anticuerpo o fragmento de unión al antígeno
	<220>
25	<221> VARIANTE
	<222> 1,2
	<223> Puede ser cualquier aminoácido.
	<400> 78
30	
	<div> <div>Xaa</div> <div>Xaa</div> <div>Ala</div> <div>Met</div> <div>Ser</div> </div> <div> <div>1</div> <div></div> <div></div> <div></div> <div>5</div> </div>
	<210> 79
	<211> 17
35	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
	<220>
	<223> Anticuerpo o fragmento de unión al antígeno
40	<220>
	<221> VARIANTE
	<222> 4,7,8
	<223> Puede ser cualquier aminoácido.
45	<400> 79
	<div> <div>Thr</div> <div>Ile</div> <div>Ser</div> <div>Xaa</div> <div>Gly</div> <div>Gly</div> <div>Xaa</div> <div>Xaa</div> <div>Thr</div> <div>Tyr</div> <div>Tyr</div> <div>Pro</div> <div>Asp</div> <div>Ser</div> <div>Val</div> <div>Lys</div> </div> <div> <div>1</div> <div></div> <div></div> <div></div> <div>5</div> <div></div> <div></div> <div></div> <div></div> <div>10</div> <div></div> <div></div> <div></div> <div>15</div> </div> <div>Gly</div>
50	<210> 80
	<211> 5
	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
55	<220>
	<223> Anticuerpo o fragmento de unión al antígeno
	<220>
	<221> VARIANTE
60	<222> 4

<223> Puede ser cualquier aminoácido.

<400> 80

	Leu	Ile	Ser	Xaa	Tyr
5	1				5

<210> 81

<211> 11

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anticuerpo o fragmento de unión al antígeno

15 <220>

<221> VARIANTE

<222> 1

<223> También puede ser Gln o Arg.

20 <220>

<221> VARIANTE

<222> 5

<223> También puede ser Gly.

25 <220>

<221> VARIANTE

<222> 7

<223> También puede ser o Arg.

30 <220>

<221> VARIANTE

<222> 8

<223> También puede ser Asn.

35 <220>

<221> VARIANTE

<222> 11

<223> También puede ser Asn o Ala.

40 <400> 81

Lys	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Asn	Ser	Tyr	Leu	Thr
1				5					10	

<210> 82

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

50 <223> Anticuerpo o fragmento de unión al antígeno

<220>

<221> VARIANTE

<222> 1

55 <223> También puede ser Leu o Val o Asp o Ala.

<220>

<221> VARIANTE

<222> 2

60 <223> También puede ser Val o Ala.

<220>

<221> VARIANTE

<222> 3
<223> También puede ser.

5 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 4
 <223> También puede ser Asn.

10 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 6
 <223> También puede ser Met o, Val, o Glu o Gln.

15 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 7
 <223> También puede ser Thr o Ser.

20 <400> 82

Arg Thr Asn Arg Leu Phe Asp
1 5

25 <210> 83
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo o fragmento de unión al antígeno

<220>
<221> VARIANTE
<222> 1
<223> También puede ser Gln.

<220>
<221> VARIANTE
<222> 3
<223> También puede ser His.

<220>
<221> VARIANTE
<222> 4
<223> También puede ser Val o Asn.

<220>
<221> VARIANTE
<222> 5
<223> También puede ser Thr.

<220>
<221> VARIANTE
<222> 6
<223> También puede ser Tyr.

<220>
<221> VARIANTE
<222> 8
<223> También puede ser Leu o Trp.

<400> 83

Leu Gln Tyr Asp Asp Phe Pro Tyr Thr
1 5

	<210> 84	
	<211> 5	
	<212> PRT	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Anticuerpo o fragmento de unión al antígeno	
10	<220>	
	<221> VARIANTE	
	<222> 1	
	<223> También puede ser Thr.	
15	<220>	
	<221> VARIANTE	
	<222> 2	
	<223> También puede ser His o Tyr.	
20	<400> 84	
		Ser Ser Ala Met Ser
		1 5
25	<210> 85	
	<211> 17	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Anticuerpo o fragmento de unión al antígeno	
	<220>	
	<221> VARIANTE	
	<222> 1	
35	<223> También puede ser Ala.	
	<220>	
	<221> VARIANTE	
	<222> 4	
40	<223> También puede ser o Gly.	
	<220>	
	<221> VARIANTE	
	<222> 5	
45	<223> También puede ser.	
	<220>	
	<221> VARIANTE	
	<222> 7	
50	<223> También puede ser Arg.	
	<220>	
	<221> VARIANTE	
	<222> 8	
55	<223> También puede ser.	
	<220>	
	<221> VARIANTE	
	<222> 12	
60	<223> También puede ser Ala.	
	<400> 85	

Thr Ile Ser Val Gly Gly Gly Lys Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

5 <210> 86
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Anticuerpo o fragmento de unión al antígeno

15 <220>
<221> VARIANTE
<222> 1
<223> También puede ser Asp.

20 <220>
<221> VARIANTE
<222> 2
<223> También puede ser Gly.

25 <220>
<221> VARIANTE
<222> 3
<223> También puede ser Gly.

30 <220>
<221> VARIANTE
<222> 4
<223> También puede ser Pro o Thr o Val.

<400> 86

Leu Ile Ser Leu Tyr

35 1 5

<210> 87
<211> 106
<212> PRT
40 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Región variable de la cadena ligera de DD-9

45 <400> 87

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

<210> 88
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Región variable de la cadena pesada de DD-9

<400> 88

10

```

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

```

<210> 89
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Región variable de la cadena ligera de DH-2

20

<400> 89

```

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

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

```

25

<210> 90
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> Región variable de la cadena pesada de DH-2

35

<400> 90


```

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

```

<210> 91

<211> 321

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<222> 1..321

<223> /mol_type="ADN no asignado" /nota="Polinucleótido aislado" /organismo="Secuencia artificial"

<400> 91

```

gacatccaga tgacacagac tccatcttcc atgtatgcat ctctaggaga gagagtcact      60
atcacttgca aggcgagtcg ggacattaat agctatttaa cctgggttcca gcagaaacca      120
gggaaatctc ctaagaccct gatctatcgt acaaatagat tgtttgatgg ggtcccatcc      180
aggttcagtg gcagtggatc tgggcaagat ttttttctca ccatcagcag cctggaatat      240
gaagatatgg gaatttatta ttgtctacag tatgatgact ttccgtacac gttcggaggg      300
gggaccaaac tggaaataaa a                                              321

```

<210> 92

<211> 342

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<222> 1..342

<223> /mol_type="ADN no asignado" /nota="Polinucleótido aislado " /organismo="Secuencia artificial"

<400> 92

gaagtacagc tggaggagtc aggggggggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cactctcagt tcctctgcc a tgtcttgggt tggccagact 120
 ccggacagga ggctggagtg ggtcgcaacc attagtgttg gtggtggtaa aacctactat 180
 ccagacagtg tgaagggtcg cttcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctctat 240
 ctgcaaataa acagtctgag gtctgaggac acggccatgt attactgtgc aaaactaatc 300
 agtctctact ggggccaagg caccactctc acagtctcct ca 342

<210> 93
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..321
 <223> /mol_type="ADN no asignado" /nota="Polinucleótido aislado " /organismo="Secuencia artificial"
 <400> 93

gcatcaaga tgaccagtc tccatcttcc atgtatgcat ctctaggaga gagagtcac 60
 atcacttgca aggcgagtc ggacataaat agttatttaa cctggttcca acagaaacca 120
 ggaaagtctc ctaagaccct gatctatctt acaaatagat tgatggatgg ggtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggcaagaa tttttactca ccatcagcgg cctggaacat 240
 gaagatatgg gcatttatta ttgtctccag tatgttgact ttccgtacac gttcggaggg 300
 gggaccaagc tggaaataaa a 321

<210> 94
 <211> 342
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..342
 <223> /mol_type="ADN no asignado" /nota="Polinucleótido aislado " /organismo="Secuencia artificial"
 <400> 94

gcagtgaac tggtagagtc tgggggaggc ttggtgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60
 tcctgtgcag cctctggaat ctttttcagt tcctctgcc a tgtcttgggt tggccagact 120
 ccggaaaaga gactggagtg ggtcgcaact attagttagt gtggtcgttc cacctactat 180
 ccagacagtg tgaagggtcg attcaccgtc tccagagaca gtgccaagaa caccctatac 240
 ctgcaaataa acagtctgag gtctgaggac acggccattt attactgtgc aaaactaatc 300
 agtccctact ggggccaagg caccactctc acagtctcct ca 342

<210> 95
 <211> 321
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 5 <222> 1..321
 <223> /mol_type="ADN no asignado" /nota="Polinucleótido aislado " /organismo="Secuencia artificial"

<400> 95

	gacatcacga tgacccagtc tccatcttcc atatatgcat ctctgggaga gagagtcact	60
	atcacttgca aggcgagtc ggacattaat agctatttaa cctgggtcca gcagaaacca	120
	gggaaatctc ctaagatcct gatctatctt gtaaatagat tggtagatgg ggtcccatca	180
	aggttcagtg gcagtggatc tgggcaagat tatgctctca ccatcagcag tctggaatat	240
	gaagatatgg gaatttatta ttgtctacaa tatgatgact ttccgtacac gtccggaggg	300
10	gggaccaagc tggaataaaa a	321

<210> 96
 <211> 342
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 20 <222> 1..342
 <223> /mol_type="ADN no asignado" /nota="Polinucleótido aislado " /organismo="Secuencia artificial"

<400> 96

	gaagtgcagt tgggtggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc	60
	tcctgtgcag cctctggatt cactctcagt acccatgcc a tgtcttgggt tcgccagact	120
	ccggagaaga ggctggagtg ggtcgcaacc attagtagtg gtggtcgttc cacctactat	180
	ccagacagtg tgaagggtcg attcactatc tccagagaca atgtcaagaa caccctatat	240
25	ctgcaactga gcagtctgag gtctgaggac acggccgtgt atttctgtgc aagactaatc	300
	agtacctact ggggccaagg caccactctc acagtctcct ca	342

<210> 97
 <211> 39
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 35 <222> 1..39
 <223> /mol_type="ADN no asignado" /nota="Cebador sentido " /organismo="Secuencia artificial"

<400> 97

40	gcgcgcgcta gctgccagc ggatgctgtg tacctggac	39
----	---	----

<210> 98
 <211> 39
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente

<222> 1..39
 <223> /mol_type="ADN no asignado" /nota="Cebador antisentido" /organismo="Secuencia artificial"

 <400> 98
 5 ggcgcgaagc tcatccctg tctctcctt ctcggccag 39

 <210> 99
 <211> 25
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..25
 15 <223> /mol_type="ADN no asignado" /nota="Cebador TG2-FL-1" /organismo="Secuencia artificial"

 <400> 99
 atggccgagg agctggtctt agaga 25

 20 <210> 100
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..26
 <223> /mol_type="ADN no asignado" /nota="Cebador TG2-FL-2" /organismo="Secuencia artificial"

 30 <400> 100
 ggcggggcca atgatgacat tccgga 26

 <210> 101
 <211> 29
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 40 <222> 1..29
 <223> /mol_type="ADN no asignado" /nota="Cebador MH1" /organismo="Secuencia artificial"

 <220>
 <221> misc_difference
 45 <222> 18
 <223> /nota="Puede ser cualquier nucleótido"

 <400> 101
 50 cgcgcgctcg agsargtnma gctgsagtc 29

 <210> 102
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55

 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..32
 60 <223> /mol_type="ADN no asignado" /nota="cebador MH2" /organismo="Secuencia artificial"

 <220>
 <221> misc_difference
 <222> 18
 <223> /nota="Puede ser cualquier nucleótido"
 65

 <400> 102

cgcgcgctcg agsargtnma gctgsagsag tc 32

5 <210> 103
<211> 43
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<221> fuente
<222> 1..43
<223> /mol_type="ADN no asignado" /nota="cebador Mouse-G1" /organismo="Secuencia artificial"

15 <400> 103
aggcgcgagta ctacaatccc tgggcacaaat tttctgtcc acc 43

20 <210> 104
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<221> fuente
<222> 1..39
<223> /mol_type="ADN no asignado" /nota="cebador Mouse-G2a" /organismo="Secuencia artificial"

30 <400> 104
aggcgcgagta ctacaggggt tgattgtggg ccctctggg 39

35 <210> 105
<211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<221> fuente
<222> 1..40
<223> /mol_type="ADN no asignado" /nota="cebador Mouse-G2b" /organismo="Secuencia artificial"

45 <400> 105
aggcgcgagta ctacaggggt tgattgtga aatgggcccg 40

50 <210> 106
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<221> fuente
<222> 1..32
<223> /mol_type="ADN no asignado" /nota="cebador VK1" /organismo="Secuencia artificial"

60 <400> 106
cgctgcgagc tcgatattgt gatgacbcag dc 32

65 <210> 107
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

70 <220>
<221> fuente
<222> 1..32
<223> /mol_type="ADN no asignado" /nota="cebador VK2" /organismo="Secuencia artificial"

75 <400> 107
cgctgcgagc tcgagrttkt gatgacccar ac 32

5 <210> 108
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 10 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..32
 <223> /mol_type="ADN no asignado" /nota="cebador VK3" /organismo="Secuencia artificial"

 <400> 108
 cgctgcgagc tcgaaaatgt gctcacccag tc 32

 15 <210> 109
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..32
 <223> /mol_type="ADN no asignado" /nota="cebador VK4" /organismo="Secuencia artificial"

 25 <400> 109
 cgctgcgagc tcgayattgt gatgacacag tc 32

 30 <210> 110
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 35 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..32
 <223> /mol_type="ADN no asignado" /nota="cebador VK5" /organismo="Secuencia artificial"

 40 <400> 110
 cgctgcgagc tcgacatcca gatgacacag ac 32

 45 <210> 111
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 50 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..32
 <223> /mol_type="ADN no asignado" /nota="cebador VK6" /organismo="Secuencia artificial"

 <400> 111
 cgctgcgagc tcgayattgt gctsacycar tc 32

 55 <210> 112
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 60 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..32
 <223> /mol_type="ADN no asignado" /nota="cebador VK7" /organismo="Secuencia artificial"

 65 <400> 112
 cgctgcgagc tcgacatcca gatgacycar tc 32

<210> 113
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..32
 <223> /mol_type="ADN no asignado" /nota="cebador VK8" /organismo="Secuencia artificial"
 10
 <400> 113
 cgctgcgagc tccaaattgt tctcaccag tc 32
 15
 <210> 114
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..34
 <223> /mol_type="ADN no asignado" /nota="cebador K-CONST" /organismo="Secuencia artificial"
 25
 <400> 114
 ggcgcgtcta gaattaacac tcattctgt tgaa 34
 30
 <210> 115
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> AB_VHc
 35
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 5
 <223> Puede ser cualquier aminoácido.
 40
 <400> 115
 Glu Val Gln Leu Xaa Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Ser Ser Ser
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Arg Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Thr Ile Ser Val Gly Gly Gly Lys Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Leu Ile Ser Leu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val
 100 105 110
 Ser Ser
 45
 <210> 116
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> AF062260

<400> 116

```

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

```

5

<210> 117

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Restos de proximidad de 5 Angstrom de AB_VHc

<400> 117

15

```

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

```

<210> 118

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Restos de proximidad de 5 Angstrom de AF062260

25

<400> 118

```

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

```

30

<210> 119

<211> 98

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Z12347.seq

<400> 119

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

<210> 120
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> AF062260.seq

<400> 120

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

<210> 121
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> AB_VKc

<400> 121

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

<210> 122
 <211> 107
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> AY247656

10 <400> 122

```

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

```

<210> 123
 15 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 20 <223> Restos de proximidad de 5 Angstrom de AB_VKc

<400> 123

```

Glu Ile Val Leu Thr Gln Thr Cys Trp Phe Thr Leu Ile Tyr Gly Val
1      5      10      15
Pro Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Gln Asp Phe Phe Tyr Cys Phe Gly
      20      25      30

```

25 <210> 124
 <211> 32
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Restos de proximidad de 5 Angstrom de AY247656

35 <400> 124

```

Glu Ile Val Leu Thr Gln Thr Cys Trp Tyr Leu Leu Ile Tyr Gly Val
1      5      10      15
Pro Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Tyr Cys Phe Gly
      20      25      30

```

40 <210> 125
 <211> 96
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> X93620.seq

ES 2 835 383 T3

<400> 125

```

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

```

5

<210> 126

<211> 96

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> AY247656.seq

<400> 126

15

```

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

```

<210> 127

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> AB_VKc

25

<400> 127

```

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

```

<210> 128
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> AF193851

<400> 128

```

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

```

<210> 129
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Restos de proximidad de 5 Angstrom de Angstrom de AB_VKc

<400> 129

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Cys Trp Phe Thr Leu Ile Tyr Gly Val
1      5      10      15
Pro Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Gln Asp Phe Phe Tyr Cys Phe Gly
      20      25      30

```

<210> 130
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Restos de proximidad de 5 Angstrom de AF193851

<400> 130

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Thr	Cys	Trp	Phe	Ser	Leu	Ile	Tyr	Gly	Val
1				5					10					15	
Pro	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Tyr	Cys	Phe	Gly
			20					25					30		

5 <210> 131
 <211> 96
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> J00248.seq

<400> 131

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

15 <210> 132
 <211> 96
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> AF193851.seq

25 <400> 132

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

30 <210> 133
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> AB_VHc

<220>
 <221> VARIANTE

<222> 5
<223> Puede ser cualquier aminoácido.

<400> 133

5

```

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

```

<210> 134
<211> 114
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> AB_RHA

15

<400> 134

```

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

```

<210> 135
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20

<220>
<223> AB_VKc

25

<400> 135

```

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

```

<210> 136
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> AB_RKE

<400> 136

```

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

```

<210> 137
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> AB_RKJ

<400> 137

```

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

```

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

5 <210> 138
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<221> fuente
<222> 1..36
<223> /mol_type="ADN no asignado" /nota="cebador de anclaje de RACE" /organismo="Secuencia artificial"

15 <220>
<221> misc_difference
<222> 24, 25, 29, 30, 34, 35
<223> /nota="En la que el nucleótido es desoxiinosina"

20 <400> 138
ggccacgcgt cgactagtagt gggnggggnn gggngng 36

25 <210> 139
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<221> fuente
<222> 1..27
<223> /mol_type="ADN no asignado" /nota="cebador MHV1" /organismo="Secuencia artificial"

35 <400> 139
atgaaatgca gctggggcat cttcttc 27

40 <210> 140
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<221> fuente
<222> 1..26
<223> /mol_type="ADN no asignado" /nota="cebador MHV2" /organismo="Secuencia artificial"

50 <400> 140
atgggatgga gctrtatcat sytctt 26

55 <210> 141
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<221> fuente
<222> 1..27
<223> /mol_type="ADN no asignado" /nota="cebador MHV3" /organismo="Secuencia artificial"

65 <400> 141
atgaagwtgt ggtaaactg gggtttt 27

<210> 142
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..25
 <223> /mol_type="ADN no asignado" /nota=" cebador MHV4" /organismo="Secuencia artificial"
 5
 <400> 142
 atgracttg ggytcagctt grttt 25
 <210> 143
 10 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <221> fuente
 <222> 1..30
 <223> /mol_type="ADN no asignado" /nota=" cebador MHV5" /organismo="Secuencia artificial"
 20 <400> 143
 atggactcca ggctcaattt agtttctt 30
 <210> 144
 <211> 27
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..27
 30 <223> /mol_type="ADN no asignado" /nota=" cebador MHV6" /organismo="Secuencia artificial"
 <400> 144
 atggctgtcy trsgctrct cttctgc 27
 35 <210> 145
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..26
 <223> /mol_type="ADN no asignado" /nota=" cebador MHV7" /organismo="Secuencia artificial"
 45 <400> 145
 atggratgga gckggrctt tmtctt 26
 <210> 146
 <211> 23
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 55 <222> 1..23
 <223> /mol_type="ADN no asignado" /nota=" cebador MHV8" /organismo="Secuencia artificial"
 <400> 146
 atgagagtgc tgattcttt gtg 23
 60 <210> 147
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>

<221> fuente
 <222> 1..30
 <223> /mol_type="ADN no asignado" /nota=" cebador MHV9" /organismo="Secuencia artificial"

5 <400> 147
 atggmttggg tgtggamctt gctattcctg 30

10 <210> 148
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..27
 <223> /mol_type="ADN no asignado" /nota=" cebador MHV10" /organismo="Secuencia artificial"

20 <400> 148
 atgggcagac ttacattctc attcctg 27

25 <210> 149
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..28
 <223> /mol_type="ADN no asignado" /nota=" cebador MHV11" /organismo="Secuencia artificial"

35 <400> 149
 atggatttg ggctgattt ttttattg 28

40 <210> 150
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..27
 <223> /mol_type="ADN no asignado" /nota=" cebador MHV12" /organismo="Secuencia artificial"

50 <400> 150
 atgatggtgt taagtcttct gtacctg 27

55 <210> 151
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..21
 <223> /mol_type="ADN no asignado" /nota=" cebador MHCG1" /organismo="Secuencia artificial"

65 <400> 151
 cagtggatag acagatgggg g 21

70 <210> 152
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

75 <220>
 <221> fuente

<222> 1..21
 <223> /mol_type="ADN no asignado" /nota=" cebador MHCG2A" /organismo="Secuencia artificial"

5 <400> 152
 cagtggatag accgatgggg c 21

10 <210> 153
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..21
 <223> /mol_type="ADN no asignado" /nota=" cebador MHCG2b" /organismo="Secuencia artificial"

20 <400> 153
 cagtggatag actgatgggg g 21

25 <210> 154
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..21
 <223> /mol_type="ADN no asignado" /nota=" cebador MHCG3" /organismo="Secuencia artificial"

35 <400> 154
 caagggatag acagatgggg c 21

40 <210> 155
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..30
 <223> /mol_type="ADN no asignado" /nota="MKV1 de 30 meros" /organismo="Secuencia artificial"

50 <400> 155
 atgaagttgv vtgttaggct gttggtgctg 30

55 <210> 156
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..30
 <223> /mol_type="ADN no asignado" /nota="MKV2 de 29 meros" /organismo="Secuencia artificial"

65 <400> 156
 atggagwcag acacactcct gytatgggtg 30

70 <210> 157
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

75 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..30

<223> /mol_type="ADN no asignado" /nota="MKV3 de 30 meros" /organismo="Secuencia artificial"

<400> 157
 atgagtgtgc tcactcaggt cctgsggtg 30

5

<210> 158
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..33
 <223> /mol_type="ADN no asignado" /nota="MKV4 de 33 meros" /organismo="Secuencia artificial"

15

<400> 158
 atgaggrccc ctgctcagwt tyttggmwtc ttg 33

20

<210> 159
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..29
 <223> /mol_type="ADN no asignado" /nota="MKV5 de 30 meros" /organismo="Secuencia artificial"

30

<400> 159
 atggatttwa ggtgcagatt wtcagcttc 29

35

<210> 160
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..27
 <223> /mol_type="ADN no asignado" /nota="MKV6 de 27 meros" /organismo="Secuencia artificial"

45

<400> 160
 atgaggtkck ktgktsagst sctgrgg 27

50

<210> 161
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..31
 <223> /mol_type="ADN no asignado" /nota="MKV7 de 31 meros" /organismo="Secuencia artificial"

60

<400> 161
 atgggcwta agatggagtc acakwyycwg g 31

65

<210> 162
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..31
 <223> /mol_type="ADN no asignado" /nota="MKV8 de 31 meros" /organismo="Secuencia artificial"

	<400> 162 atgtggggay ctktttymmm ttttcaatt g	31
5	<210> 163 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <221> fuente <222> 1..25 <223> /mol_type="ADN no asignado" /nota="MKV9 de 25 meros" /organismo="Secuencia artificial"	
15	<400> 163 atggrtrccw casctcagtt ccttg	25
20	<210> 164 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <221> fuente <222> 1..27 <223> /mol_type="ADN no asignado" /nota="MKV10 de 27 meros" /organismo="Secuencia artificial"	
30	<400> 164 atgtatatat gttgtgtgc tatttct	27
35	<210> 165 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <221> fuente <222> 1..28 <223> /mol_type="ADN no asignado" /nota="MKV11 de 28 meros" /organismo="Secuencia artificial"	
45	<400> 165 atggaagccc cagctcagct tctcttc	28
50	<210> 166 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <221> fuente <222> 1..26 <223> /mol_type="ADN no asignado" /nota="cebador CL12A" /organismo="Secuencia artificial"	
60	<400> 166 atgragtywc agaccaggt cttyrt	26
65	<210> 167 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <221> fuente <222> 1..26 <223> /mol_type="ADN no asignado" /nota="cebador CL12B" /organismo="Secuencia artificial"	

	<400> 167	
	atggagacac atttcaggt ctttgt	26
5	<210> 168 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <221> fuente <222> 1..26 <223> /mol_type="ADN no asignado" /nota=" cebador CL13" /organismo="Secuencia artificial"	
15	<400> 168	
	atggattcac aggcccaggt tcttat	26
20	<210> 169 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <221> fuente <222> 1..26 <223> /mol_type="ADN no asignado" /nota=" cebador CL14" /organismo="Secuencia artificial"	
	<400> 169	
	atgatgagtc ctgcccagtt cctgtt	26
30	<210> 170 <211> 29 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <221> fuente <222> 1..29 <223> /mol_type="ADN no asignado" /nota=" cebador CL15" /organismo="Secuencia artificial"	
40	<400> 170	
	atgaatttgc ctgttcattct cttggtgct	29
45	<210> 171 <211> 29 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <221> fuente <222> 1..29 <223> /mol_type="ADN no asignado" /nota=" cebador CL16" /organismo="Secuencia artificial"	
55	<400> 171	
	atggatttgc aattggtcct catctcctt	29
60	<210> 172 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <221> fuente <222> 1..26 <223> /mol_type="ADN no asignado" /nota="cebador CL17A" /organismo="Secuencia artificial"	
	<400> 172	

atgaggtgcc tarctsagtt cctgrg 26

5 <210> 173
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<221> fuente
<222> 1..26
<223> /mol_type="ADN no asignado" /nota="cebador CL17B" /organismo="Secuencia artificial"

15 <400> 173
atgaagtact ctgctcagtt tctagg 26

20 <210> 174
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<221> fuente
<222> 1..26
<223> /mol_type="ADN no asignado" /nota="cebador CL17C" /organismo="Secuencia artificial"

30 <400> 174
atgaggcatt ctctcaatt ctggg 26

35 <210> 175
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<221> fuente
<222> 1..20
<223> /mol_type="ADN no asignado" /nota="MKC de 20 meros" /organismo="Secuencia artificial"

45 <400> 175
actggatggt gggaagatgg 20

50 <210> 176
<211> 114
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> AB_VHc (mAB001VH)

<400> 176

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

[illegible]

<210> 177
<211> 114
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> BB7_VHc (mBB7001VH)

<400> 177

[illegible]

<210> 178
<211> 114
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> DC1_VHc (mDC001VH)

<400> 178

[illegible]

<210> 179
 <211> 115
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> AF062260

10 <400> 179

```

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

<210> 180
 15 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 20 <223> AF062260

<400> 180

```

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

25 <210> 181
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> AF062260

<400> 181

Cys Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly

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

5

<210> 182

<211> 30

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Restos de proximidad de 5 Angstrom de AB_VHc (mAB001VH)

15 <400> 182

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

20 <210> 183

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Restos de proximidad de 5 Angstrom de BB7_VHc (mBB7001VH)

<400> 183

	Ala	Val	Gln	Leu	Cys	Ala	Ile	Ile	Phe	Ser	Trp	Val	Arg	Trp	Val	Ala
1					5					10					15	
Arg	Phe	Thr	Val	Ser	Arg	Ser	Leu	Tyr	Cys	Ala	Lys	Trp	Gly			
			20					25					30			

30

<210> 184

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Restos de proximidad de 5 Angstrom de DC1_VHc (mDC001VH)

<400> 184

40

Glu	Val	Gln	Leu	Cys	Ala	Phe	Thr	Leu	Ser	Trp	Val	Arg	Trp	Val	Ala
1				5					10					15	
Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asn	Leu	Phe	Cys	Ala	Arg	Trp	Gly		
			20					25					30		

<210> 185
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Restos de proximidad de 5 Angstrom de AF062260
<400> 185

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

<210> 186
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Restos de proximidad de 5 Angstrom de AF062260
<400> 186

Ala Val Gln Leu Cys Ala Ile Ile Phe Ser Trp Val Arg Trp Val Ser
1 5 10 15
Arg Phe Thr Val Ser Arg Ser Leu Tyr Cys Ala Lys Trp Gly
20 25 30

<210> 187
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Restos de proximidad de 5 Angstrom de AF062260

<400> 187

Glu Val Gln Leu Cys Ala Phe Thr Phe Ser Trp Val Arg Trp Val Ser
1 5 10 15
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asn Leu Phe Cys Ala Arg Trp Gly
20 25 30

<210> 188
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> AB_VKc (mAB001VK)
<400> 188

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

<210> 189
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> AY247656

<400> 189

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

<210> 190
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> AB_VKc (mAB001VK)

<400> 190

Glu Ile Val Leu Thr Gln Thr Cys Trp Phe Thr Leu Ile Tyr Gly Val
 1 5 10 15
 Pro Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Gln Asp Phe Phe Tyr Cys Phe Gly
 20 25 30

<210> 191
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Restos de proximidad de 5 Angstrom de AY247656

<400> 191

Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Thr	Cys	Trp	Tyr	Leu	Leu	Ile	Tyr	Gly	Val
1				5					10					15	
Pro	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Tyr	Cys	Phe	Gly
			20					25					30		

5

<210> 192
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> AB_VKc1 (mAB002VK)

15

<400> 192

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

20

<210> 193
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> AB1_VKc2 (mAB003VK)

<400> 193

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

30

<210> 194
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> BB7_VKc (mBB001VK)

<400> 194

5

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

<210> 195

<211> 107

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> DC1_VKc (mDC001VK)

15

<400> 195

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

20

<210> 196

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> AF193851

<400> 196

```

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

```

<210> 197
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> AF193851

<400> 197

```

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

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

```

<210> 198
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> AF193851

<400> 198

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

<210> 199
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> AF193851
 <400> 199

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

<210> 200
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Restos de proximidad de 5 Angstrom de AB1_VKc2 (mAB003VK)
 <400> 200

Asp	Ile	Gln	Lys	Thr	Gln	Thr	Cys	Trp	Phe	Thr	Leu	Ile	Tyr	Gly	Val
1				5					10					15	
Pro	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Gln	Asp	Phe	Phe	Tyr	Cys	Phe	Gly
			20					25					30		

<210> 201
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Restos de proximidad de 5 Angstrom de BB7_VKc (mBB001VK)

<400> 201

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

5 <210> 202
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> DC1_VKc (mDC001VK)

<400> 202

Asp	Ile	Thr	Met	Thr	Gln	Thr	Cys	Trp	Phe	Ile	Leu	Ile	Tyr	Gly	Val
1				5					10					15	
Pro	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Gln	Asp	Tyr	Ala	Tyr	Cys	Phe	Gly
			20					25					30		

15 <210> 203
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> AF193851

25 <400> 203

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Thr	Cys	Trp	Phe	Ser	Leu	Ile	Tyr	Gly	Val
1				5					10					15	
Pro	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Tyr	Cys	Phe	Gly
			20					25					30		

30 <210> 204
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> AF193851

<400> 204

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Thr	Cys	Trp	Phe	Ser	Leu	Ile	Tyr	Gly	Val
1				5					10					15	
Pro	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Tyr	Cys	Phe	Gly
			20					25					30		

40 <210> 205
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> AF193851

<400> 205

50

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

5 <210> 206
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> AF193851
 <400> 206

	Asp	Ile	Thr	Met	Thr	Gln	Thr	Cys	Trp	Phe	Ser	Leu	Ile	Tyr	Gly	Val
	1				5					10					15	
	Pro	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Thr	Tyr	Cys	Phe	Gly
				20					25					30		

15 <210> 207
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> CDR1 de la cadena pesada de AB
 <400> 207

	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Ser	Ala	Met	Ser	Trp	Val
	1				5					10					15	
25	Arg															

30 <210> 208
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> CDR 1 de la cadena pesada de BB7 RHA
 <400> 208

	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Ile	Ile	Phe	Ser	Ser	Ser	Ala	Met	Ser	Trp	Val
	1				5					10					15	
	Arg															

40 <210> 209
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> CDR 1 de la cadena pesada de BB7 RHA
 <400> 209

	Ile	Ile	Phe	Ser	Ser	Ser	Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg
	1				5					10		

50 <210> 210

<211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> CDR1 de la cadena pesada de DC1 RHA
 <400> 210
 Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr His Ala Met Ser Trp Val
 1 5 10 15
 10 Arg
 <210> 211
 <211> 12
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> CDR1 de la cadena pesada de DC1 RHA
 20 <400> 211
 Phe Thr Phe Ser Thr His Ala Met Ser Trp Val Arg
 1 5 10
 25 <210> 212
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> CDR1 de cadena pesada de DC1 RHA/DC1 RHB
 <400> 212
 Thr His Ala Met Ser
 1 5
 35 <210> 213
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> CDR1 de cadena pesada de DC1 RHB
 <400> 213
 45 Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Ser Thr His Ala Met Ser Trp Val
 1 5 10 15
 Arg
 <210> 214
 <211> 12
 50 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> CDR1 de cadena pesada de DC1 RHB
 55 <400> 214

		Phe	Thr	Leu	Ser	Thr	His	Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	
		1				5					10			

5 <210> 215
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> CDR2 de cadena pesada de AB
 <400> 215

		Trp	Val	Ser	Thr	Ile	Ser	Val	Gly	Gly	Gly	Lys	Thr	Tyr	Tyr	Pro	Asp
		1				5					10					15	
		Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr
					20					25					30		

Leu

15 <210> 216
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> CDR2 de cadena pesada de AB
 <400> 216

		Trp	Val	Ser	Thr	Ile	Ser	Val	Gly	Gly	Gly	Lys	Thr	Tyr	Tyr	Pro	Asp
		1				5					10					15	
		Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn				
					20					25							

25

30 <210> 217
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CDR2 de cadena pesada de BB7 RHB

35 <400> 217

		Trp	Val	Ser	Thr	Ile	Ser	Ser	Gly	Gly	Arg	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Pro	Asp
		1				5					10					15	
		Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr
						20					25				30		

Leu

40 <210> 218
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> CDR2 de cadena pesada de BB7 RHB

50 <400> 218

	Trp	Val	Ser	Thr	Ile	Ser	Ser	Gly	Gly	Arg	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Pro	Asp
	1				5					10					15	
	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn				
				20					25							

5 <210> 219
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> CDR2 de cadena pesada de BB7 RHB/DC1 RHA
 <400> 219

	Trp	Val	Ser	Thr	Ile	Ser	Ser	Gly	Gly	Arg	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Pro	Asp
	1				5					10					15	
	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg						
				20					25							

15 <210> 220
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> CDR2 de cadena pesada de BB7 RHA
 <400> 220

	Trp	Val	Ala	Thr	Ile	Ser	Ser	Gly	Gly	Arg	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Pro	Asp
	1				5					10					15	
	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Val	Ser	Arg	Asp	Ser	Ser	Lys	Asn	Thr
				20					25					30		

25 **Leu**

30 <210> 221
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> CDR2 de cadena pesada de BB7 RHA
 <400> 221

	Trp	Val	Ala	Thr	Ile	Ser	Ser	Gly	Gly	Arg	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Pro	Asp
	1				5					10					15	
	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Val	Ser	Arg	Asp	Ser				
				20					25							

40 <210> 222
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> CDR2 de cadena pesada de BB7 RHA
 <400> 222

Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Arg Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg
 20 25

<210> 223
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CDR2 de cadena pesada de DC1 RHB

<400> 223

Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Arg Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
 20 25 30
 Leu

<210> 224
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CDR2 de cadena pesada de DC1 RHB

<400> 224

Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Arg Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
 20 25

<210> 225
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CDR2 de cadena pesada de DC1 RHB

<400> 225

Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Arg Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
 20 25

<210> 226
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CDR3 de cadena pesada de BB7 RHB/BB7 RHA

<400> 226

Tyr Cys Ala Lys Leu Ile Ser Pro Tyr Trp Gly
 1 5 10

<210> 227
 <211> 11
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> CDR3 de cadena pesada de DC1 RHA
 10 <400> 227

 Tyr Cys Ala Lys Leu Ile Ser Thr Tyr Trp Gly
 1 5 10

 <210> 228
 15 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 20 <223> CDR3 de cadena pesada de DC1 RHB

 <400> 228

 Phe Cys Ala Arg Leu Ile Ser Thr Tyr Trp Gly
 1 5 10

 25 <210> 229
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> CDR2 de cadena ligera de AB RKE

 <400> 229
 35
 Leu Leu Ile Tyr Arg Thr Asn Arg Leu Phe Asp Gly Val Pro Ser Arg
 1 5 10 15
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Phe
 20 25

 <210> 230
 40 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 45 <223> CDR2 de cadena ligera de AB RJK

 <400> 230

 Ser Leu Ile Tyr Arg Thr Asn Arg Leu Phe Asp Gly Val Pro Ser Arg
 1 5 10 15
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Phe
 20 25

 50 <210> 231
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 55 <220>
 <223> CDR2 de cadena ligera de BB7 RKB

<400> 231

Ser Leu Ile Tyr Leu Thr Asn Arg Leu Met Asp Gly Val Pro Ser Arg
1 5 10 15
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Phe
20 25

5

<210> 232

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> CDR2 de cadena ligera de BB7 RKB

<400> 232

15

Ser Leu Ile Tyr Leu Thr Asn Arg Leu Met Asp Gly Val Pro
1 5 10

<210> 233

<211> 27

20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR2 de cadena ligera de BB7 RKA

25

<400> 233

Thr Leu Ile Tyr Leu Thr Asn Arg Leu Met Asp Gly Val Pro Ser Arg
1 5 10 15
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Gln Glu Phe Leu
20 25

30

<210> 234

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> CDR2 de cadena ligera de BB7 RKA

<400> 234

Thr Leu Ile Tyr Leu Thr Asn Arg Leu Met Asp Gly Val Pro
1 5 10

40

<210> 235

<211> 27

<212> PRT

45

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR2 de cadena ligera de DC1 RKA

50

<400> 235

Ser Leu Ile Tyr Leu Val Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg
1 5 10 15
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Phe
20 25

<210> 236
 <211> 14
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> CDR2 de cadena ligera de DC1 RKA
 10 <400> 236

 Ser Leu Ile Tyr Leu Val Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro
 1 5 10

 <210> 237
 15 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 20 <223> CDR2 de cadena ligera de DC1 RKB

 <400> 237

 Ile Leu Ile Tyr Leu Val Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg
 1 5 10 15
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ala
 20 25
 25 <210> 238
 <211> 14
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> CDR2 de cadena ligera de DC1 RKB

 <400> 238
 35 <210> 239
 <211> 13
 40 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> CDR3 de cadena ligera de BB7 RKB
 45 <400> 239

 Tyr Cys Leu Gln Tyr Val Asp Phe Pro Tyr Thr Phe Gly
 1 5 10
 50 <210> 240
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 55 <220>
 <223> sitio de unión a sustrato de ratón

 <400> 240

Tyr Asn Ser Ala His Asp Gln Asn Ser Asn Leu Leu Ile Glu Tyr Phe
 1 5 10 15
 Arg Asn Glu Phe Gly Glu Leu Glu Ser Asn Lys Ser Glu Met Ile
 20 25 30

<210> 241
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> *Rattus*

<220>
 <223> sitio de unión a sustrato de rata

<400> 241

Tyr Asn Ser Ala His Asp Gln Asn Ser Asn Leu Leu Ile Glu Tyr Phe
 1 5 10 15
 Arg Asn Glu Tyr Gly Glu Leu Glu Ser Asn Lys Ser Glu Met Ile
 20 25 30

<210> 242
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <223> sitio de unión a sustrato de ser humano

<400> 242

Tyr Asn Ser Ala His Asp Gln Asn Ser Asn Leu Leu Ile Glu Tyr Phe
 1 5 10 15
 Arg Asn Glu Phe Gly Glu Ile Gln Gly Asp Lys Ser Glu Met Ile
 20 25 30

<210> 243
 <211> 48
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<220>
 <223> Parte posterior del núcleo detrás del sitio activo de ratón

<400> 243

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

<210> 244
 <211> 48
 <212> PRT
 <213> *Rattus*

<220>
 <223> Parte posterior del núcleo detrás del sitio activo de rata

<400> 244

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

<210> 245

<211> 48

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

10 <223> Parte posterior del núcleo detrás del sitio activo de ser humano

<400> 245

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

15 <210> 246

<211> 39

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

20 <220>

<223> Intersección parte posterior del núcleo con el barril beta-1 de ratón

<400> 246

Thr	Tyr	Lys	Tyr	Pro	Glu	Gly	Ser	Pro	Glu	Glu	Arg	Glu	Val	Phe	Thr
1				5					10					15	
Lys	Ala	Asn	His	Leu	Asn	Lys	Leu	Ala	Glu	Lys	Glu	Glu	Thr	Gly	Val
			20					25					30		
Ala	Met	Arg	Ile	Arg	Val	Gly									
		35													

25

<210> 247

<211> 39

<212> PRT

30 <213> *Rattus*

<220>

<223> Intersección parte posterior del núcleo con el barril beta-1 de rata

35 <400> 247

Thr	Tyr	Lys	Tyr	Pro	Glu	Gly	Ser	Pro	Glu	Glu	Arg	Glu	Val	Phe	Thr
1				5					10					15	
Arg	Ala	Asn	His	Leu	Asn	Lys	Leu	Ala	Glu	Lys	Glu	Glu	Thr	Gly	Val
			20					25					30		
Ala	Met	Arg	Ile	Arg	Val	Gly									
		35													

40 <210> 248

<211> 39

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> Intersección parte posterior del núcleo con el barril beta-1 de ser humano

<400> 248

5

```

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

          Ala Met Arg Ile Arg Val Gly
              35

```

<210> 249

<211> 342

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<221> fuente

<222> 1..342

<223> /mol_type="ADN no asignado" /nota="AB VH1" /organismo="Secuencia artificial"

15

<400> 249

```

gaagtacagc tggaggagtc agggggggggc ttagtgaagc ctggaggggc cctgaaactc      60
tcctgtgcag cctctggatt cactctcagt tcctctgcca tgtcttgggt tcgccagact      120
ccggacagga ggctggagtg ggtcgcaacc attagtgttg gtggtggtaa aaccactat      180
ccagacagtg tgaagggtcg cttcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctctat      240
ctgcaaatga acagtctgag gtctgaggac acggccatgt attactgtgc aaaactaatc      300
agtctctact ggggccaagg caccactctc acagtctcct ca                          342

```

20

<210> 250

<211> 114

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> AB VH1

30

<400> 250

```

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

```

<210> 251
 <211> 321
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..321
 10 <223> /mol_type="ADN no asignado" /nota="AB1 VK" /organismo="Secuencia artificial"

 <400> 251

 gacatccaga tgacacagac tccatcttcc atgtatgcat ctctaggaga gagagtcact 60
 atcacttgca aggcgagtca ggacattaat agctatttaa cctgggtcca gcagaaacca 120
 gggaaatctc ctaagacct gatctatcgt acaaatagat tgtttgatgg ggtcccatcc 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggcaagat tttttctca ccatcagcag cctggaatat 240
 gaagatatgg gaatttatta ttgtctacag tatgatgact ttccgtacac gtccggaggg 300
 gggaccaaac tggaaataaa a 321

 15
 <210> 252
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> AB1 VK

 <400> 252
 25
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Thr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Arg Thr Asn Arg Leu Phe Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Gln Asp Phe Phe Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Tyr
 65 70 75 80
 Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Asp Phe Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

 <210> 253
 <211> 342
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..342
 35 <223> /mol_type="ADN no asignado" /nota="AB1 VH" /organismo="Secuencia artificial"

 <400> 253

gaagtgcagc tgggtggagtc tgggggggggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cactctcagt tcctctgcca tgtcttgggt tcgccagact 120
 ccggacagga ggctggagtg ggtcgcaacc attagtgttg gtggtggtaa aacctactat 180
 ccagacagtg tgaagggtcg cttcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctctat 240
 ctgcaaataa acagtctgag gtctgaggac acggccatgt attactgtgc aaaactaatc 300
 agtctctact ggggccaagg caccactctc acagtctcct ca 342

5 <210> 254
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> AB1 VH
 <400> 254

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

15 Ser Ser
 <210> 255
 <211> 321
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..321
 25 <223> /mol_type="ADN no asignado" /nota="AB1 VK" /organismo="Secuencia artificial"
 <400> 255

gacatcaaga tgacccagtc tccatcttcc atgtatgcat ctctaggaga gagagtcact 60
 atcacttgca aggcgagtcg ggacattaat agctatttaa cctgggtcca gcagaaacca 120
 gggaaatctc ctaagaccct gatctatcgt acaaatagat tgtttgatgg ggtcccatcc 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggcaagat tttttctca ccatcagcag cctggaatat 240
 gaagatatgg gaatttatta ttgtctacag tatgatgact ttccgtacac gttcggaggg 300
 gggaccaaac tggaataaaa a 321

30

<210> 256
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> AB1 VK

<400> 256

10

```

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

```

<210> 257
 <211> 342
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..342
 <223> /mol_type="ADN no asignado" /nota="BB7 VH" /organismo="Secuencia artificial"

20

<400> 257

```

gcagtgcacac tggtagagtc tgggggagggc ttggtgaagc ctggagggtc cctgaaactc      60
tcctgtgcag cctctggaat cattttcagt tcctctgccca tgtcttgggt tcgccagact      120
ccggaaaaga gactggagtg ggtcgcaact attagtagtg gtggtcgttc cacctactat      180
ccagacagtg tgaagggtcg attcacgcgc tccagagaca gtgccaagaa caccotatac      240
ctgcaaatgg acagtctgag gtctgaggac acggccattt attactgtgc aaaactaatc      300
agtccctact ggggccaagg caccactctc acagtctcct ca                          342

```

25

<210> 258
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> BB7 VH

35

<400> 258

```

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

Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85          90          95
Ala Lys Leu Ile Ser Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val
100          105          110
Ser Ser

```

5 <210> 259
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..321
 <223> /mol_type="ADN no asignado" /nota="BB7 VK" /organismo="Secuencia artificial"

15 <400> 259

```

gccatcaaga tgaccagtc tccatcttcc atgtatgcat ctctaggaga gagagtcac 60
atcacttgca aggcgagtc ggacataaat agttatttaa cctgggtcca acagaaacca 120
ggaaagtctc ctaagacct gatctatctt acaaatagat tgatggatgg ggtcccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc tgggcaagaa tttttactca ccatcagcgg cctggaacat 240
gaagatatgg gcatttatta ttgtctccag tatgttgact ttcgtacac gttcggaggg 300
gggaccaagc tggaataaaa a 321

```

20 <210> 260
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> BB7 VK
 <400> 260

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

<210> 261
 <211> 342
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..342
 <223> /mol_type="ADN no asignado" /nota="DC1 VH" /organismo="Secuencia artificial"
 <400> 261

gaagtgcagt	tggtggagtc	tgggggagggc	ttagtgaagc	ctggaggggc	cctgaaactc	60
tcctgtgcag	cctctggatt	cactctcagt	acccatgcc	tgtcttgggt	tcgccagact	120
ccggagaaga	ggctggagtg	ggtcgcaacc	attagtagtg	gtggtcgttc	cacctactat	180
ccagacagtg	tgaagggtcg	attcactatc	tccagagaca	atgtcaagaa	caccctatat	240
ctgcaactga	gcagtctgag	gtctgaggac	acggccgtgt	atttctgtgc	aagactaatc	300
agtacctact	ggggccaagg	caccactctc	acagtctcct	ca		342

<210> 262
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> DC1 VH

<400> 262

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

<210> 263
 <211> 321
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 10 <222> 1..321
 <223> /mol_type="ADN no asignado" /nota="DC1 VK" /organismo="Secuencia artificial"

<400> 263

gacatcacga	tgaccagtc	tccatcttcc	atatatgc	atctctgggaga	gagagtcact	60
atcacttgca	aggcgagtc	ggacattaat	agctatttaa	cctgggtcca	gcagaaacca	120
gggaaatctc	ctaagatcct	gatctatctt	gtaaatagat	tggtagatgg	ggtcccatca	180
aggttcagtg	gcagtggatc	tgggcaagat	tatgctctca	ccatcagcag	tctggaatat	240
gaagatatgg	gaatttatta	ttgtctacaa	tatgatgact	ttccgtacac	gttcggaggg	300
gggaccaagc	tggaataaaa	a				321

<210> 264
 <211> 107
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> DC1 VK

<400> 264

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

<210> 265
 <211> 342
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..342
 <223> /mol_type="ADN no asignado" /nota="JE12 VH" /organismo="Secuencia artificial"

<400> 265

gaggtccagc tgcagcagtc tggacctgag ctggtaaagc ctggggcttc agtgaagatg	60
tcctgcaagg cttctggata cagattcact agctatgtta tgcactgggt gaaacagaag	120
tctgggcagg gccttgagtg gattggatat attaatcctt acaatgatgg tgctaagtac	180
aatgagaagt tcaaaggcaa ggccacactg acttcagaca aatcctccag cacagcctac	240
atggagctca gcagcctgac ctctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagactatct	300
agtgactatt ggggccaaagg caccactctc acagtctcct ca	342

<210> 266
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> JE12 VH

<400> 266

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

<210> 267
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..336
 <223> /mol_type="ADN no asignado" /nota="JE12 VK" /organismo="Secuencia artificial"

<400> 267

gatgttttga tgacccaaaa tccactctcc ctgcctgtca gtcttgagaga tcaagcctcc 60
 atctcttgca gatctagtca gagcattgaa catattaatg gaaacaccta tttagaatgg 120
 tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ttctgatct acaaagtttc caaccgattt 180
 tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaggatc 240
 agcagagtgg aggtgaaga tctgggaatt tattactgct ttcaagggtc acatgttccg 300
 ttcacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa 336

<210> 268
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> JE12 VK

<400> 268

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

Pro	Lys	Phe	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser	Gly	Val	Pro
50						55					60				
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Arg	Ile
65					70					75					80
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Leu	Gly	Ile	Tyr	Tyr	Cys	Phe	Gln	Gly
				85					90					95	
Ser	His	Val	Pro	Phe	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
			100					105					110		

<210> 269

<211> 342

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<222> 1..342

<223> /mol_type="ADN no asignado" /nota="EH6 VH" /organismo="Secuencia artificial"

<400> 269

gaggtccagc	tgcagcagtc	tggaacctgag	ctggtaaagc	ctggggcttc	agtgaagatg	60
tcctgcaagg	cttctggata	cacattcact	agttatgtta	tgactgggt	gaagcagaag	120
cctgggcagg	gccttgagtg	gattggattt	attaatcctt	acaatgatgg	tactaagtac	180
aatgagaagt	tcaaaggcaa	ggccacactg	acctcagaca	aagcctccac	cacagcctac	240
atggagctca	gcagcctgac	ctctgaggac	tctgcggtct	attactgtgc	aagattctcc	300
tctgggtact	ggggccaagg	caccactctc	acagtctcct	ca		342

<210> 270

<211> 114

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> EH6 VH

<400> 270

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

<210> 271

<211> 336

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..336
 <223> /mol_type="ADN no asignado" /nota="EH6 VK" /organismo="Secuencia artificial"

<400> 271

```

gatgttttga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc      60
atctcttgca gatctagtca gagtattgta catagtaatg gaaacaccta tttagaatgg      120
tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ctctgatctt acaaagtttc caatcgattt      180
tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc      240
agcagagtgg gggctgagga tctgggagtt tattactgcc ttcaagtttc acatgttcct      300
ttcacgttcg gctcggggac aaagttggaa ataaaa                                336
    
```

<210> 272
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> EH6 VK

<400> 272

```

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

<210> 273
 <211> 342
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..342
 <223> /mol_type="ADN no asignado" /nota="AG9 VH" /organismo="Secuencia artificial"

<400> 273

gaggtccagc tgcagcagtc tggacctgag ttggtaaagc ctggggcttc agtgaagatg 60
 tcctgcaggg cttctggata cacattcact acctatgtta ttactgggt gaagcagaag 120
 cctgggcagg gccttgagtg gattggatat attaatoctt acaatgatgg tgctaggtac 180
 aatgagaagt tcaaaggcaa ggccacactg acttcagaca aatctccac cacagcctac 240
 atggaactca gcagcctgac ctctgaggac tctgoggtct attactgtgc aagactttct 300
 agtgactact ggggcccaagg caccactctc acagtctcct ca 342

<210> 274
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> AG9 VH

<400> 274

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

<210> 275
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..336
 <223> /mol_type="ADN no asignado" /nota="AG9 VK" /organismo="Secuencia artificial"

<400> 275

gatgttttga tgacccaaaa tccactctcc ctgcctgtca gtcttggcga tcaggcctcc 60
 atctcttgca gatctagtcg gagcattgaa catagtaatg gaaacaccta tttggaatgg 120
 tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ttctgatct acaaagtttc caaccgattt 180
 tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaggatc 240
 agcagtgtgg aggctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaagggtc acatgttccg 300
 ttcacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa 336

<210> 276
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> AG9 VK

<400> 276

10

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

<210> 277
 <211> 342
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..342
 <223> /mol_type="ADN no asignado" /nota="AH3 VH" /organismo="Secuencia artificial"

20

<400> 277

gaggtccagc	tgcagcagtc	tggacctgag	ctggtaaagc	ctggggcttc	agtgaagatg	60
tcctgcaggg	cttctggata	cacattcact	acctatgtta	ttcactgggt	gaagcagaag	120
cctgggcagg	gccttgagtg	gattggatat	attaatcctt	acaatgatgg	tgctaggtac	180
aatgagaagt	tcaaaggcaa	ggccacactg	acttcagaca	aatcctccac	cacagcctac	240
atggaactca	gcagcctgac	ctctgaggac	tctgcggtct	attactgtgc	aagactatct	300
agtgactact	ggggccaagg	caccactctc	acagtctcct	ca		342

25

<210> 278
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> AH3 VH

35

<400> 278


```

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

```

<210> 279

<211> 336

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<222> 1..336

<223> /mol_type="ADN no asignado" /nota="AH3 VK" /organismo="Secuencia artificial"

<400> 279

```

gatgttttga tgacccaaaa tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaggcctcc      60
atctcttgca gatctagtcg gagcattgaa catagtaatg gaaacaccta tttggaatgg      120
tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ttctgatctt acaaagtttc caaccgattt      180
tctgggggtcc cagacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaggatc      240
agcagtgtgg aggctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaagggttc acatgttccg      300
ttcacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa      336

```

<210> 280

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> AH3 VK

<400> 280

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

<210> 281
 <211> 357
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..357
 <223> /mol_type="ADN no asignado" /nota="DD9 VH" /organismo="Secuencia artificial"

<400> 281

cagggttactc	tgaaagagtc	tggccctggg	atattgcagc	cctcccagac	cctcagtcctg	60
acttgttctt	tttctggggt	ttcactgagc	acttcgggta	tgggtgtgag	ttggattcgt	120
cagtcctcag	gaaagggctc	ggagtggctg	gcacacattt	actgggatga	tgacaagcgc	180
tataacccat	ccctgaagag	ccggatcaca	atctccaagg	attcctcaag	caaccaggta	240
ttcctcaaga	tcaccagtgt	ggacactgca	gatactgcca	catattactg	tgctcgaagt	300
tggactacgg	ccccgtttgc	tttctggggc	caagggactc	tggtcactgt	ctctgca	357

<210> 282
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> DD9 VH

<400> 282

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

<210> 283

<211> 318

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <222> 1..318

<223> /mol_type="ADN no asignado" /nota="DD9 VK" /organismo="Secuencia artificial"

<400> 283

caaattgttc tcaccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc 60
 atgacctgca gtgccagctc aagtgtagat tacatgtact ggtaccagca gaagccagga 120
 tcctcccca gactcctgat ttatgacaca tccaacctgg cttctggagt ccctgttcgc 180
 ttcagtggca gtgggtctgg gacctcttac tctctcacia tcagccgaat gggggctgaa 240
 gatgctgccca cttattactg ccaacagtgg aatagttccc cgctcacgtt cgggtgctggg 300
 15 accaagctgg agctgaaa 318

<210> 284

<211> 106

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> DD9 VK

25 <400> 284

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

<210> 285
 <211> 357
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..357
 <223> /mol_type="ADN no asignado" /nota="DH2 VH" /organismo="Secuencia artificial"
 <400> 285

cagg	ttactc	tgaa	agagtc	tggc	ccctggg	atattgcagc	cctoccagac	cctcagtc	ctg	60
actt	gttctt	tctct	gggtt	ttcact	gagc	acttctggta	tgggtgtgag	ctggattcgt		120
cagc	cttcag	gaaagggtct	ggagtggctg	gcacacattt	actgggatga	tgacaagcgc				180
tata	acccat	ccctgaagag	ccggctcaca	atctccaagg	atacctccag	caaccaggta				240
ttcct	caaga	tcaccagtgt	ggacactgca	gatactgcca	catactactg	tgctcgaagt				300
gggactacgg	ccccgtttgc	ttactggggc	caagggactc	tggtcactgt	ctctgca					357

<210> 286
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> DH2 VH
 <400> 286

```

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

```

<210> 287
 <211> 318
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..318
 <223> /mol_type="ADN no asignado" /nota="DH2 VK" /organismo="Secuencia artificial"

<400> 287

```

caaattgttc tcactcagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc      60
atgacctgca gtgccagctc aagtgtaagt tacatgtact ggtaccagca gaagccagga      120
tcctcccca gactcctgat ttatgacaca tccaacctgg cttctggagt ccctgttcgc      180
ttcagtggca gtgggtctgg gacctcttac tctctcacia tcagccgaat ggaggctgaa      240
gatgctgcc ctttttactg ccagcagtgg agtagttccc cgctcacgtt cgggtgctggg      300
accaagctgg agctgaaa                                     318

```

<210> 288
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> DH2 VK

<400> 288

```

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

```

<210> 289

<211> 339

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<222> 1..339

<223> /mol_type="ADN no asignado" /nota="DD6 VH" /organismo="Secuencia artificial"

<400> 289

```

gaggtccagc tgcaacagtc tgggcctgaa ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagatg      60
tcctgcaagg cttctggata cagattcact gactacaaca tgcactgggt gaagcagaac      120
cttggaaga gccttgagtg gattggatat attaacccta aaaatggtgt tatttactac      180
aaccagaagt tcaagggcaa ggccacattg acagtgaaca ggtcctccaa cacagcctac      240
atggagatcc gcagcctgac atcggaagat tctgcagtct attactgtgc aacagctctg      300
acttactggg gacaagggac tctggtcact gtctctgca      339

```

<210> 290

<211> 113

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> DD6 VH

<400> 290

```

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

```

35						40					45				
Gly	Tyr	Ile	Asn	Pro	Lys	Asn	Gly	Val	Ile	Tyr	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe
50						55					60				
Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asn	Arg	Ser	Ser	Asn	Thr	Ala	Tyr
65						70					75				
Met	Glu	Ile	Arg	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
85						90					95				
Ala	Thr	Ala	Leu	Thr	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser
100						105					110				
Ala															

<210> 291
<211> 330
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

```
<220>  
<221> fuente  
<222> 1..330  
<223> /mol_type="ADN no asignado" /nota="DD6 VL" /organismo="Secuencia artificial"
```

<400> 291

caggctgttg	tgactcagga	atctgcactc	accacatcac	ctgggtgaaac	agtcacactc	60
acttgctcgt	caagtactgg	ggctgttgca	gctaataact	atgccaaactg	gatccaagaa	120
aaaccagatc	atttattcac	tggtctgata	gctggtagca	acaagcgagc	tccaggtgtt	180
cctgccagat	tctcaggctc	cctgatagga	gacaaggctg	ccctcaccat	cacaggggca	240
cagactgagg	atgaggcaat	atatttctgt	gctctatggt	acagcaacta	ttgggtgttc	300
ggtggaggaa	ccaaagtgac	tgctctaggc				330

<210> 292
<211> 110
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> DD6 VL

<400> 292

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

<210> 293
<211> 342

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<222> 1..342
<223> /mol_type="ADN no asignado" /nota="IA12 VH" /organismo="Secuencia artificial"

<400> 293

```
cagatccagt tggtagagtc tggacctgag ctgaagaagc ctggagagac agtcaagatc      60
tcctgcaagg cttctgggta taccttcaca acctatggaa tgacctgggt gaaacaggct      120
ccaggaaagg gtttaaagtg gatgggctgg ataaacacct cctctggagt gccaacatat      180
gctgatgact tcaagggacg gtttgacctc tctttggaaa cctctgccag cactgcctat      240
ttgcagatca acaacctcaa aagtgaggac acggctacat atttctgtgc aagaccggaa      300
gttgcttact ggggccaaag gactctggtc actgtctctg ca                          342
```

<210> 294
<211> 114
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> IA12 VH

<400> 294

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

<210> 295
<211> 336
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<222> 1..336
<223> /mol_type="ADN no asignado" /nota="IA12 VK" /organismo="Secuencia artificial"

<400> 295

ES 2 835 383 T3

```

gatgttgtga tgaccagac tccactcact ttgtcgggta cctttggaca accagcctct      60
atctcttgca agtcaagtca gagcctctta tatgataatg gaaagactta tttgcattgg      120
ttatttcaga ggccaggcca gtctccaagg cgcctaatact atctggtgtc taaactggac      180
tctggagttc ctgacaggtt cactggcagt ggatcaggaa cagatctttac actgaaaatc      240
agcagagtgg aggctgagga tttgggagtt tattactgog tgcaagggtac acattttccg      300
tacacgttcg gaggggggac caaactggaa ataaaaa                                336

```

<210> 296

<211> 112

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> IA12 VK

10

<400> 296

```

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

```

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une selectivamente a un epítipo dentro de la región de núcleo de la transglutaminasa tipo 2 (TG2) humana e inhibe la actividad de la TG2 humana, en donde dicha región de núcleo consiste en los aminoácidos 143 a 473 de la TG2 humana, en donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo se une selectivamente a la región que comprende los aminoácidos 304 a 326 de la TG2 humana, y en donde la actividad de la TG2 humana que se inhibe es la reticulación por TG2 de lisina y glutamina con enlaces isopeptídicos de Nε(γ-glutamil)lisina.
2. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo según la reivindicación 1, que no inhibe la actividad de TG1, TG3, TG13 y/o TG7.
3. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo:
- comprende o consiste en un anticuerpo intacto, o
 - comprende o consiste en un fragmento de unión al antígeno seleccionado del grupo que consiste en: un fragmento Fv (por ejemplo, un fragmento Fv monocatenario o un fragmento Fv unido por disulfuro); un fragmento Fab; y un fragmento de tipo Fab (por ejemplo, un fragmento Fab' o un fragmento F(ab)₂).
4. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que se une al mismo epítipo que un anticuerpo que comprende las siguientes secuencias de CDR:
- KASQDINSYLT (LCDRI);
 RTNRLFD (LCDR2);
 LQYDDFPYT (LCDR3);
 SSAMS (HCDR1);
 TISVGGGKTYYPDSVKG (HCDR2); y
 LISLY (HCDR3).
5. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que compite con y rompe la unión de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que tiene una región variable de la cadena ligera seleccionada de las siguientes secuencias:
- DIQMTQTPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLFDG
 VPSRFGSGSGSQDFFLTISSEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGKLEIK;
- DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLFDG
 VPSRFGSGSGSQDFFLTISSEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGKLEIK;
- EIVLTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLFDG
 VPSRFGSGSGSQDFFLTISSEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGKLEIK;
- DIQMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLFDG
 VPSRFGSGSGSQDFFLTISSEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGKLEIK;
- EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLTWYQQKPGKAPKLLIYRTNRLFDGV
 PSRFGSGSGGTDFFTISLQPEDFGTYCYCLQYDDFPYTFGGGKLEIK;
- DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKAPKSLIYRTNRLFDG
 VPSRFGSGSGGTDFFTISLQPEDFATYYCYCLQYDDFPYTFGGGKVEIK;
- AIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYLTNRLMDG
 VPSRFGSGSGSQEFLLTISGLEHEMGIYYCLQYVDFPYTFGGGKLEIK;
- DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKAPKSLIYLTNRLMDG
 VPSRFGSGSGGTDFFTISLQPEDFATYYCYCLQYVDFPYTFGGGKVEIK;
- DIKMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKAPKTLIYLTNRLMDG
 VPSRFGSGSGSQEFLLTISLQPEDFATYYCYCLQYVDFPYTFGGGKVEIK;
- DITMTQSPSSIYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKILIYLVNRLVDGV
 PSRFGSGSGSQDYALTISSEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGKLEIK;
- DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKAPKSLIYLVNRLVDG

VPSRFSGSGSGTDFFLTISSLQPEDFATYYCLQYDDFPYTFGQGTKVEIK;

DITMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDINSYLTWFQQKPGKAPKILIYLVNRLVDGV
PSRFSGSGSGQDYALTISLQPEDFATYYCLQYDDFPYTFGQGTKVEIK; y

5

una región variable de la cadena pesada seleccionada de las siguientes secuencias:

EVQLEESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTLSSSAMSWSVRQTPDRRLEWVATISVGG
GKTYYPDSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRSEDTAMYYCAKLISLYWGQGTTLTVSS;

10

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTLSSSAMSWSVRQTPDRRLEWVATISVGG
GKTYYPDSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRSEDTAMYYCAKLISLYWGQGTTLTVSS;

15

EVQLQESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTLSSSAMSWSVRQTPDRRLEWVATISVGG
GKTYYPDSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRSEDTAMYYCAKLISLYWGQGTTLTVSS;

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSAMSWSVRQAPGKGLEWVSTISVGG
GKTYYPDSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRSEDTAVYYCAKLISLYWGQGTTLTVSS;

20

AVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGIIFSSSAMSWSVRQTPEKRLEWVATISSGGR
STYYPDVKGRFTVSRDSAKNTLYLQMDSLRSEDTAIYYCAKLISPYWGQGTTLTVSS;

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSAMSWSVRQAPGKGLEWVSTISSGG
RSTYYPDVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRSEDTAVYYCAKLISPYWGQGTTLTVSS;

25

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIIFSSSAMSWSVRQAPGKGLEWVATISSGG
RSTYYPDVKGRFTVSRDSSKNTLYLQMNSLRSEDTAVYYCAKLISPYWGQGTTLTVSS;

30

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTLSTHAMSWSVRQTPEKRLEWVATISSGG
RSTYYPDVKGRFTISRDNANKNTLYLQLSSLRSEDTAVYFCARLISTYWGQGTTLTVSS;

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTHAMSWSVRQAPGKGLEWVSTISSGG
RSTYYPDVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRSEDTAVYYCAKLISLYWGQGTTLTVSS;

35

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSTHAMSWSVRQAPGKGLEWVATISSGG
RSTYYPDVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRSEDTAVYFCARLISTYWGQGTTLTVSS.

6. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, cuya unión a la TG2 humana se inhibe o reduce cuando un anticuerpo que tiene una región variable de la cadena ligera seleccionada de las siguientes secuencias:

40

DIQMTQTPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLFDG
VPSRFSGSGSGQDFFLTISLSEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGKLEIK;

45

DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLFDG
VPSRFSGSGSGQDFFLTISLSEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGKLEIK;

EIVLTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLFDG
VPSRFSGSGSGQDFFLTISLSEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGKLEIK;

50

DIQMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLFDG
VPSRFSGSGSGQDFFLTISLSEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGKLEIK;

EIVLTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDINSYLTWFQQKPGKAPKLLIYRTNRLFDGV
PSRFSGSGSGTDFFLTISSLQPEDFGTYCLQYDDFPYTFGGGKLEIK;

55

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDINSYLTWFQQKPGKAPKSLIYRTNRLFDG
VPSRFSGSGSGTDFFLTISSLQPEDFATYYCLQYDDFPYTFGQGTKVEIK;

AIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYLTNRLMDG
VPSRFSGSGSGQEFLTISGLEHEDMGIYYCLQYVDFPYTFGGGKLEIK;

60

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDINSYLTWFQQKPGKAPKSLIYLTNRLMDG
VPSRFSGSGSGTDFFLTISSLQPEDFATYYCLQYVDFPYTFGQGTKVEIK;

65

DIKMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDINSYLTWFQQKPGKAPKTLIYLTNRLMDG

VPSRFSGSGSGQEFLTISSLQPEDFATYYCLQYVDFPYTFGQGTKVEIK;

DITMTQSPSSSIYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQKPGKSPKILIYLVNRLVDGV
PSRFSGSGSGQDYALTISLEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGKLEIK;

5

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDINSYLTWFQKPGKAPKSLIYLVNRLVDG
VPSRFSGSGSGTDFFLTISSLQPEDFATYYCLQYDDFPYTFGQGTKVEIK;

10

DITMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDINSYLTWFQKPGKAPKILIYLVNRLVDGV
PSRFSGSGSGQDYALTISLQPEDFATYYCLQYDDFPYTFGQGTKVEIK; y

una región variable de la cadena pesada seleccionada de las siguientes secuencias:

15

EVQLEESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTLSSSAMSWMVRQTPDRRLEWVATISVGG
GKTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRSEDAMYYCAKLISLYWGQGTTLTVSS;

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTLSSSAMSWMVRQTPDRRLEWVATISVGG
GKTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRSEDAMYYCAKLISLYWGQGTTLTVSS;

20

EVQLQESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTLSSSAMSWMVRQTPDRRLEWVATISVGG
GKTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRSEDAMYYCAKLISLYWGQGTTLTVSS;

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSAMSWMVRQAPGKGLEWVSTISVGG
GKTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLISLYWGQGTTLTVSS;

25

AVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGIIFSSSAMSWMVRQTPEKRLEWVATISSGGR
STYYPDVKGRFTVSRDSKNTLYLQMDSLRSEDATYYCAKLISPYWGQGTTLTVSS;

30

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSAMSWMVRQAPGKGLEWVSTISSGG
RSTYYPDVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLISPYWGQGTTLTVSS;

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIIFSSSAMSWMVRQAPGKGLEWVATISSGG
RSTYYPDVKGRFTVSRDSSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLISPYWGQGTTLTVSS;

35

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTLSTHAMSWMVRQTPEKRLEWVATISSGG
RSTYYPDVKGRFTISRDNKNTLYLQLSSLRSEDATVYFCARLISTYWGQGTTLTVSS;

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTHAMSWMVRQAPGKGLEWVSTISSGG
RSTYYPDVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLITYWGQGTTLTVSS;

40

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSTHAMSWMVRQAPGKGLEWVATISSGG
RSTYYPDVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARLISTYWGQGTTLTVSS se une a la TG2
humana.

45

7. Un polinucleótido que codifica un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

8. Un compuesto que comprende un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y un resto adicional, por ejemplo, un resto fácilmente detectable, y/o un resto directamente o indirectamente citotóxico.

50

9. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o el polinucleótido según la reivindicación 7 o el compuesto según la reivindicación 8, en mezcla con un excipiente, adyuvante, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable, que opcionalmente comprende uno o más principios activos adicionales.

55

10. La composición farmacéutica según la reivindicación 9, en donde la composición/formulación se formula para administración intravenosa, intramuscular o subcutánea a un paciente.

60

11. Un kit de partes que comprende el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o el polinucleótido según la reivindicación 7, o el compuesto según la reivindicación 8; y un agente adicional.

65

12. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o el polinucleótido según la reivindicación 7, o el compuesto según la reivindicación 8, o la composición farmacéutica según la reivindicación 9 o 10 para su uso en medicina.

13. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o el polinucleótido según la reivindicación 7, o el compuesto según la reivindicación 8, o la composición farmacéutica según la reivindicación 9 o 10, para su uso en el tratamiento y/o diagnóstico de celiaquía, curación anormal de
5 heridas, cicatrización, cicatrices hipertróficas, cicatrización ocular, enfermedad inflamatoria del intestino, degeneración macular, psoriasis, enfermedades relacionadas con la fibrosis (por ejemplo, fibrosis hepática, fibrosis pulmonar tal como enfermedad pulmonar intersticial y enfermedad pulmonar fibrótica, fibrosis cardíaca, mielofibrosis, fibrosis renal tal como glomeruloesclerosis y fibrosis tubulointersticial), aterosclerosis, reestenosis, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades neurodegenerativas/neurológicas (por ejemplo,
10 enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad por poliglutaminas, atrofia muscular espinobulbar, atrofia dentato-rubro-pálido-luisiana, ataxias espinocerebelosas 1, 2, 3, 6, 7 y 12, atrofia rubropálida, parálisis espinocerebelosa), glioblastomas tales como glioblastoma en síndrome de Li-Fraumeni y glioblastoma esporádico, melanomas malignos, adenocarcinomas ductales pancreáticos, leucemia mieloide, leucemia mielógena aguda, síndrome mielodisplásico, síndrome mieloproliferativo, cáncer ginecológico, sarcoma de
15 Kaposi, enfermedad de Hansen y/o colitis colagenosa.

14. Un método de producción de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, comprendiendo el método aislar el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de una muestra *ex vivo* obtenida de un animal no humano que se ha inmunizado previamente utilizando:

- 20 a) un compuesto que comprende:
- i) una secuencia de polipéptido que consiste en la secuencia de polipéptido de los aminoácidos 143 a 473 de la TG2 humana, o
 - 25 ii) una secuencia de polipéptido que consiste en los aminoácidos 304 a 326 de la TG2 humana; y,
- b) opcionalmente un adyuvante;

30 y en donde el método comprende además la etapa de seleccionar un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo basándose en su unión selectiva a la región que comprende los aminoácidos 304 a 326 de la TG2 humana en la TG2 y en su inhibición de la actividad de la TG2 humana, en donde la actividad de la TG2 que se inhibe es la reticulación por TG2 de lisina y glutamina con enlaces isopeptídicos de Nε(γ-glutamil)lisina.

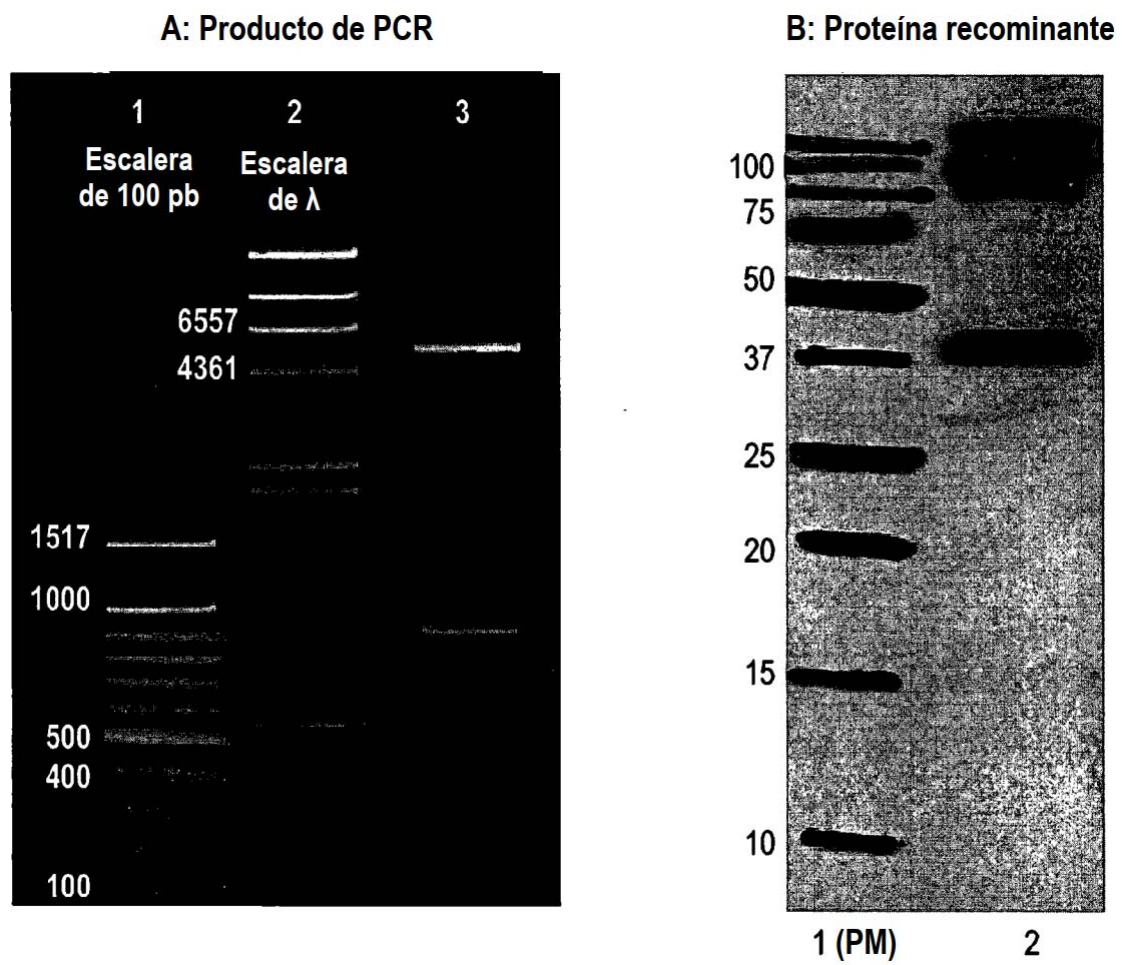


FIG. 1

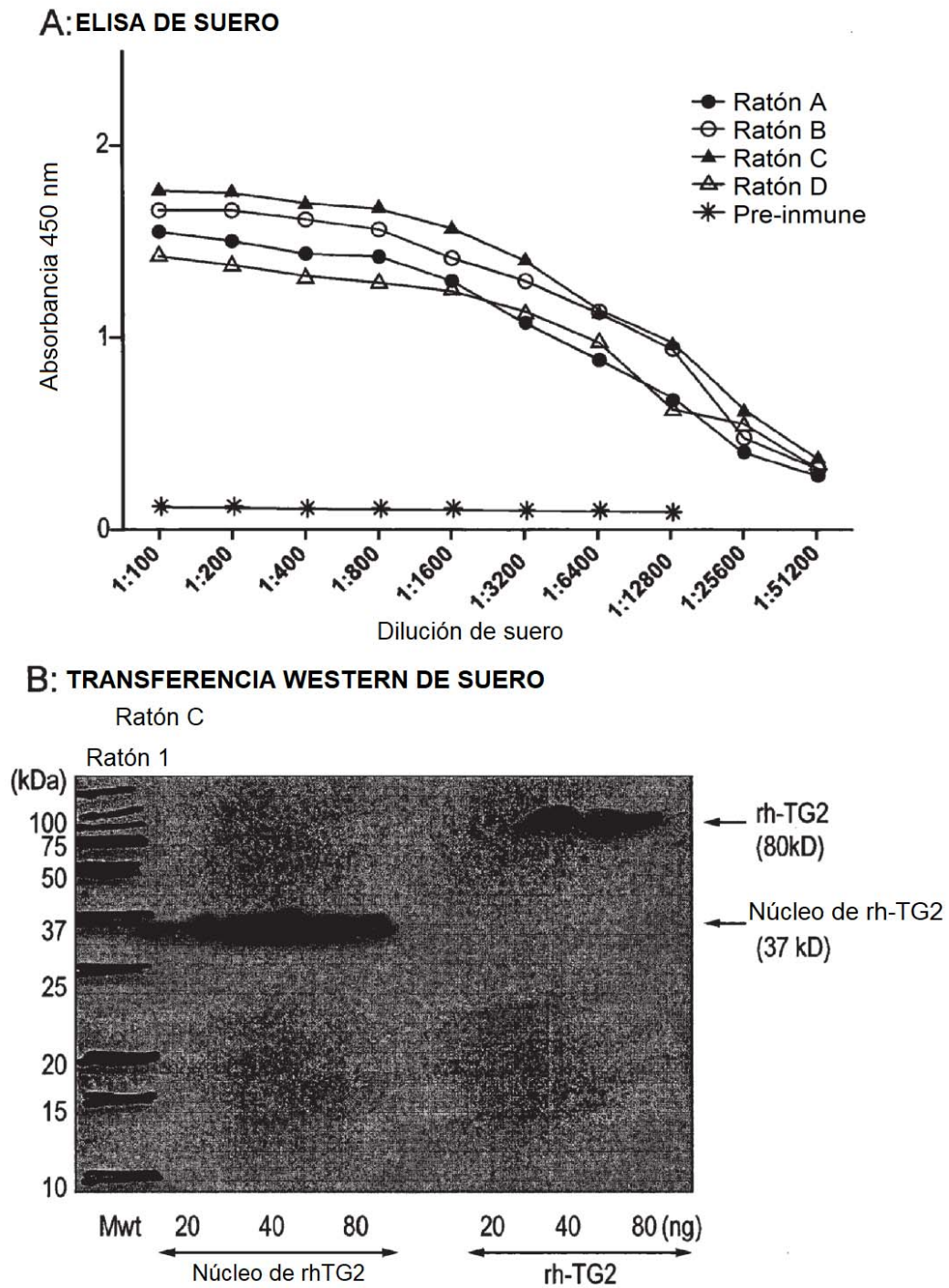
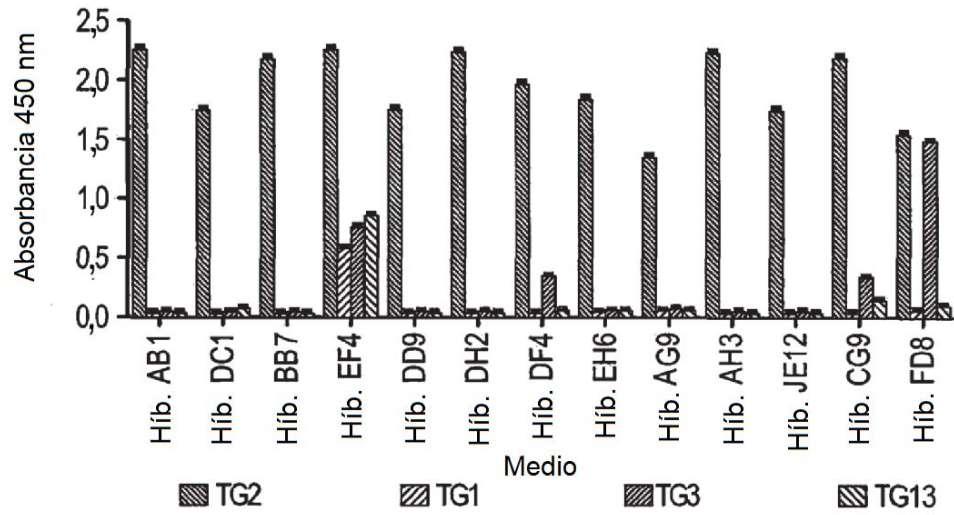


FIG. 2

A: Cribado inicial de medio acondicionado



B: Reactividad de mAbs purificados clonales

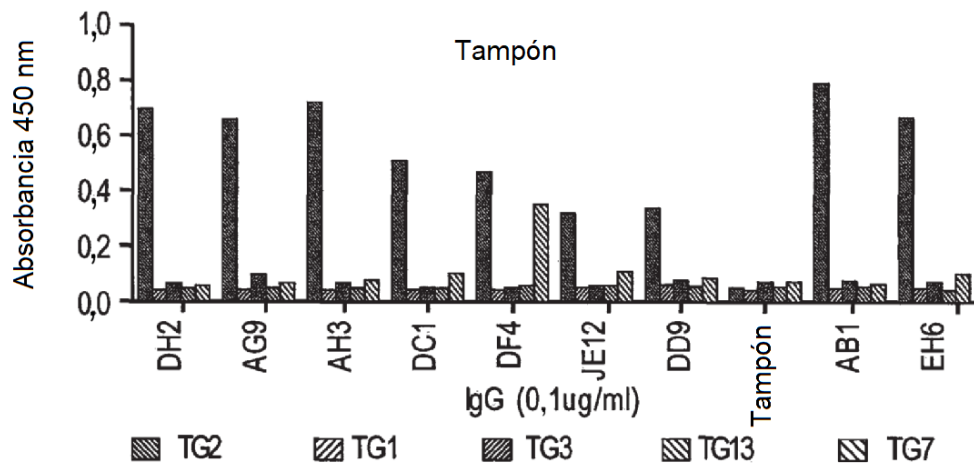


FIG. 3

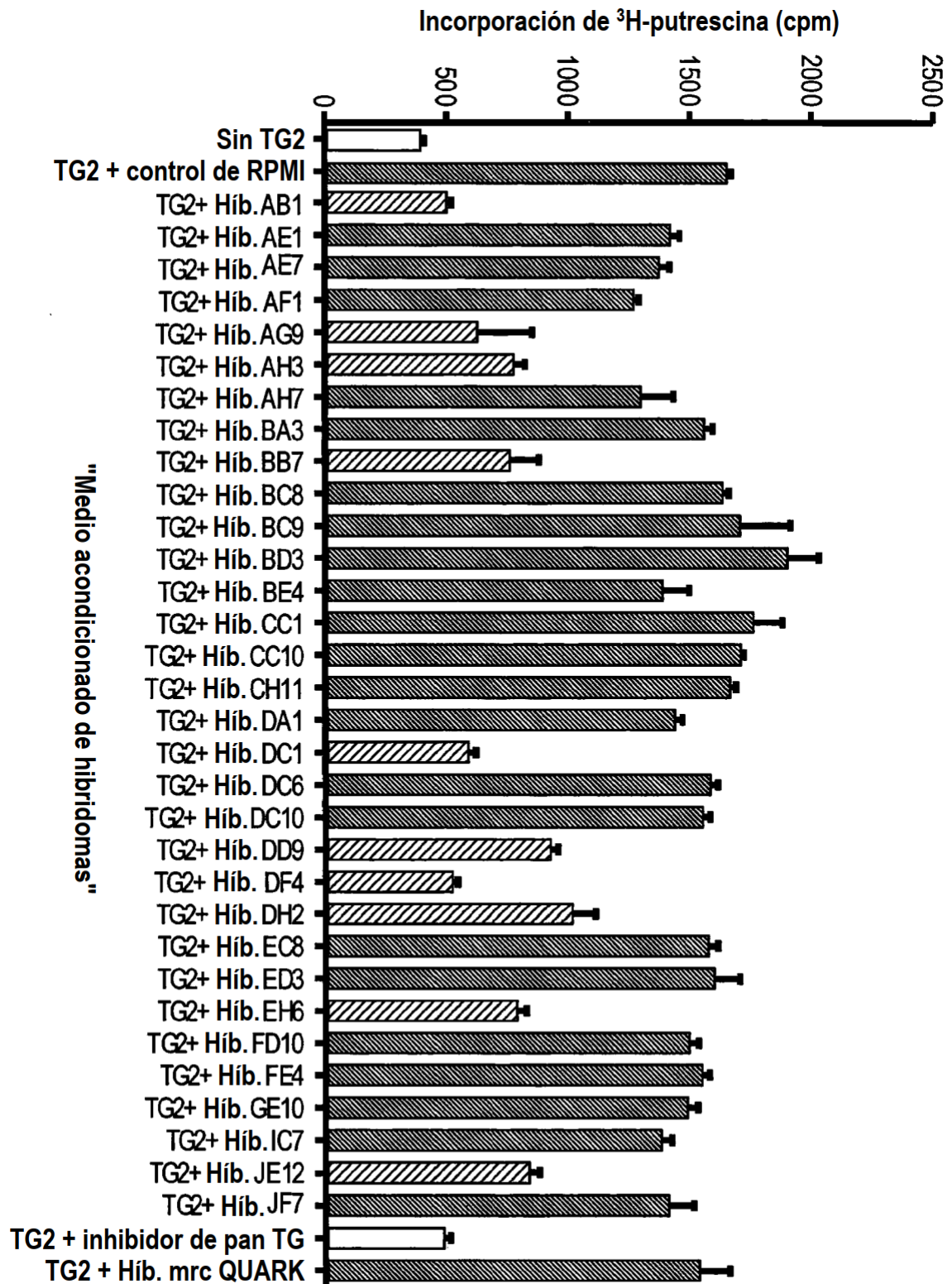


FIG. 4

```

.
Grupo 1: Localización - en frente del sitio activo - sitio de unión a sustrato
.
AB-1,      AG-1,      AH-1,      BB-7,      DC-1,      EH-6,      JE-12
TG2 de ratón YNSAHDQNSNLLIEYFRNEFGELESNKSEMI
rata        YNSAHDQNSNLLIEYFRNEFGELESNKSEMI
humana      YNSAHDQNSNLLIEYFRNEFGEIQGDKSEMI
            *****;*:~:*****
.
Grupo 2: Localización - en la parte posterior del núcleo detrás del sitio activo
.
DF-4
TG2 de ratón SEMIWNFHCWVESWMTTRPDLPQGYEGWQAIDPTPQEKSEGTGCCGPVS
rata        SEMIWNFHCWVESWMTTRPDLPQGYEGWQAIDPTPQEKSEGTGCCGPVS
humana      SEMIWNFHCWVESWMTTRPDLPQGYEGWQAIDPTPQEKSEGTGCCGPVP
            *****;*****
.
Grupo 3: Localización - parte posterior de la intersección del núcleo con barril 1 beta
Engloba sitio de unión de calcio
.
DD-9 y DH-2
TG2 de ratón TYKYPEGSPPEEREVFTKANHLNKLAEKEETGVAMRIRVG
rata        TYKYPEGSPPEEREVFTKANHLNKLAEKEETGVAMRIRVG
humana      TYKYPEGSSSEEREAFTRANHLNKLAEKEETGMAMRIRVG
            *****. ****. *****;*****

```

FIG. 5

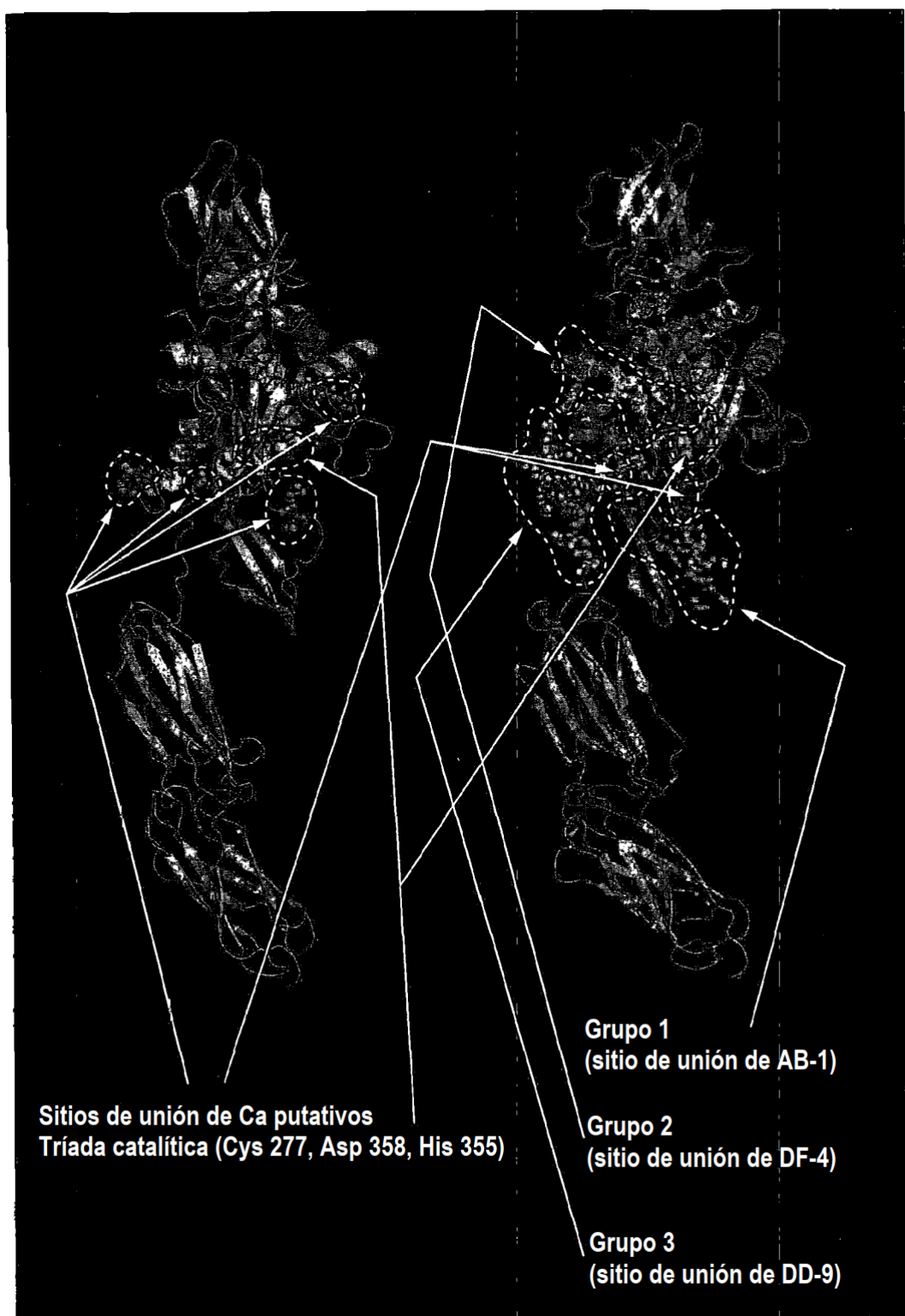


FIG. 6

Anticuerpo AB-1

AB1 VH

GAAGTACAGCTGGAGGAGTCAGGGGGGGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTCTCAGTTCCTCTGCCATGTCTTGGGTTCGC
CAGACTCCGGACAGGAGGCTGGAGTGGGTCGCAACCATTAGTGTTGGTGGTGGTAAA
ACCCACTATCCAGACAGTGTGAAGGGTCGCTTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAG
AACACCCTCTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATGTATTAC
TGTGCAAACTAATCAGTCTCTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

AB1 VH

EVQLEESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTLSSSAMSQVRQTPDRRLEWVATISVGGGK
THYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRSEDAMYCAKLISLYWGQGTTLTVSS

AB1 VK

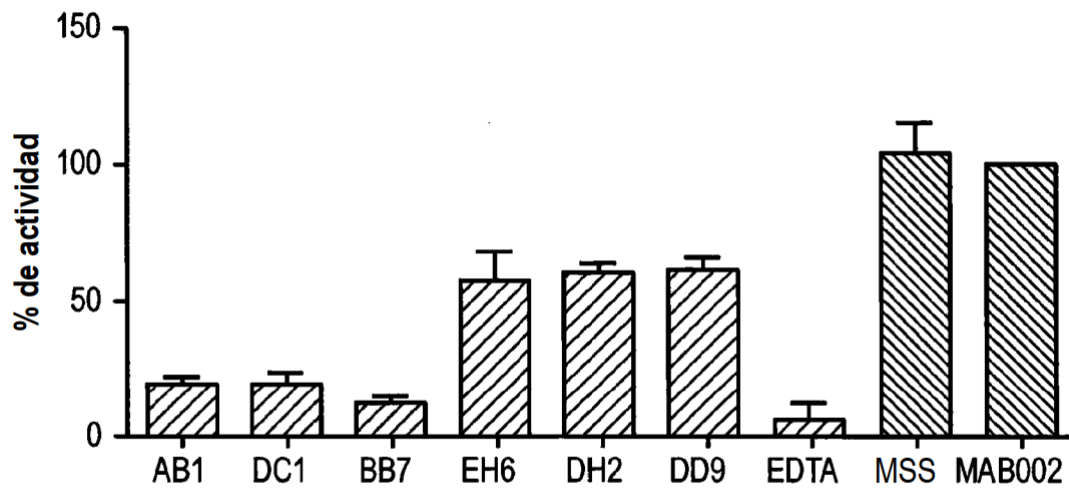
GACATCCAGATGACACAGACTCCATCTTCCATGTATGCATCTCTAGGAGAGAGAGTC
ACTATCACTTGCAAGGCGAGTCAGGACATTAATAGCTATTTAACCTGGTTCCAGCAG
AAACCAGGGAAATCTCCTAAGACCCTGATCTATCGTACAAATAGATTGTTTGATGGG
GTCCCATCCAGGTTCACTGGCAGTGGATCTGGGCAAGATTTTTTCTCACCATCAGC
AGCCTGGAATATGAAGATATGGGAATTTATTATTGTCTACAGTATGATGACTTTCCG
TACACGTTCCGAGGGGGGACCAAACCTGGAAATAAAA

AB1 VK

DIQMTQTPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLFDG
VPSRFSGSGSGQDFFLTISSLEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGKLEIK

FIG. 7

A: Inhibición de TG



B: Transferencia de Western

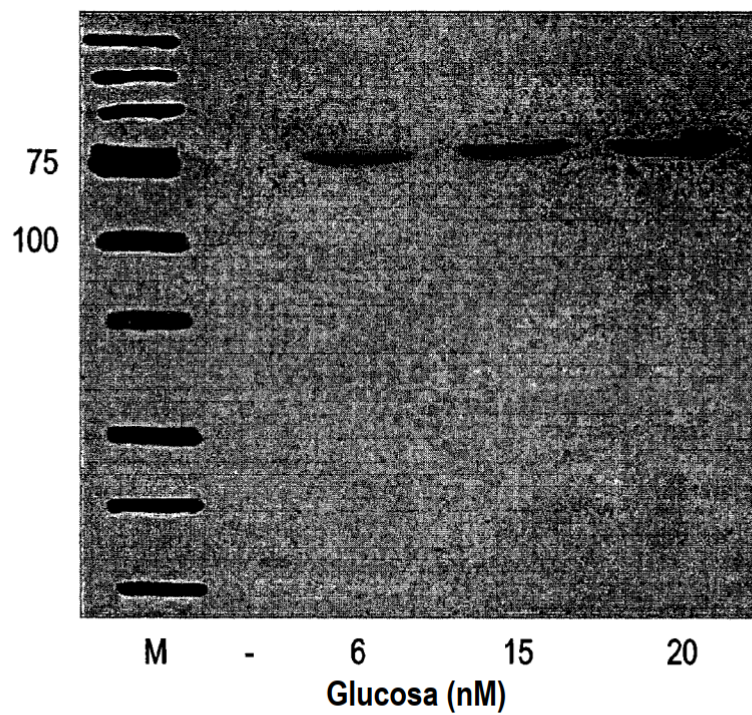
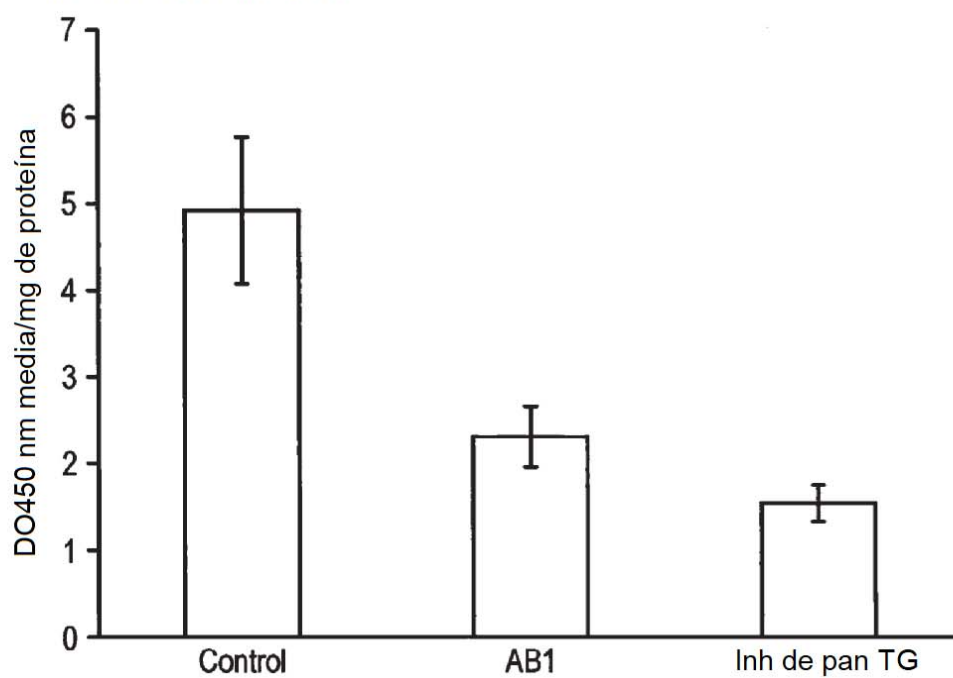
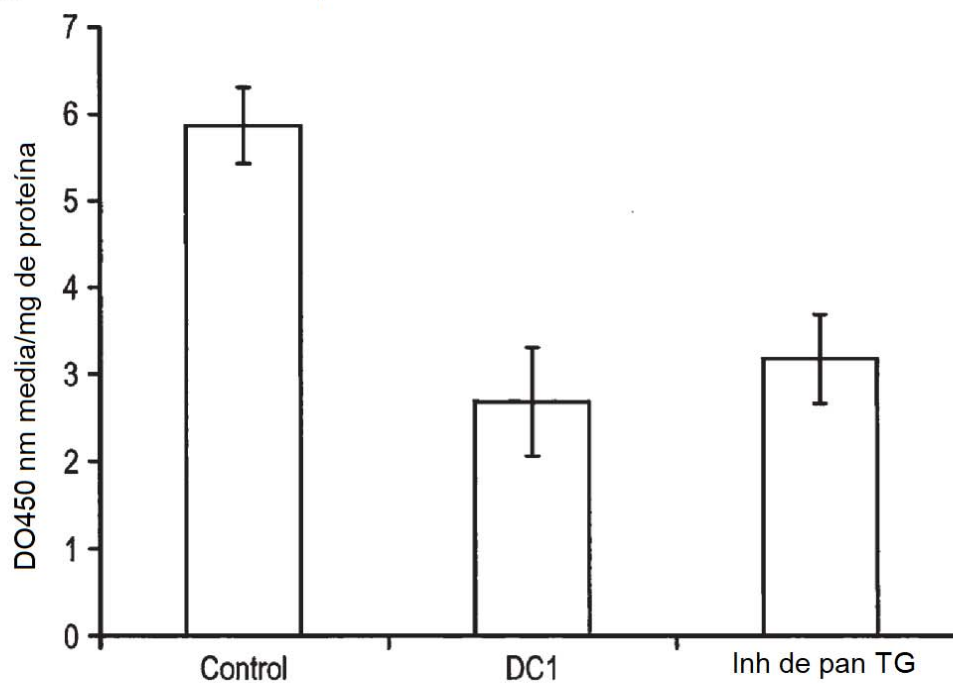


FIG. 8

	CI50 de hTG2 (mg/ml de IgG por ng de TG2)	CI50 de rTG2 (mg/ml de IgG por ng de TG2)	CI50 de mTG2 (mg/ml de IgG por ng de TG2)	Relación humano / rata	Relación de CI50 de hTG2 con respecto al mejor inhibidor humano	Relación de CI50 de rTG2 con respecto al mejor inhibidor humano
AB1	$1,09 \times 10^{-5}$	NI	NI	-	1	-
DC1	$1,23 \times 10^{-5}$	NI	NI	-	1,1	-
BB7	$1,59 \times 10^{-5}$	$3,2 \times 10^{-4}$	NI	20	1,47	29,4
AG9	$4,87 \times 10^{-5}$	NI	NI	-	4,47	-
DD9	$5,24 \times 10^{-5}$	$3,03 \times 10^{-4}$	NI	6	4,87	29,22
DH2	$6,7 \times 10^{-5}$	$2,23 \times 10^{-4}$	NI	-	6,2	38,13
EH6	$6,9 \times 10^{-5}$	$4,03 \times 10^{-4}$	NI	5,8	6,33	36,714
AH3	$7,8 \times 10^{-5}$	NI	NI	-	7,1	-
JE12	$12,3 \times 10^{-6}$	NI	NI	-	11,3	-

FIG. 9

A: Inhibición con anticuerpo AB1**B:** Inhibición con anticuerpo DC1**FIG. 10**

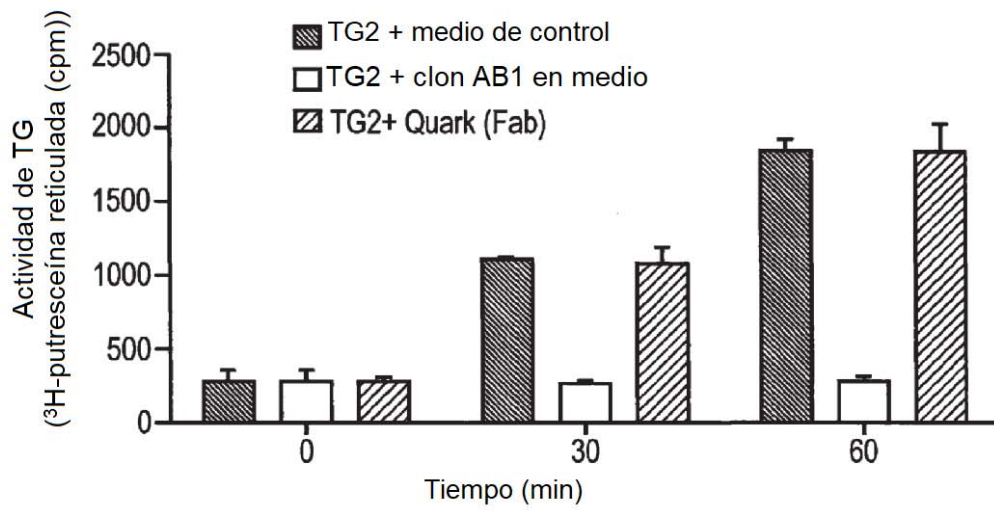


FIG. 11

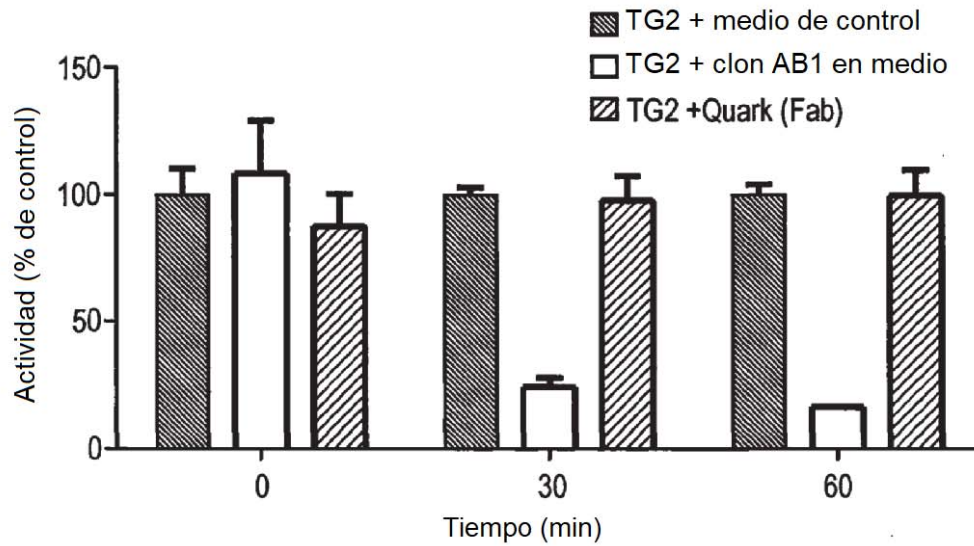


FIG. 12

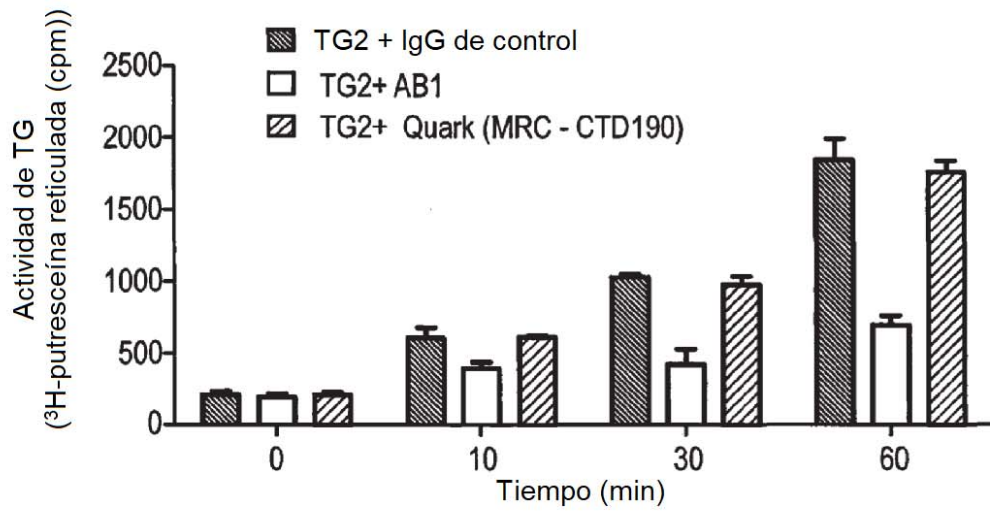


FIG. 13

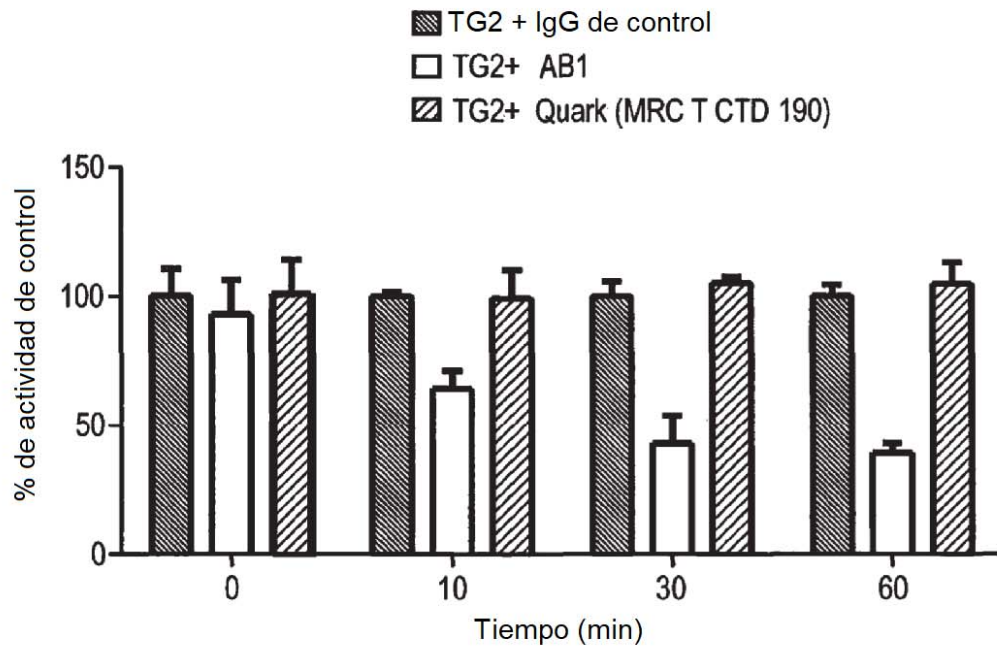


FIG. 14

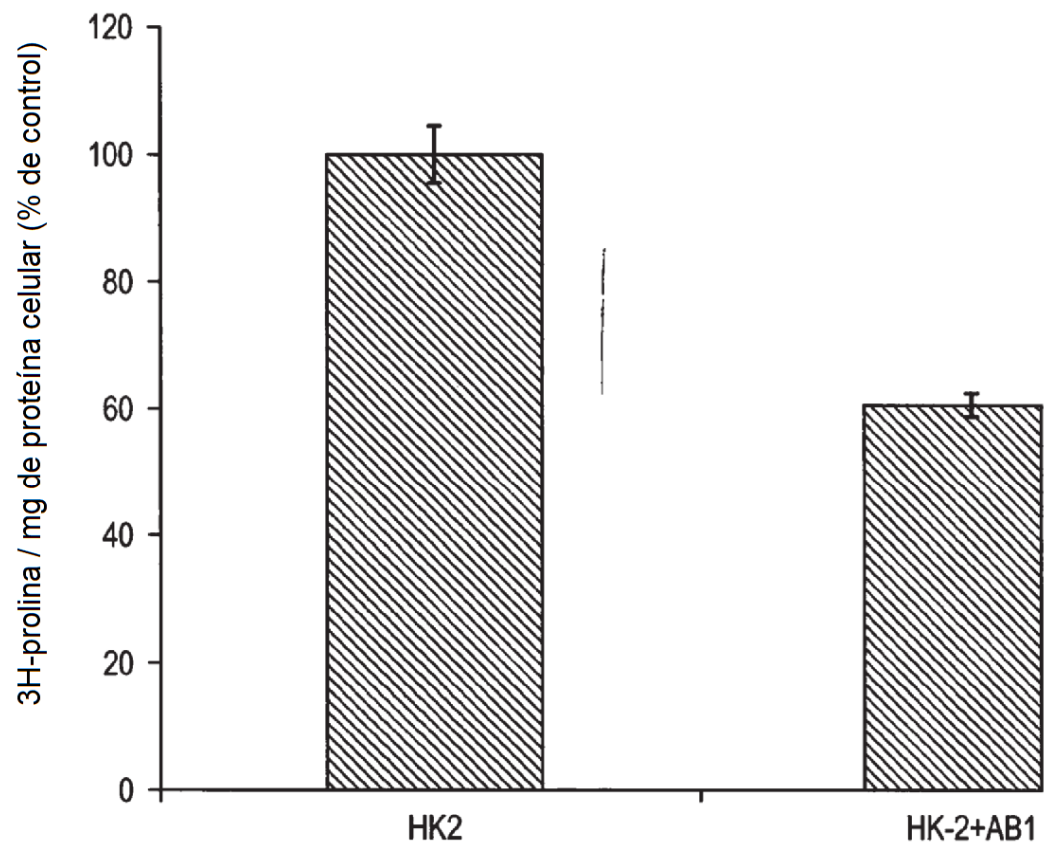
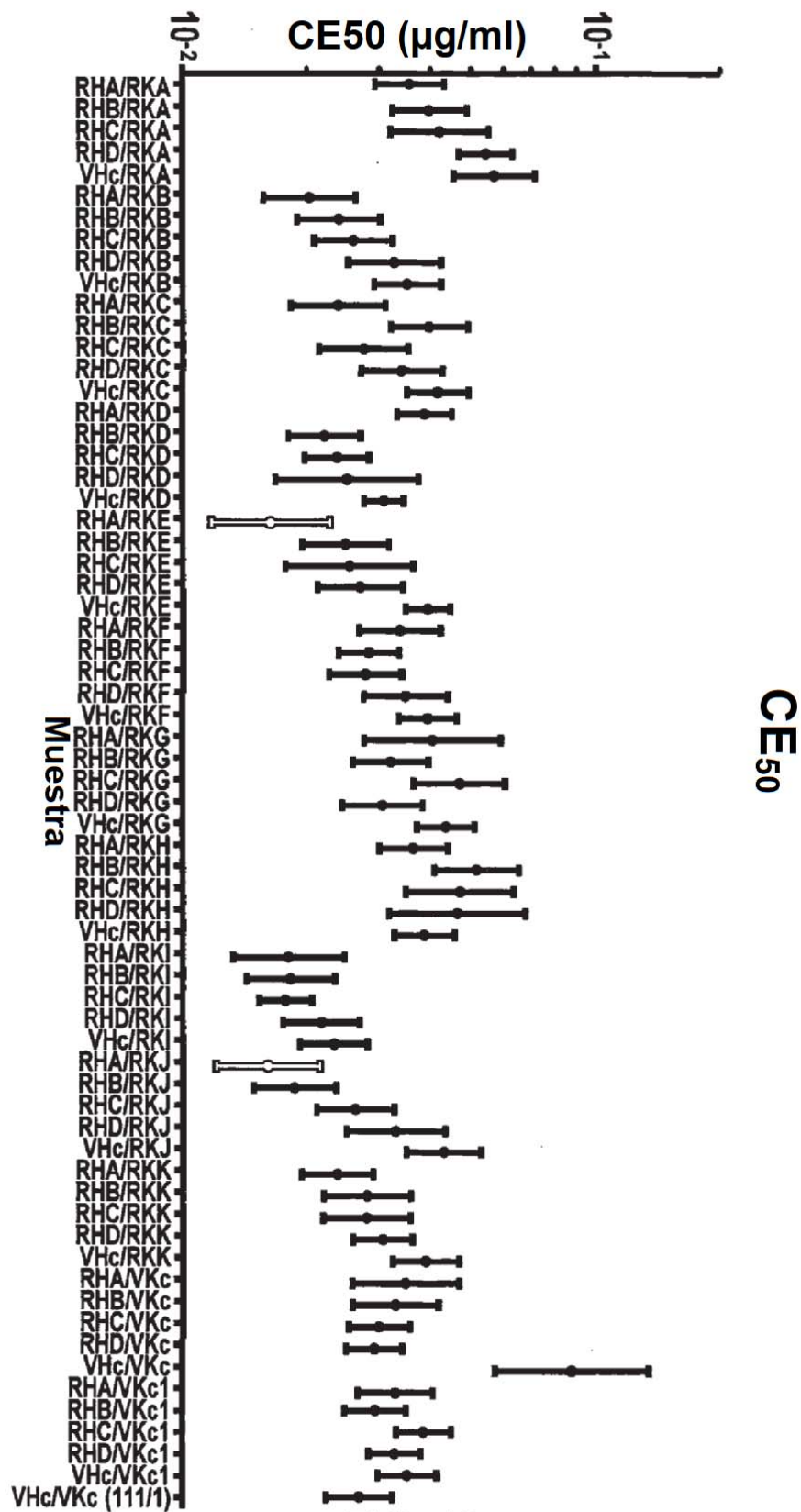


FIG. 15



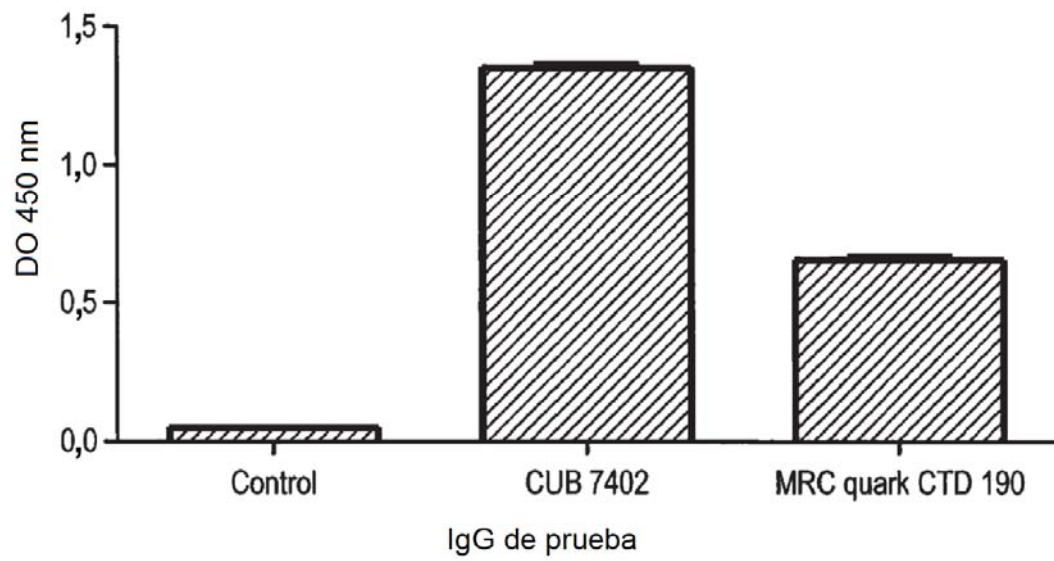


FIG. 17

Anticuerpo AB-1

AB1_VH

GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGGGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTC
CTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTCTCAGTTCCTCTGCCATGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCGG
ACAGGAGGCTGGAGTGGGTCGCAACCATTAGTGTTGGTGGTGGTAAAACCTACTATCCAGAC
AGTGTGAAGGGTCGCTTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACACCCTCTATCTGCAAAT
GAACAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCAAACTAATCAGTCTCTACT
GGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

AB1_VH

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTLSSSAMSWVRQTPDRRLEWVATISVGGGKTYYPD
SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRSED TAMYYCAKLISLYWGQGTTLTVSS

AB1_VK

GACATCAAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCATGTATGCATCTCTAGGAGAGAGAGTCACTAT
CACTTGCAAGGCGAGTCAGGACATTAATAGCTATTTAACCTGGTTCAGCAGAAACCAGGGA
AATCTCCTAAGACCCTGATCTATCGTACAAATAGATTGTTTGATGGGGTCCCATCCAGGTTT
AGTGGCAGTGGATCTGGGCAAGATTTTTTCTCACCATCAGCAGCCTGGAATATGAAGATAT
GGGAATTTATTATTGTCTACAGTATGATGACTTTCCGTACACGTTCCGAGGGGGGACCAAAC
TGGAATAAAA

AB1_VK

DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYRTNRLFDGVPSRF
SGSGSGQDFFLTISSELEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGTKLEIK

FIG. 18

Anticuerpo BB-7

BB7 VH

GCAGTGCAACTGGTAGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTC
CTGTGCAGCCTCTGGAATCATTTTCAGTTCCTCTGCCATGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCGG
AAAAGAGACTGGAGTGGGTCGCAACTATTAGTAGTGGTGGTCGTTCCACCTACTATCCAGAC
AGTGTGAAGGGTCGATTCACCGTCTCCAGAGACAGTGCCAAGAACACCCCTATACCTGCAAAT
GGACAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATTTATTACTGTGCAAACTAATCAGTCCCTACT
GGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

BB7 VH

AVQLVESGGGLVKGPGSLKLSCAASGIIFSSSAMSWSVRQTPEKRLEWVATISSGGRSTYYPD
SVKGRFTVSRDSAKNTLYLQMDSLRSEDTAIYYCAKLISPYWGQGTTLTVSS

BB7 VK

GCCATCAAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCATGTATGCATCTCTAGGAGAGAGAGTCATCAT
CACTTGCAAGGCGAGTCAGGACATAAATAGTTATTTAACCTGGTTCCAACAGAAACCAGGAA
AGTCTCCTAAGACCCCTGATCTATCTTACAAATAGATTGATGGATGGGGTCCCATCAAGGTTT
AGTGGCAGTGGATCTGGGCAAGAATTTTTACTCACCATCAGCGGCCTGGAACATGAAGATAT
GGGCATTTATTATTGTCTCCAGTATGTTGACTTTCCGTACACGTTCCGAGGGGGGACCAAGC
TGGAATAAAA

BB7 VK

AIKMTQSPSSMYASLGERVITCKASQDINSYLTWFQQKPGKSPKTLIYLTNRLMDGVPSRF
SGSGSGQEFLLTISGLEHEDMGIYYCLQYVDFPYTFGGGTKLEIK

FIG. 19

Anticuerpo DC-1

DC1_VH

GAAGTGCAGTTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTC
CTGTGCAGCCTCTGGATTCACTCTCAGTACCCATGCCATGTCTTGGGTTCCGCCAGACTCCGG
AGAAGAGGCTGGAGTGGGTGCGAACCATTAGTAGTGGTGGTCGTTCCACCTACTATCCAGAC
AGTGTGAAGGGTCGATTCACTATCTCCAGAGACAATGTCAAGAACACCCTATATCTGCAACT
GAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCGTGTATTTCTGTGCAAGACTAATCAGTACCTACT
GGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

DC1_VH

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTLSTHAMSQVRQTPEKRLEWVATISSGGRSTIYPD
SVKGRFTISRDNVKNTLYLQLSSLRSEDVAVYFCARLISTYWGQGTTLTVSS

DC1_VK

GACATCACGATGACCCAGTCTCCATCTTCCATATATGCATCTCTGGGAGAGAGAGTCACTAT
CACTTGCAAGGCGAGTCAGGACATTAATAGCTATTTAACCTGGTTCAGCAGAAACCAGGGA
AATCTCCTAAGATCCTGATCTATCTTGTAATAGATTGGTAGATGGGGTCCCATCAAGGTTT
AGTGGCAGTGGATCTGGGCAAGATTATGCTCTCACCATCAGCAGTCTGGAATATGAAGATAT
GGGAATTTATTATTGTCTACAATATGATGACTTTCCGTACACGTTCCGAGGGGGGACCAAGC
TGGAATAAAA

DC1_VK

DITMTQSPSSSIYASLGERVTITCKASQDINSYLTWFQKPGKSPKILIYLVNRLVDGVPSRF
SGSGSGQDYALTISSLEYEDMGIYYCLQYDDFPYTFGGGTKLEIK

FIG. 20

Anticuerpo JE-12

JE12_VH

GAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTC
CTGCAAGGCTTCTGGATACAGATTCACTAGCTATGTTATGCACTGGGTGAAACAGAAGTCTG
GGCAGGGCCTTGAGTGGATTGGATATATTAATCCTTACAATGATGGTGCTAAGTACAATGAG
AAGTTCAAAGGCAAGGCCACACTGACTTCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCT
CAGCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGACTATCTAGTGACTATT
GGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

JE12_VH

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYRFTSYVMHWVKQKSGQGLEWIGYINPYNDGAKYNE
KFKGKATLTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARLSSDYWGQGTTTLTVSS

JE12_VK

GATGTTTTGATGACCCAAAATCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCAT
CTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCATTGAACATATTAATGGAAACACCTATTTAGAATGGTACC
TGCAGAAACCAGGCCAGTCTCAAAGTTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGG
GTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAGGATCAGCAGAGT
GGAGGCTGAAGATCTGGGAATTTATTACTGCTTTCAAGGTTACATGTTCCGTTACGTTTCG
GAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA

JE12_VK

DVLMTQNPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIEHINGNTYLEWYLQKPGQSPKFLIYKVSNRFSG
VPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEAEDLGIYYCFQGSHVPFTFGGGTKLEIK

FIG. 21

Anticuerpo EH-6

EH6_VH

GAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTC
CTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCAGTAGTTATGTTATGCACTGGGTGAAGCAGAAGCCTG
GGCAGGGCCTTGAGTGGATTGGATTTATTAATCCTTACAATGATGGTACTAAGTACAATGAG
AAGTTCAAAGGCAAGGCCACACTGACCTCAGACAAAGCCTCCACCACAGCCTACATGGAGCT
CAGCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGATTCTCCTCTGGGTACT
GGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

EH6_VH

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQKPGQGLEWIGFINPYNDGTYNE
KFKGKATLTSDKASTTAYMELSSLTSEDSAVYYCARFSSGYWGQGTTLTVSS

EH6_VK

GATGTTTTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCAT
CTCTTGAGATCTAGTCAGAGTATTGTACATAGTAATGGAAACACCTATTTAGAATGGTACC
TGCAGAAACCAGGCCAGTCTCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAATCGATTTTCTGGG
GTCCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGT
GGGGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCCTTCAAGTTTCACATGTTCTTTACGTTTCG
GCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAAA

EH6_VK

DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSG
VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVAEDLGVYYCLQVSHVPFTFGSGTKLEIK

FIG. 22

Anticuerpo AG-9

AG9 VH

GAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGTTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTC
CTGCAGGGCTTCTGGATACACATTCACTACCTATGTTATTCAGTGGGTGAAGCAGAAGCCTG
GGCAGGGCCTTGAGTGGATTGGATATATTAATCCTTACAATGATGGTGCTAGGTACAATGAG
AAGTTCAAAGGCAAGGCCACACTGACTTCAGACAAATCCTCCACCACAGCCTACATGGAAGT
CAGCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGACTTTCTAGTGACTACT
GGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

AG9 VH

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCRASGYTFTTYVIHWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDGARYNE
KFKGKATLTSDKSSTTAYMELSSLTSEDSAVYYCARLSSDYWGQGTTTLTVSS

AG9 VK

GATGTTTTGATGACCCAAAATCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGCGATCAGGCCTCCAT
CTCTTGCAGATCTAGTCGGAGCATTGAACATAGTAATGGAAACACCTATTTGGAATGGTACC
TGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGTTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGG
GTCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAGGATCAGCAGTGT
GGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTTACATGTTCCGTTTACGTTTCG
GAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA

AG9 VK

DVLMTQNPLSLPVSLGDQASISCRSSRSIEHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKFLIYKVSNRFSG
VPDRFSGSGSGTDFTLRISSEVAEDLGVIYCFQGSHVPFTFGGGTKLEIK

FIG. 23

Anticuerpo AH-3

AH3_VH

GAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTC
CTGCAGGGCTTCTGGATACACATTCACCTACCTATGTTATTCAGTGGGTGAAGCAGAAGCCTG
GGCAGGGCCTTGAGTGGATTGGATATATTAATCCTTACAATGATGGTGCTAGGTACAATGAG
AAGTTCAAAGGCAAGGCCACACTGACTTCAGACAAATCCTCCACCACAGCCTACATGGAAGT
CAGCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGACTATCTAGTGACTACT
GGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

AH3_VH

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCRASGYTFTTYVIHWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDGARYNE
KFKGKATLTSDKSSTTAYMELSSLTSEDSAVYYCARLSSDYWGQGTTLTVSS

AH3_VK

GATGTTTTGATGACCCAAAATCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAGGCCTCCAT
CTCTTGAGATCTAGTCGGAGCATTGAACATAGTAATGGAAACACCTATTTGGAATGGTACC
TGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGTTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGG
GTCCAGACAGGTTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAGGATCAGCAGTGT
GGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTTACATGTTCCGTTTACGTTTCG
GAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA

AH3_VK

DVLMNTQNPLSLPVSLGDQASISCRSSRSIEHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKFLIYKVSNRFSG
VPDRFSGSGSGTDFTLRISSEAEADLGVIYCFQGSHVPFTFGGGTKLEIK

FIG. 24

Anticuerpo DD-9

DD9_VH

CAGGTTACTCTGAAAGAGTCTGGCCCTGGGATATTGCAGCCCTCCCAGACCCCTCAGTCTGAC
TTGTTCTTTTTCTGGGTTTTCTACTGAGCACTTCGGGTATGGGTGTGAGTTGGATTCGTCAGT
CCTCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGCACACATTTACTGGGATGATGACAAGCGCTATAAC
CCATCCCTGAAGAGCCGGATCACAATCTCCAAGGATTCCTCAAGCAACCAGGTATTCCTCAA
GATCACCAGTGTGGACACTGCAGATACTGCCACATATTACTGTGCTCGAAGTTGGACTACGG
CCCCGTTTGCTTTCTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

DD9_VH

QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQSSGKGLEWLAHIYWDDDKRYN
PSLKSRLITISKDSSSNQVFLKITSVDTADTATYYCARSWTTAPFAFWGQGLVTVSA

DD9_VK

CAAATTGTTCTCAGGAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCAT
GACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAGATTACATGTACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGATCCT
CCCCAGACTCCTGATTTATGACACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGTTCGCTTCAGT
GGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCCGAATGGGGGCTGAAGATGCTGC
CACTTATTACTGCCAACAGTGGAATAGTTCCCCGCTCACGTTCCGGTGCTGGGACCAAGCTGG
AGCTGAAA

DD9_VK

QIVLTQSPAISASPGKVTMTCSASSSVDMYQYQKPGSSPRLLIYDTSNLASGVPVRFES
GSGSGTSYSLTISRMAEDAATYYCQWNSSPLTFGAGTKLELK

FIG. 25

Anticuerpo DH-2

DH2_VH

CAGGTTACTCTGAAAGAGTCTGGCCCTGGGATATTGCAGCCCTCCCAGACCCTCAGTCTGAC
TTGTTCTTTCTCTGGGTTTTCACTGAGCACTTCTGGTATGGGTGTGAGCTGGATTTCGTCAGC
CTTCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGCACACATTTACTGGGATGATGACAAGCGCTATAAC
CCATCCCTGAAGAGCCGGCTCACAATCTCCAAGGATACCTCCAGCAACCAGGTATTCCTCAA
GATCACCAGTGTGGACACTGCAGATACTGCCACATACTACTGTGCTCGAAGTGGGACTACGG
CCCCGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

DH2_VH

QVTLKESGPGILQPSQTLSTLCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQPSGKGLEWLAHIYWDDDKRYN
PSLKSRLTISKDTSSNQVFLKITSVDTADTATYYCARSGTTAPFAYWGQGLTVSA

DH2_VK

CAAATTGTTCTCACTCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCAT
GACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGTACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGATCCT
CCCCCAGACTCCTGATTTATGACACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGTTTCGCTTCAGT
GGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCCGAATGGAGGCTGAAGATGCTGC
CACTTTTTTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTTCCCCGCTCACGTTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGG
AGCTGAAA

DH2_VK

QIVLTQSPAIMASAPGEKVTMTCSASSSVSYMYWYQQKPGSSPRLLIYDTSNLASGVPVRF
SGSGTSYSLTISRMEAEDAATFYCQWSSSPLTFGAGTKLELK

FIG. 26

Anticuerpo DD-6

DD6_VH

GAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGGCCTGAACTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTC
CTGCAAGGCTTCTGGATACAGATTCAGTACTACAACATGCACTGGGTGAAGCAGAACCTTG
GAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGATATATTAACCCTAAAAATGGTGTATTTACTACAACCAG
AAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACAGTGAACAGGTCTCCAACACAGCCTACATGGAGAT
CCGCAGCCTGACATCGGAAGATTCTGCAGTCTATTACTGTGCAACAGCTCTGACTTACTGGG
GACAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

DD6_VH

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYRFTDYNMHVVKQNLGKSLEWIGYINPKNGVIYYNQ
KFKGKATLTVNRSSNTAYMEIRSLTSEDSAVYYCATALTYWGQGLVTVSA

DD6_VL

CAGGCTGTTGTGACTCAGGAATCTGCACTCACCACATCACCTGGTGAAACAGTCACACTCAC
TTGTGCTCAAGTACTGGGGCTGTTGCAGCTAATAACTATGCCAACTGGATCCAAGAAAAAC
CAGATCATTATTTACTGCTGTGATAGCTGGTACCAACAAGCGAGCTCCAGGTGTTCTGCC
AGATTCTCAGGCTCCCTGATAGGAGACAAGGCTGCCCTCACCATCACAGGGGCACAGACTGA
GGATGAGGCAATATATTTCTGTGCTCTATGGTACAGCAACTATTGGGTGTTCCGGTGGAGGAA
CCAAAGTGACTGTCCTAGGC

DD6_VL

QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVAANNYANWIEKPDHLFTGLIAGTNKRAPGVPA
RFSGLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNYWVFGGGTKVTVLG

FIG. 27

Anticuerpo IA-12

IA12_VH

CAGATCCAGTTGGTACAGTCTGGACCTGAGCTGAAGAAGCCTGGAGAGACAGTCAAGATCTC
CTGCAAGGCTTCTGGGTATACCTTCACAACCTATGGAATGACCTGGGTGAAACAGGCTCCAG
GAAAGGGTTTAAAGTGGATGGGCTGGATAAACACCTCCTCTGGAGTGCCAACATATGCTGAT
GACTTCAAGGGACGGTTTGCCTTCTCTTTGGAAACCTCTGCCAGCACTGCCTATTTGCAGAT
CAACAACCTCAAAAGTGAGGACACGGCTACATATTTCTGTGCAAGACCGGAAGTTGCTTACT
GGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

IA12_VH

QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYFTTTYGMTWVKQAPGKGLKWMGWINTSSGVPTYAD
DFKGRFAFSLETSASTAYLQINNLKSEDATYFCARPEVAYWGQGTLLVTVSA

IA12_VK

GATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTCACTTTGTCTGGTTACCTTTGGACAACCAGCCTCTAT
CTCTTGCAAGTCAAGTCAAGTCAAGAGCCTCTTATATGATAATGGAAAGACTTATTTGCATTGGTTAT
TTCAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAGGCGCCTAATCTATCTGGTGTCTAAACTGGACTCTGGA
GTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGAACAGATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGT
GGAGGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTACTGCGTGCAAGGTACACATTTTCCGTACACGTTCTG
GAGGGGGGACCAAACCTGGAAATAAAA

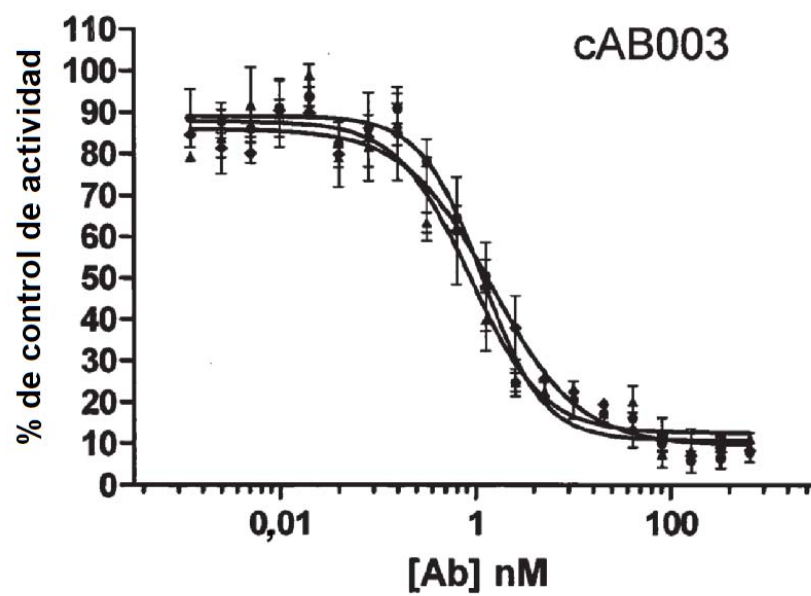
IA12_VK

DVVMTQTPLTSLVTFGQPASISCKSSQSLLYDNGKTYLHWLFQRPQGSPRRLIYLVSKLDSG
VPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVIYCVQGTHTFPYTFGGGTKLEIK

FIG. 28

A

	CI50 nM (DE)
cAB003	1,172 (0,297)



B

	CI50 nM (DE)
cBB001	0,925 (0,228)

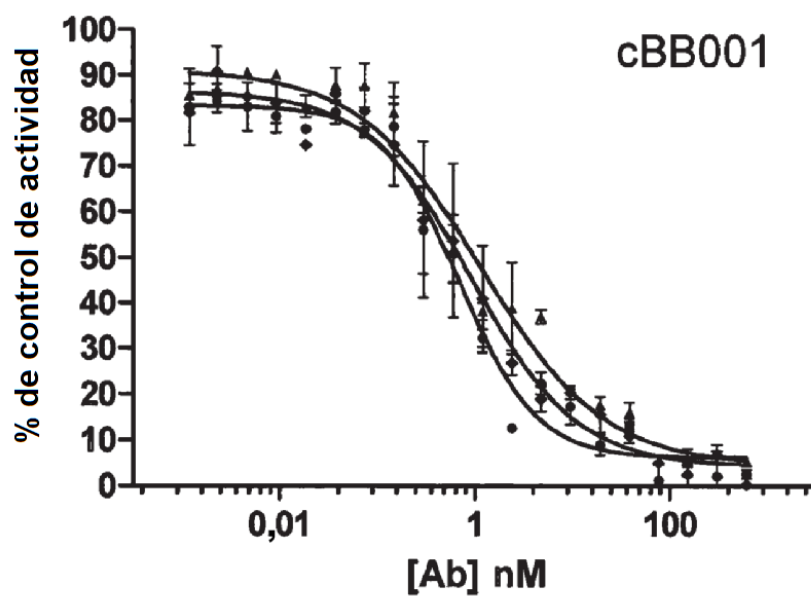
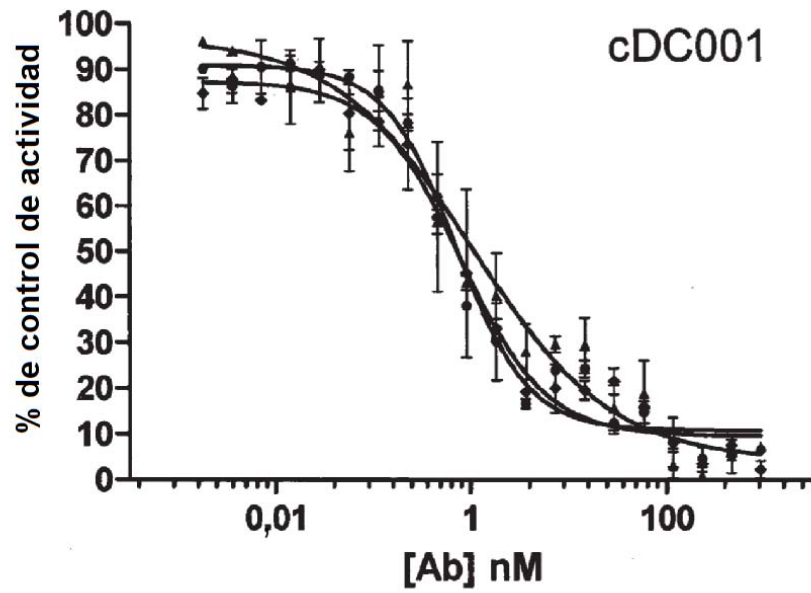


FIG. 29

C

	CI50 nM (DE)
cDC001	0,851 (0,177)



D

	CI50 nM (DE)
cDD9001	172,033 (23,353)

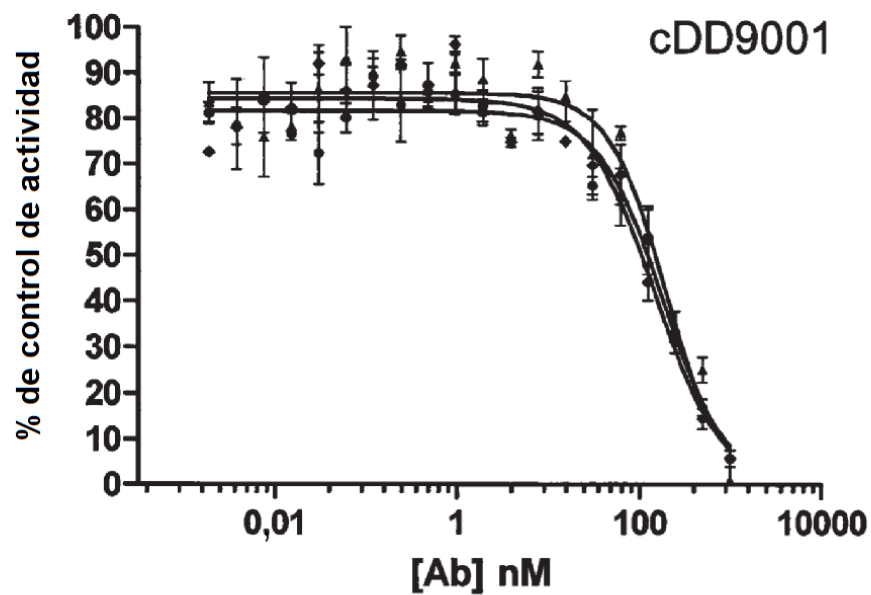
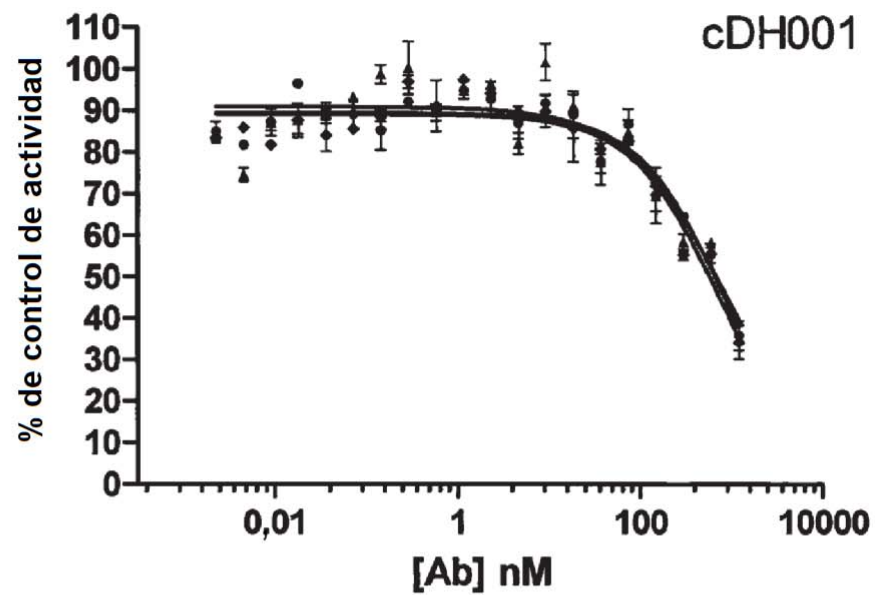


FIG. 29 (continuación)

E

	CI50 nM (DE)
cDH001	829,233 (59,923)



F

	CI50 nM
CUB7402	>100

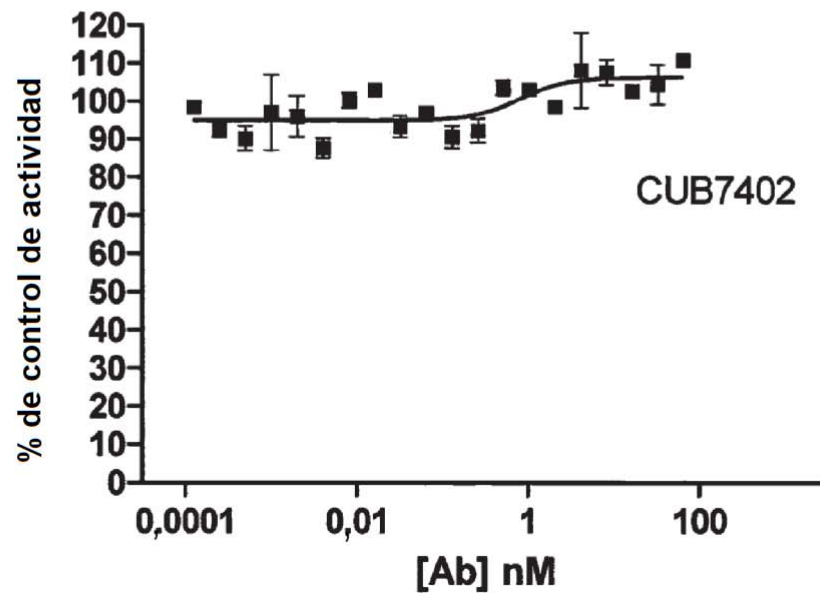
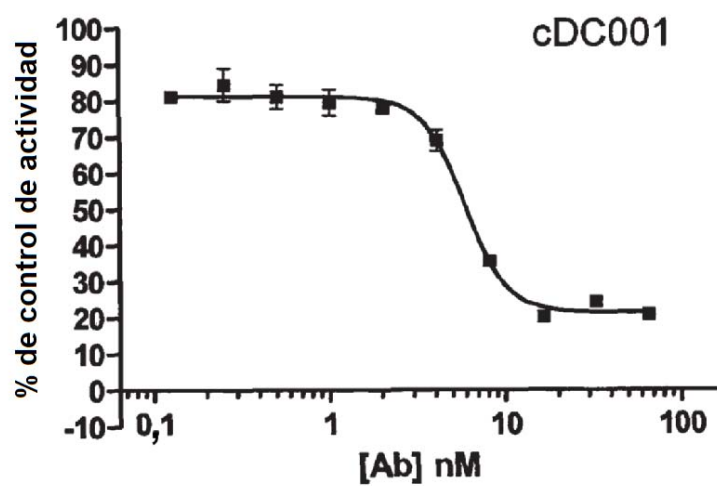


FIG. 29 (continuación)

A

	CI50 nM
cDC001	5,862



B

	CI50 nM
CUB7402	>100

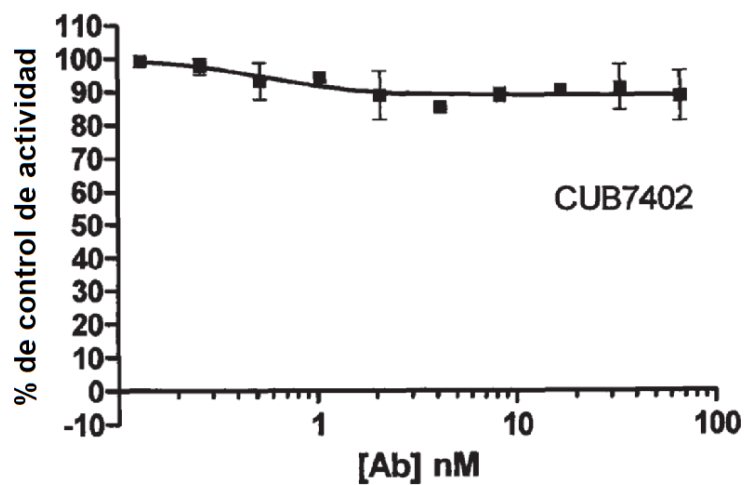


FIG. 30

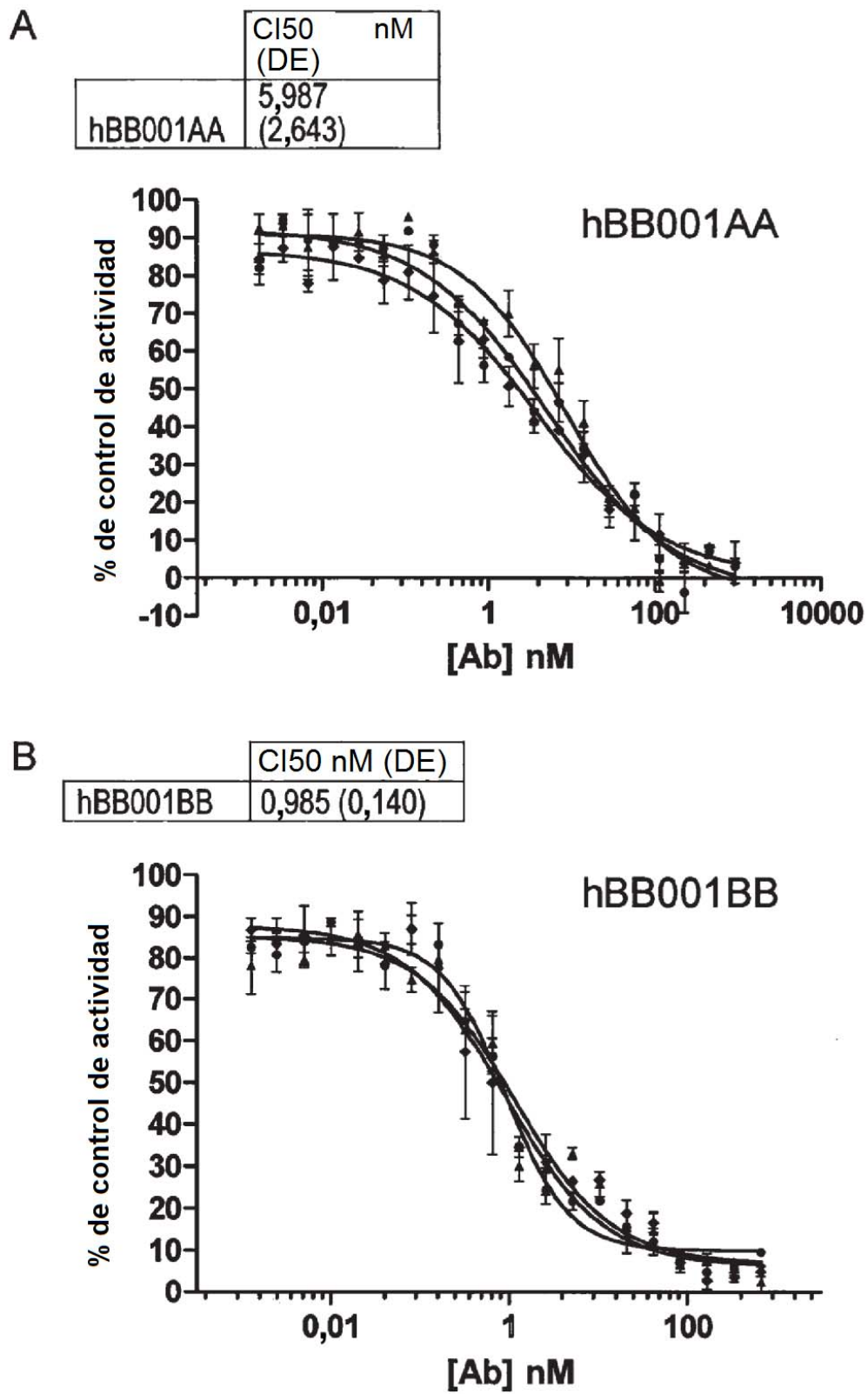
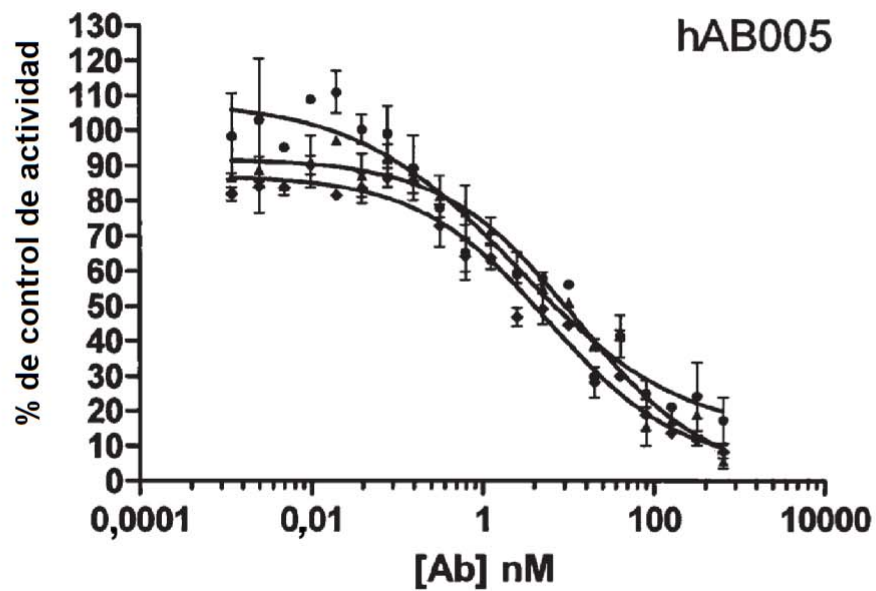


FIG. 31

C

	CI50 nM (DE)	
hAB005	6,868 (4,895)	Se muestran 2 lotes



D

	CI50 nM (DE)	
hAB004	3,854 (0,886)	

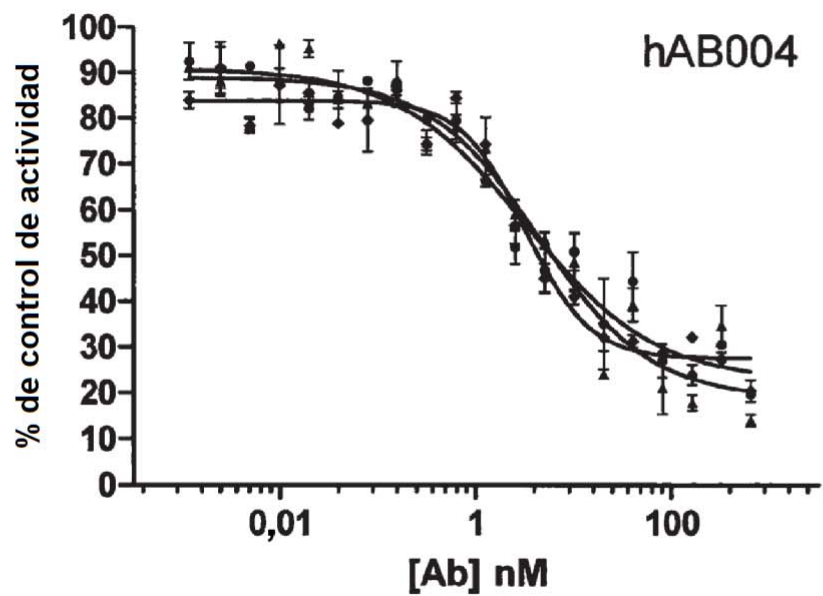


FIG. 31 (continuación)

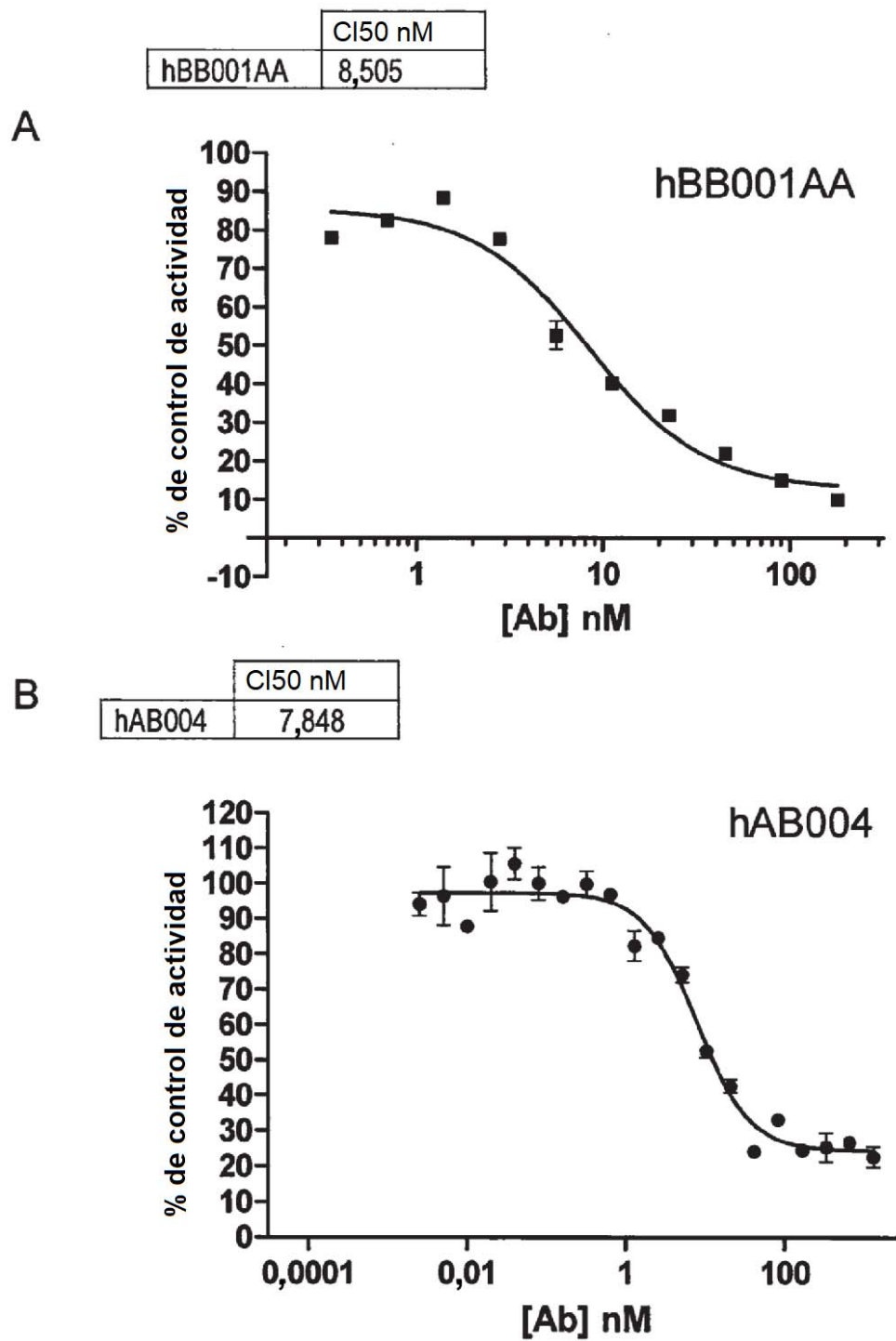
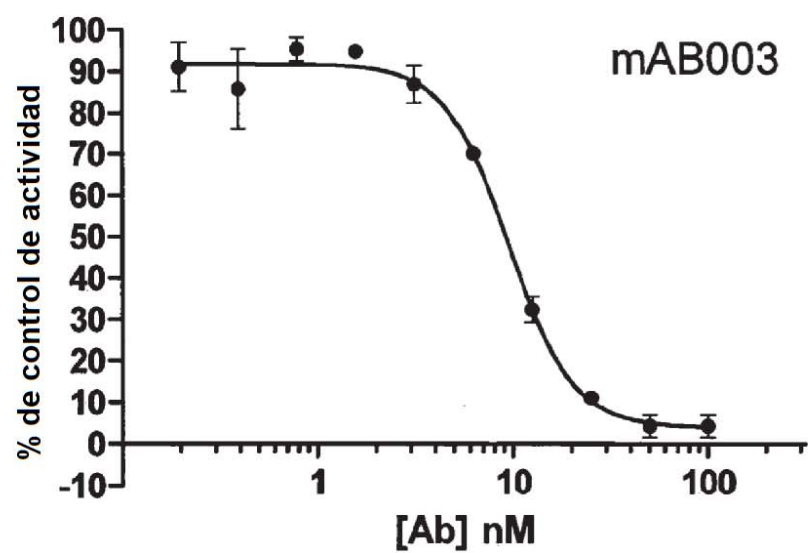


FIG. 32

A

	CE50 nM
mAB003	9,501



B

	CE50 nM
mBB001	0,752

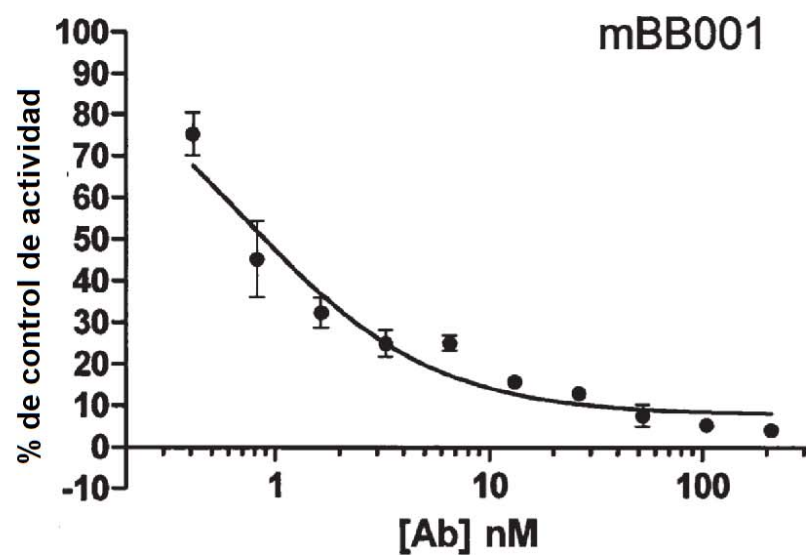
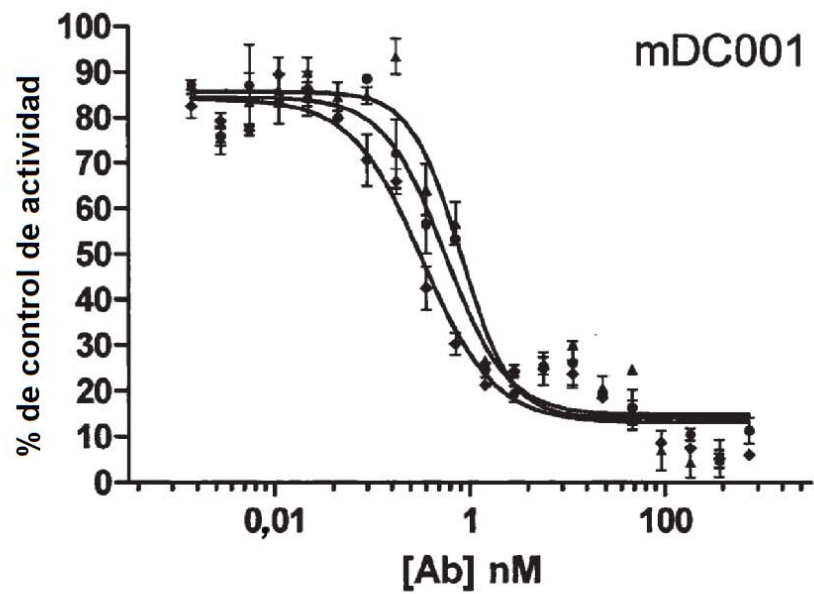


FIG. 33

C

	CE50 (DE)	nM
mDC001	0,5712 (0,2409)	



D

	CE50 nM (DE)
mDD9001	564,233 (83,996)

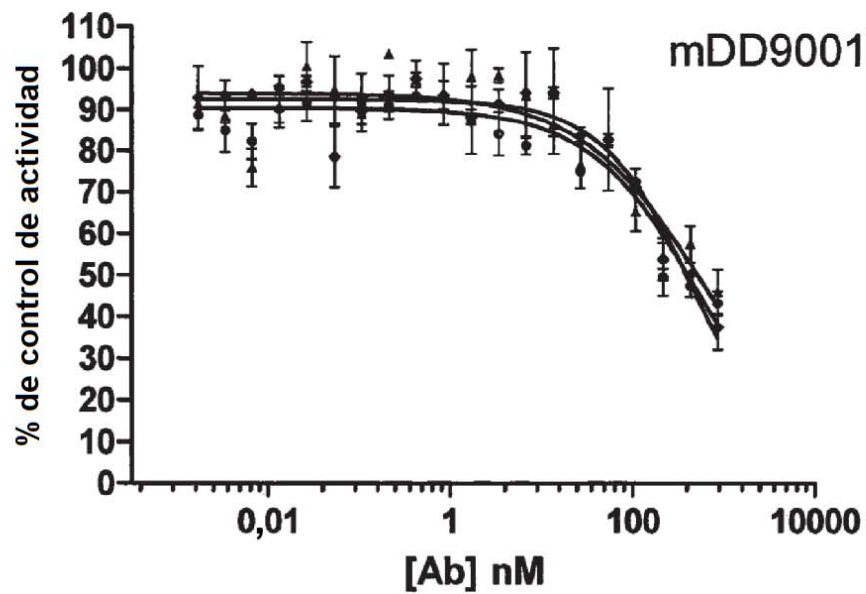
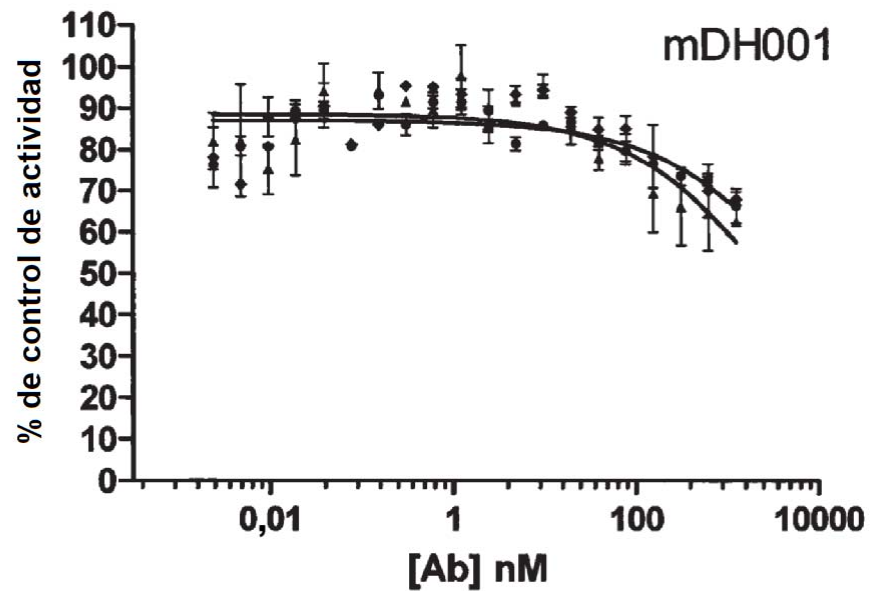


FIG. 33 (continuación)

E

	CE50 (DE)	nM
mDH001	~7000	



F

	CE50 nM (DE)
mDD6001	43,196 (10,948)

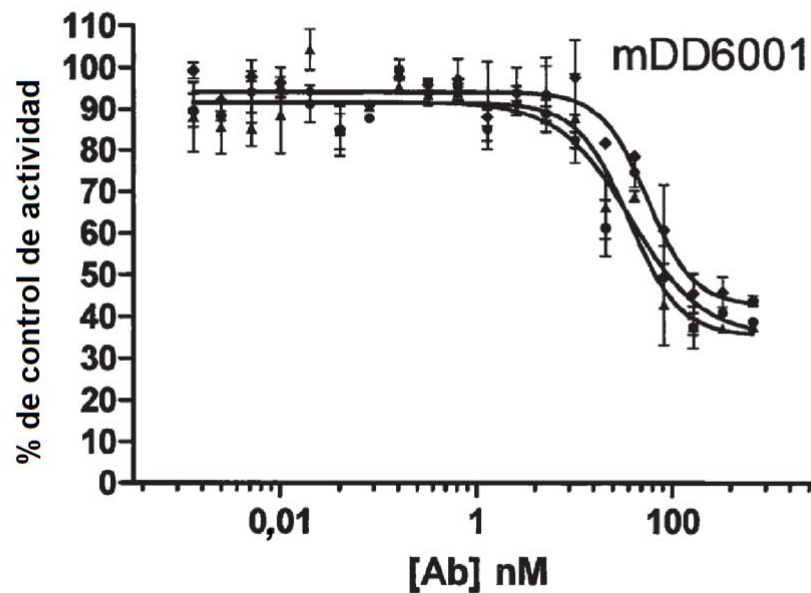


FIG. 33 (continuación)

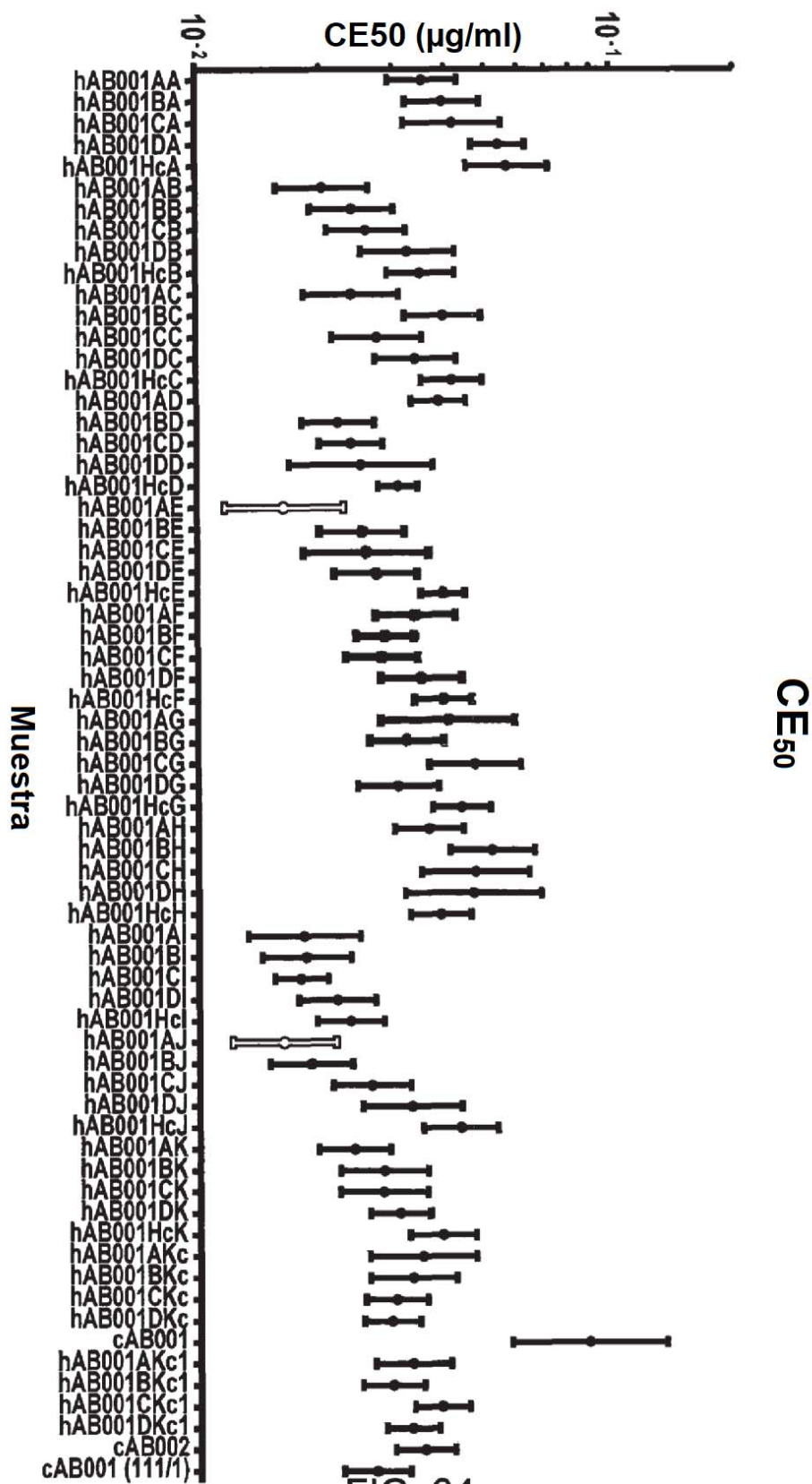


FIG. 34

A

	CUB7402	CDD9001	CDH001	CDC001
CE50 (nM)	0,3804	0,2099	0,3401	0,4418
r2	0,9991	0,998	0,9968	0,9985
CE50 (intervalo de confianza de 95 %)	0,3291 a 0,4396	0,1860 a 0,2368	0,2890 a 0,4002	0,3927 a 0,4971

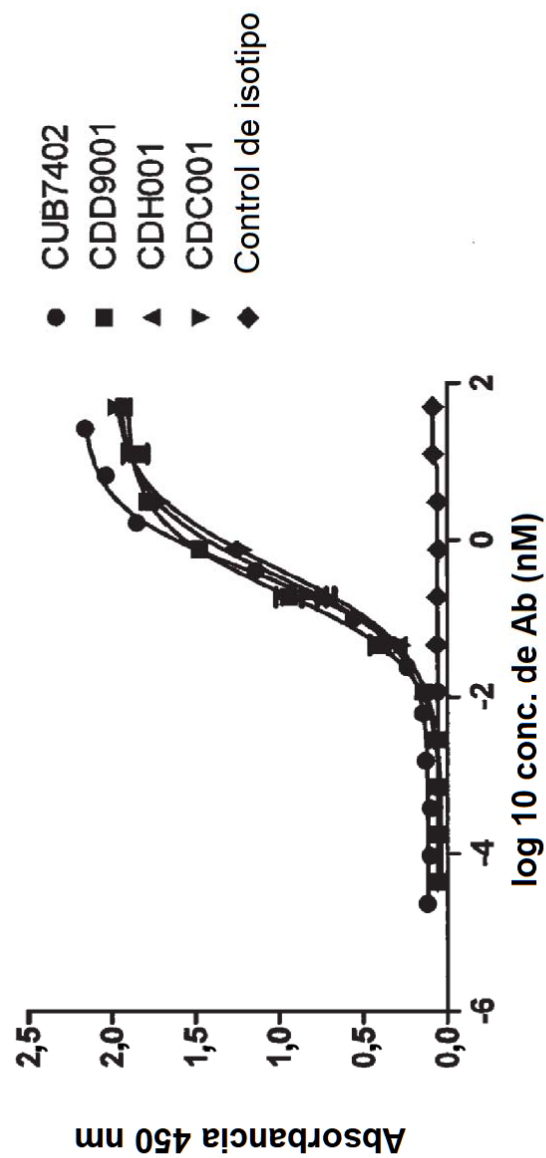
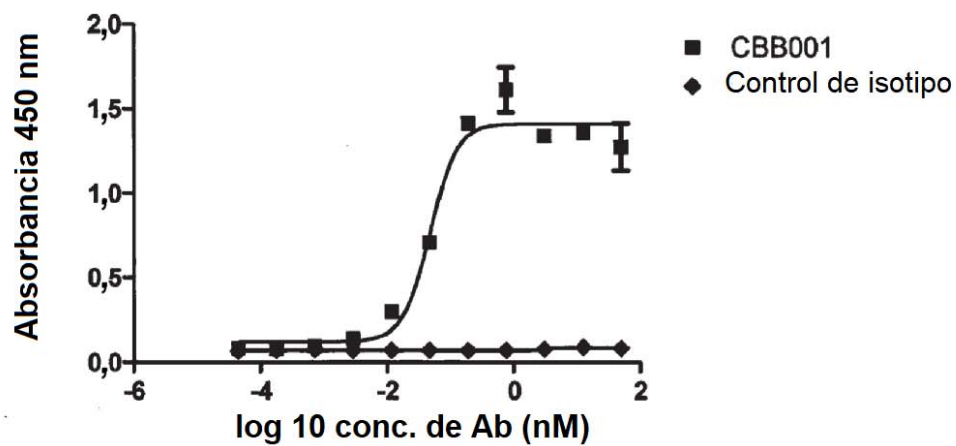


FIG. 35

B

	CBB001
CE50 (nM)	0,04811
r ²	0,9682
CE50 (intervalo de confianza de 95 %)	0,03611 a 0,06410

**C**

	CAB003
CE50 (nM)	0,06141
r ²	0,9568
CE50 (intervalo de confianza de 95 %)	0,03066 a 0,1230

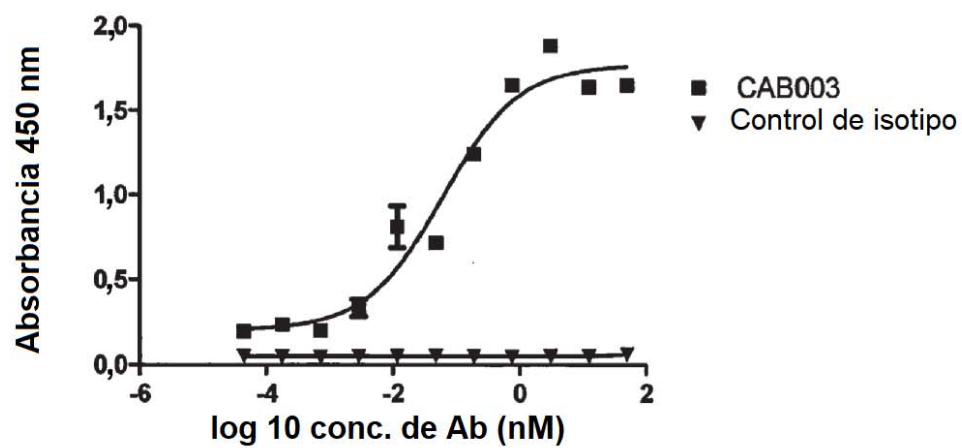
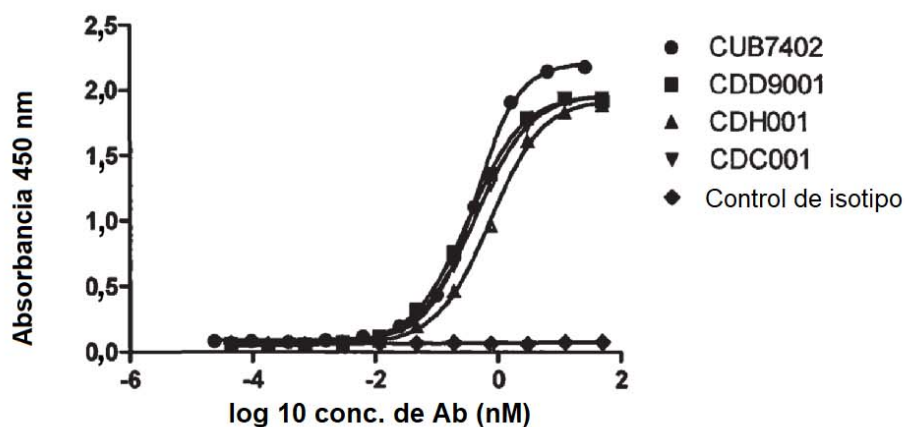


FIG. 35 (continuación)

A

	CUB7402	CDD9001	CDH001	CDC001
CE50 (nM)	0,4161	0,3279	0,7385	0,4177
r2	0,9994	0,9992	0,9986	0,9993
CE50 (intervalo de confianza de 95 %)	0,3762 a 0,4603	0,3040 a 0,3536	0,6682 a 0,8162	0,3887 a 0,4489



B

	CBB001
CE50 (nM)	0,05166
r2	0,9383
CE50 (intervalo de confianza de 95 %)	0,03303 a 0,08079

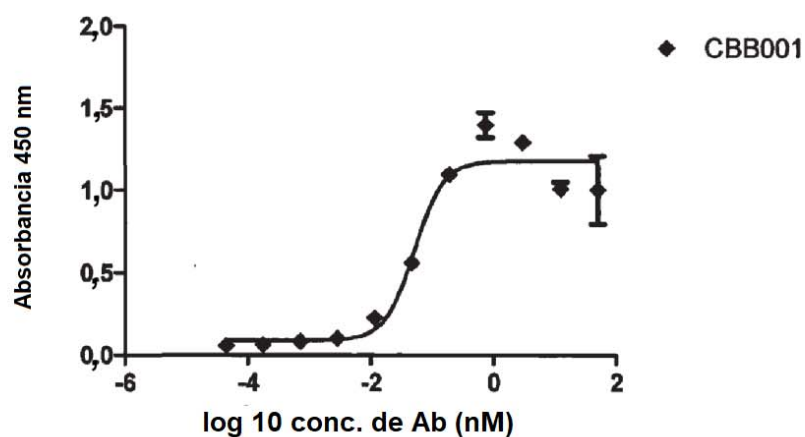


FIG. 36

C

	CAB003
CE50 (nM)	0,05682
r ²	0,9837
CE50 (intervalo de confianza de 95 %)	0,04054 a 0,07966

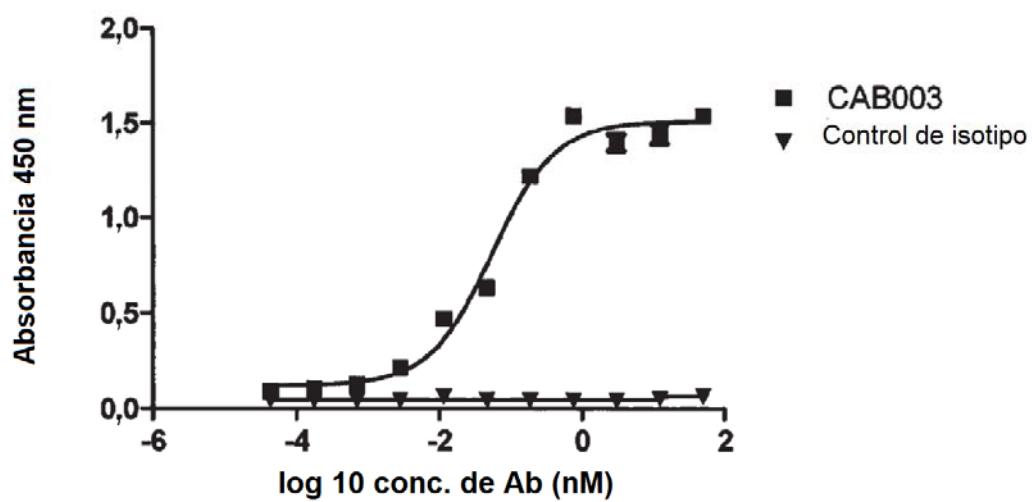
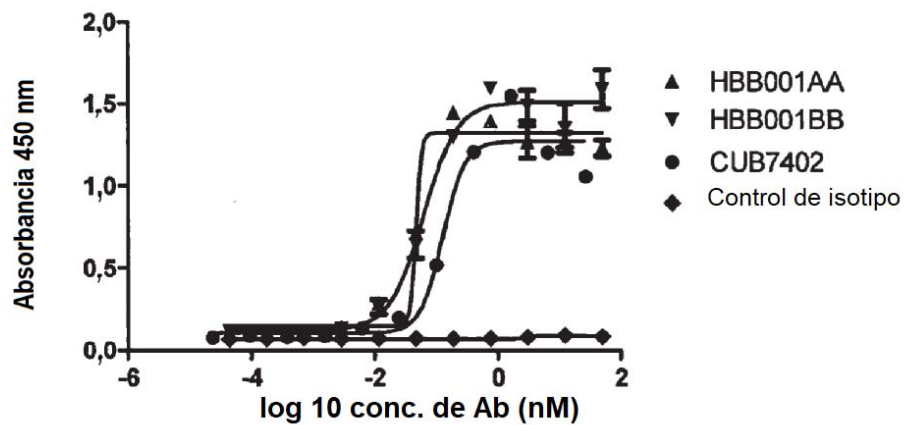


FIG. 36 continuación

A

	CUB7402	HBB001AA	HBB001BB
CE50 (nM)	0,1277	~0,04739	0,06274
r ²	0,9588	0,9792	0,9771
CE50 (intervalo de confianza de 95 %)	0,06801 a 0,2396	ND	0,04636 a 0,08491



B

	HAB004
CE50 (nM)	0,02001
r ²	0,9794
CE50 (intervalo de confianza de 95 %)	0,01199 a 0,03342

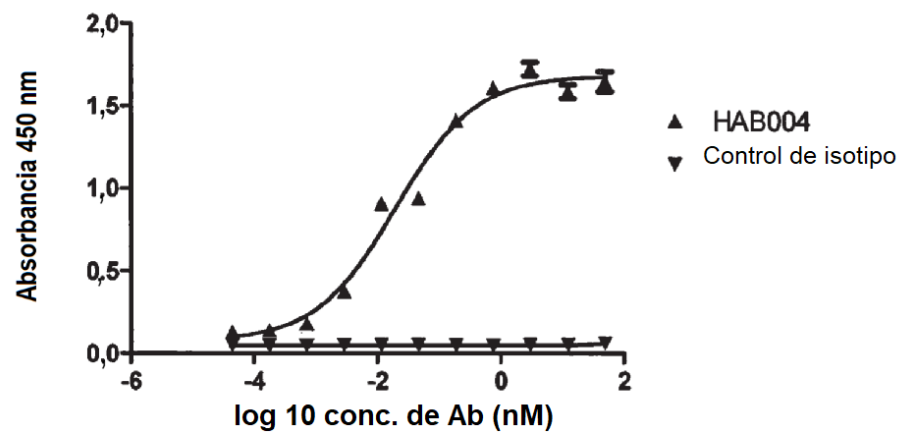
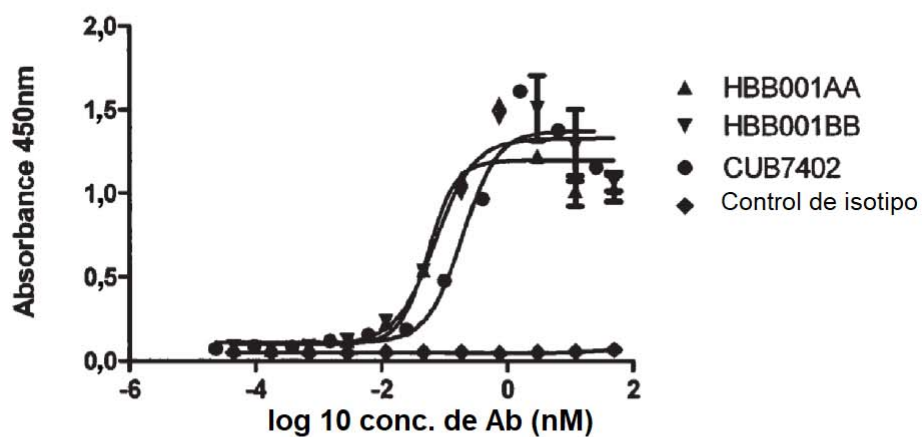


FIG. 37

A

	CUB7402	HBB001AA	HBB001BB
CE50 (nM)	0,1982	0,0561	0,07377
r ²	0,9586	0,9329	0,9361
CE50 (intervalo de confianza de 95 %)	0,09303 a 0,4223	0,03522 a 0,08934	0,04198 a 0,1296



B

	HAB004
CE50 (nM)	0,06117
r ²	0,9766
CE50 (intervalo de confianza de 95 %)	0,04047 a 0,09246

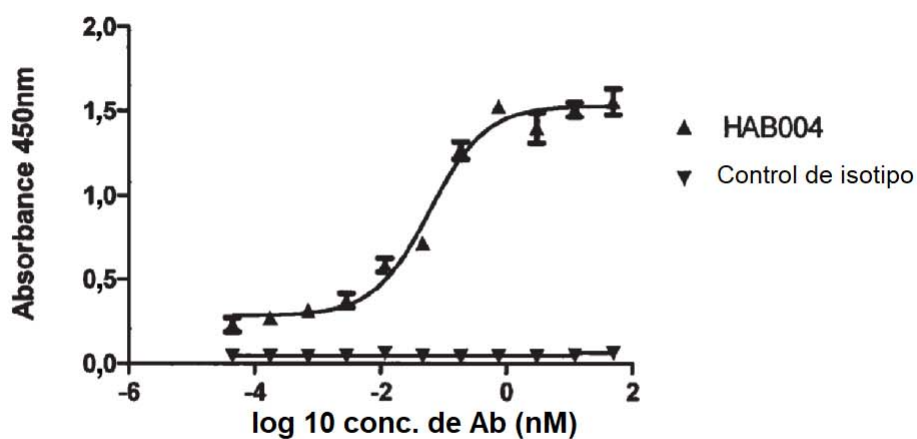


FIG. 38

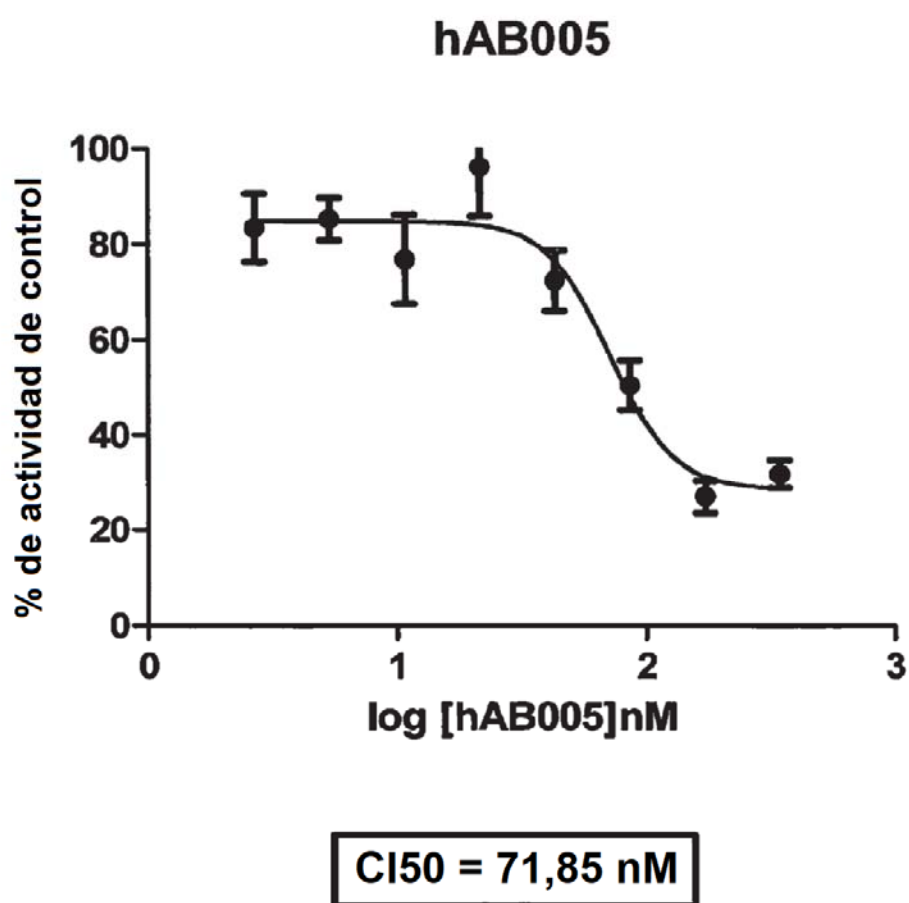


FIG. 39

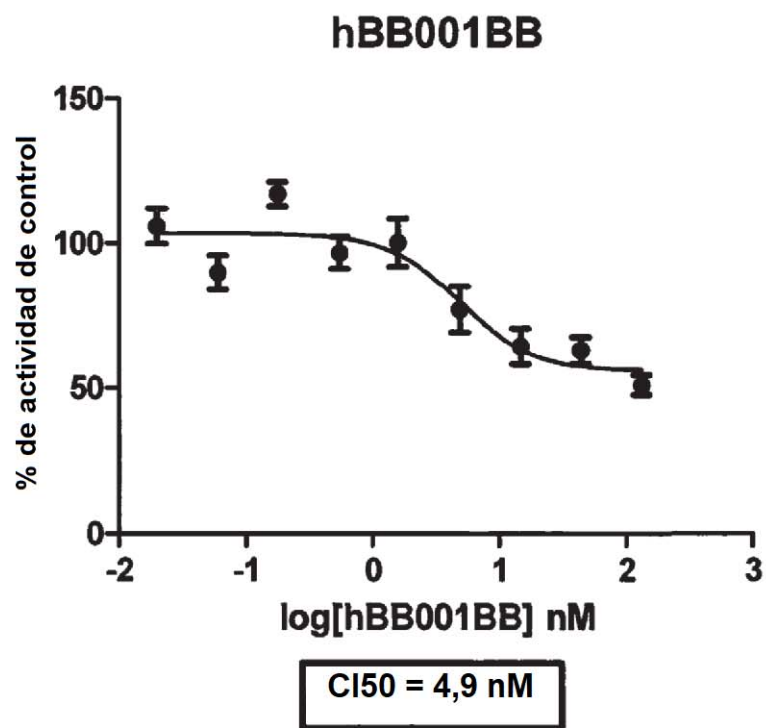
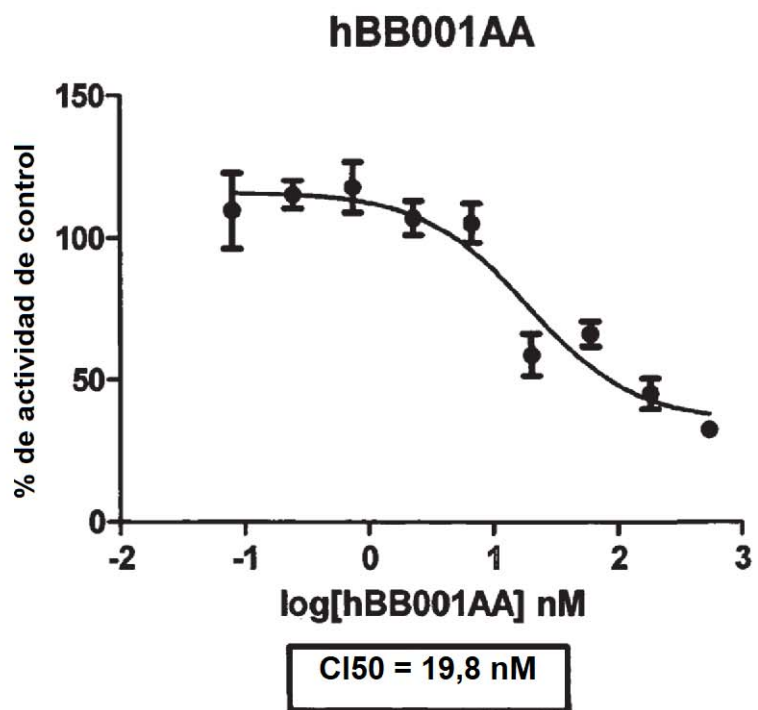


FIG. 40

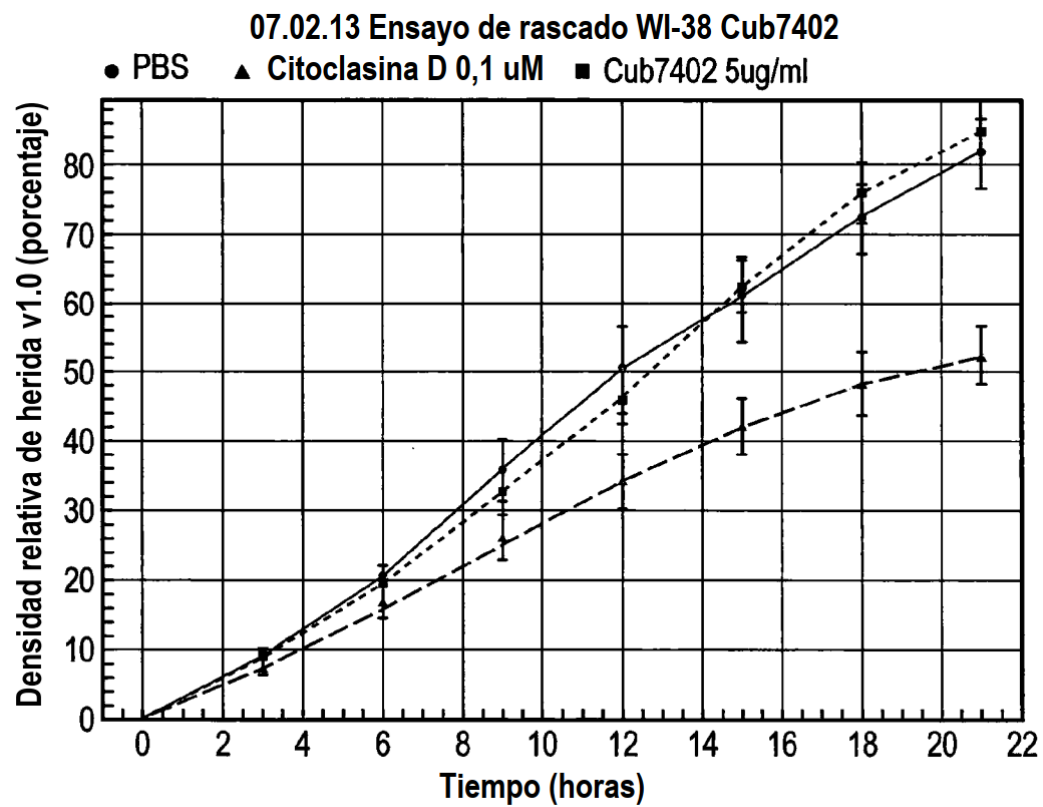
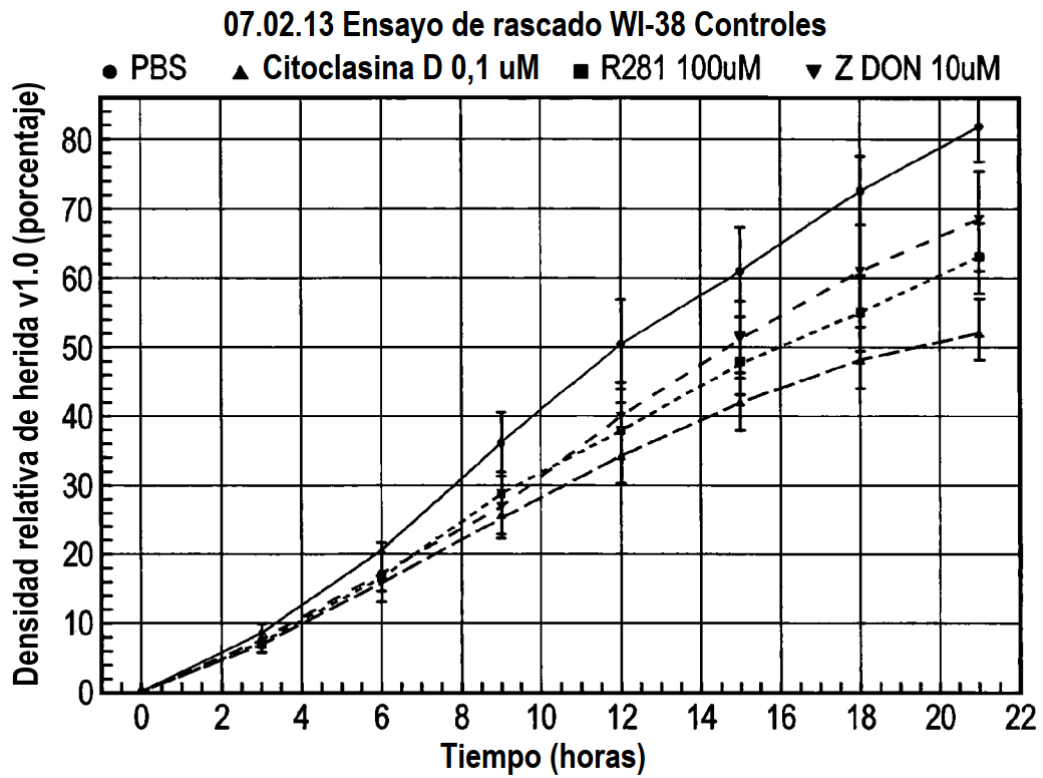
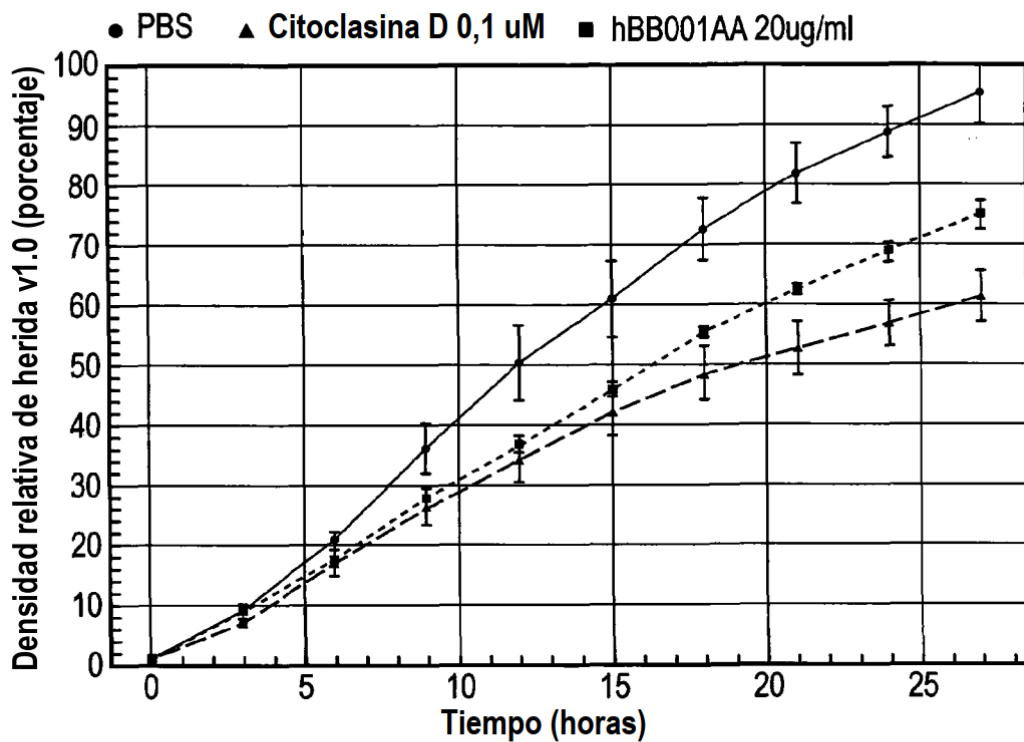


FIG. 41

07.02.13 Ensayo de rascado



07.03.13 Ensayo de rascado

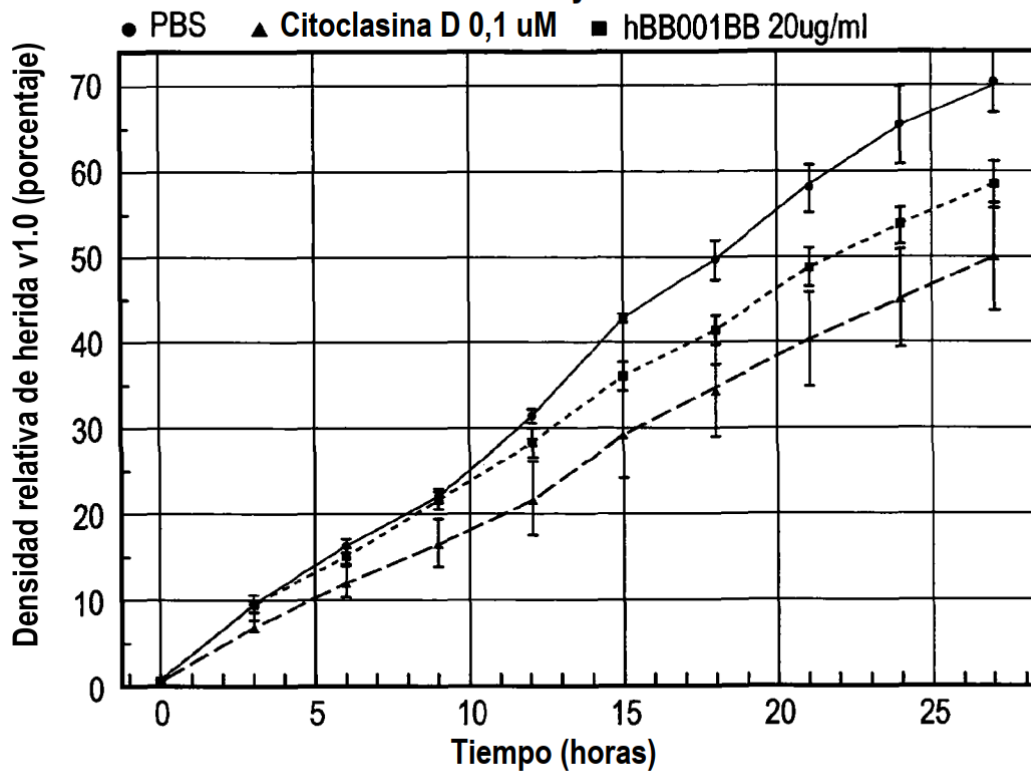


FIG. 42

24.04.13 Ensayo de rascado

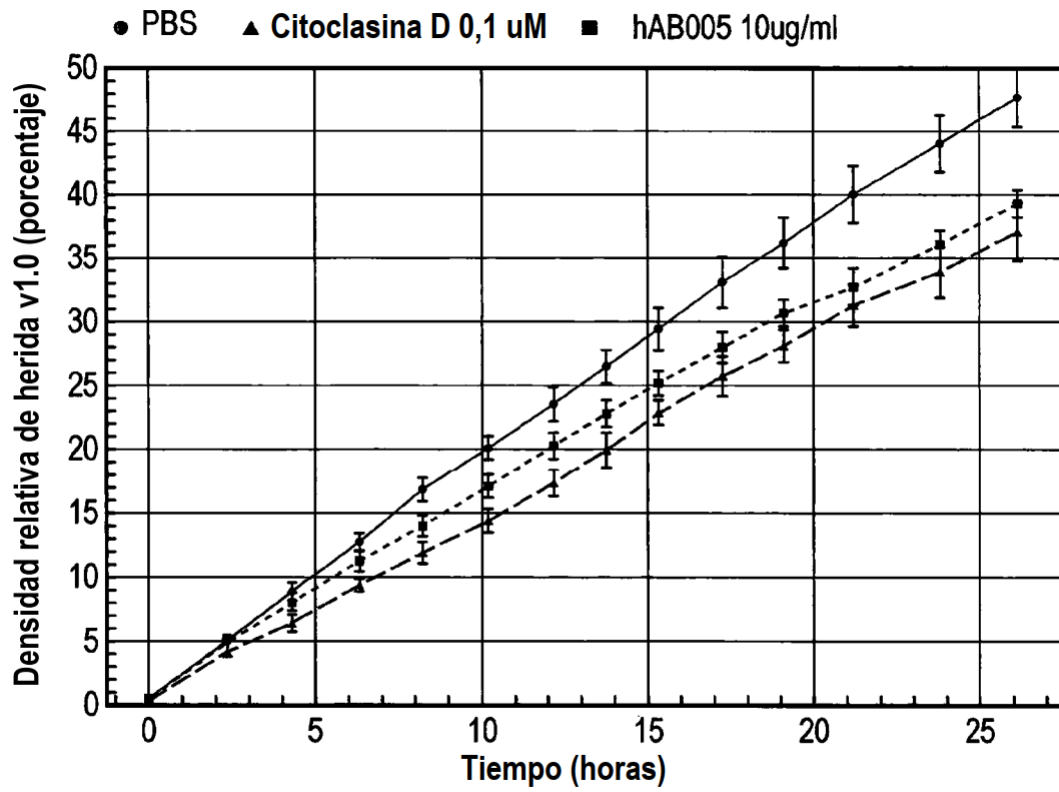


FIG. 43

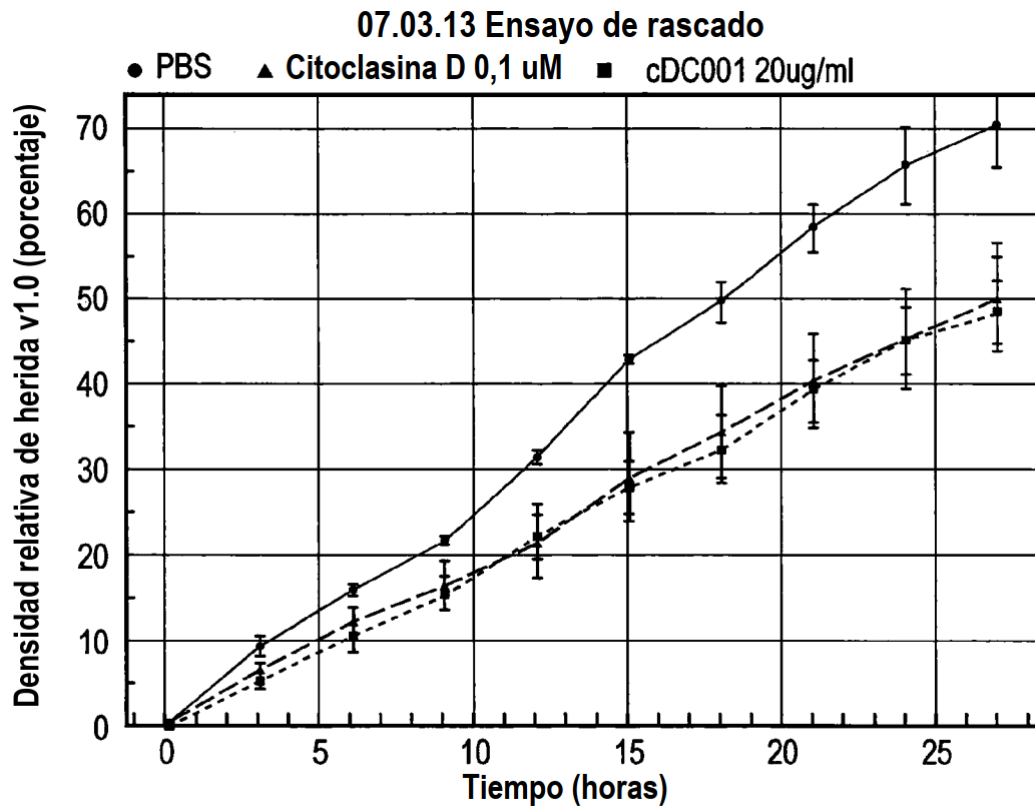


FIG. 44

