

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 815 527**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.12.2014** **PCT/EP2014/079094**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.06.2015** **WO15092077**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2014** **E 14833579 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.07.2020** **EP 3083681**

54 Título: **Terapia basada en anticuerpos de la amiloidosis por transtiretina (TTR) y anticuerpos de origen humano para ese propósito**

30 Prioridad:

20.12.2013 EP 13199251

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

30.03.2021

73 Titular/es:

NEURIMMUNE HOLDING AG (100.0%)
Wagistrasse 18
8952 Schlieren, CH

72 Inventor/es:

GRIMM, JAN y
MICHALON, AUBIN

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 815 527 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

Terapia basada en anticuerpos de la amiloidosis por transtiretina (TTR) y anticuerpos de origen humano para ese propósito

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere en general a la terapia basada en anticuerpos de amiloidosis por transtiretina (TTR). En particular, la presente invención se refiere a nuevas moléculas que se unen específicamente a la transtiretina humana (TTR) y a sus antígenos de acuerdo con se caracteriza en las reivindicaciones, en particular a anticuerpos recombinantes de origen humano, así como a fragmentos, derivados y variantes de los mismos que reconocen las formas mal plegadas, mal ensambladas o agregadas de TTR o fragmentos de la misma, y que son útiles en el tratamiento de enfermedades y afecciones inducidas por tales isoformas de TTR patógenas.

Además, la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas y de diagnóstico que comprenden moléculas de unión, anticuerpos e imitadores de las mismas valiosas como herramientas de diagnóstico para identificar enfermedades asociadas con la amiloidosis por TTR y también como estrategia de vacunación pasiva para tratar trastornos relacionados con enfermedades asociadas con amiloidosis por TTR tales como polineuropatía amiloide familiar (FAP), miocardiopatía amiloide familiar (FAC), amiloidosis sistémica senil (SSA), amiloidosis familiar sistémica, amiloidosis leptomeníngea/del sistema nervioso central (CNS), incluida la enfermedad de Alzheimer, amiloidosis ocular relacionada con TTR, amiloidosis renal relacionada con TTR, hipertiroidismo relacionada con TTR, amiloidosis de ligamentos relacionada con TTR, incluido el síndrome del túnel carpiano, desgarros del manguito rotador y estenosis espinal lumbar, y preeclampsia.

Además, la presente invención se refiere a un método para diagnosticar una enfermedad o afección inducida por isoformas de TTR patógenas, tales como TTR mal plegadas y/o agregadas presentes en depósitos de amiloide, en el que los niveles de isoformas de TTR patológicas se analizan en una muestra de un líquido corporal de un sujeto después de la administración de un anticuerpo anti-TTR, en el que cuando se compara con una muestra de control tomada antes de la administración, la presencia o alteración en el nivel de las isoformas de TTR patógenas, por ejemplo, de acuerdo con lo determinado por la presencia de un inmunocomplejo de TTR y el anticuerpo anti-TTR indican la enfermedad y/o afección.

Antecedentes de la invención

La transtiretina (TTR), anteriormente denominada prealbúmina, es una proteína soluble de 127 aminoácidos (secuencia de referencia del NCBI: NP_000362.1) que está implicada en el transporte de tiroxina y retinol en el organismo. La TTR es secretada en la sangre por el hígado y en el líquido cefalorraquídeo por el plexo coroideo, y también se expresa en tejidos específicos tales como las células alfa pancreáticas o el epitelio retiniano. La síntesis de TTR comienza en las edades embrionarias y continúa durante toda la vida. Está presente en alta concentración en el plasma (3.6-7.2 μM) y CSF (0.04-0.4 μM) y típicamente forma bajo condiciones fisiológicas un homotetrámero soluble de -55 kDa.

En condiciones específicas que se han aclarado poco y pueden incluir pH ácido, estrés oxidativo y factores locales, la proteína TTR adopta una conformación tridimensional alternativa y se vuelve tóxica.

La toxicidad de la proteína TTR mal plegada se ha descubierto investigando un trastorno neurodegenerativo autosómico dominante raro llamado polineuropatía amiloide familiar (FAP), que afecta a personas adultas en su edad media (Planté-Bordeneuve et al., Lancet Neurol. 10 (2011), 1086-1097). La FAP se caracteriza por deficiencias progresivas sensoriales, motoras y autonómicas que conducen a la muerte una década después del diagnóstico. Las lesiones nerviosas están asociadas con el depósito de agregados amorfos y fibrillas amiloides hechas de proteína TTR. La sustitución Val30Met es la mutación causante de FAP más frecuente, especialmente en áreas donde la enfermedad es endémica tal como en el norte de Portugal, pero ya se han identificado más de 100 mutaciones diferentes en el gen TTR; véase la Tabla IV más adelante. El mecanismo fisiopatológico en juego es idéntico para todas las mutaciones patogénicas, ya que las mutaciones alteran la estabilidad estructural del tetrámero de TTR, promoviendo el plegamiento incorrecto de TTR y conduciendo a la formación de especies tóxicas de TTR (Saraiva et al., Curr. Med. Chem. 19 (2012), 2304-2311).

También se observa toxicidad por TTR como consecuencia de la mutación Val122Ile, que se encuentra con alta frecuencia (3-5%) en las poblaciones afroamericanas y africanas occidentales. Esta mutación está asociada con la miocardiopatía amiloide familiar (FAC), una afección en la que la acumulación masiva de TTR en el miocardio produce debilidad cardíaca y, en última instancia, insuficiencia cardíaca (Ruberg et al., Circulation. 126 (2012), 1286-1300).

Las mutaciones en la secuencia de la proteína TTR no son un requisito estricto para la toxicidad de TTR, y la proteína TTR de tipo silvestre también es propensa al plegamiento incorrecto y la formación de agregados tóxicos. Por ejemplo, la amiloidosis sistémica senil (SSA) se caracteriza por debilidad cardíaca y la acumulación de agregados de TTR de tipo silvestre en el miocardio (Ikeda, Amyloid. 18 Suppl 1 (2011), 155-156; Dungu et al., Heart. 98 (2012), 1546-1554).

Los depósitos de TTR de tipo silvestre también se observan en múltiples casos de inflamación de ligamentos y tendones, incluido el síndrome del túnel carpiano, desgarros del manguito rotador y estenosis espinal lumbar (Sueyoshi et al., Hum. Pathol. 42 (2011), 1259-1264; Gioeva et al., Amiloide 20 (2013), 1-6). Además, recientemente se ha informado de amiloidosis por TTR en la placenta de madres que padecen preeclampsia (Kalkunte et al., Am. J. Pathol. 183 (2013) 1425-1436).

Los tratamientos para enfermedades con amiloidosis por TTR son limitados y principalmente invasivos, en los que principalmente el tratamiento se debe a los síntomas. En el caso de FAP, los tratamientos se basan en analgésicos para el tratamiento del dolor neuropático, en el trasplante de hígado para eliminar la principal fuente de proteína TTR mutada y en el tratamiento con Tafamidis. Tafamidis es una pequeña molécula que se une al tetrámero de TTR y estabiliza su conformación. Actúa contra la disociación del tetrámero de TTR, la etapa limitante de la velocidad en la ruta del plegamiento incorrecto que conduce a la formación de especies de TTR tóxicas. Tafamidis ha sido aprobado para el tratamiento de FAP en Europa pero no ha sido aprobado en los EE. UU., y su eficacia terapéutica está limitada, en el mejor de los casos, a ralentizar la progresión de la enfermedad. Actualmente no hay ningún tratamiento disponible dirigido a la proteína TTR mal plegada.

En vista de lo anterior, se necesitan nuevas estrategias terapéuticas para una terapia eficaz y segura de enfermedades asociadas con la amiloidosis por TTR.

Este problema técnico se resuelve mediante las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones y descritas más adelante e ilustradas en los Ejemplos y Figuras.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones y proporciona anticuerpos anti-transtretina (TTR) y moléculas de unión a TTR equivalentes para su uso en el tratamiento profiláctico o terapéutico de enfermedades y afecciones asociadas con la amiloidosis por TTR. Más específicamente, se proporcionan anticuerpos recombinantes de origen humano terapéuticamente útiles así como fragmentos y derivados de los mismos que reconocen formas mal plegadas, mal ensambladas o agregadas de TTR.

Los agregados de TTR mal plegados están asociados con marcadores de estrés celular, estrés oxidativo, respuesta inflamatoria y apoptosis muchos años antes del inicio de los síntomas (Macedo et al., Mol. Med. 13 (2007), 584-91). La capacidad natural del cuerpo para reconocer proteínas plegadas anormalmente y degradarlas es un factor protector, y las diferencias entre pacientes en su capacidad para eliminar proteínas TTR tóxicas ciertamente contribuyen a diferencias en la edad de inicio de la enfermedad y la velocidad de progresión de la enfermedad. En apoyo de esta hipótesis, se ha demostrado que los pacientes que reciben un trasplante de hígado de un donante de FAP desarrollan rápidamente anticuerpos contra la proteína patógena TTR (Ando et al., Transplantation. 73 (2002), 751-755), y que los pacientes con FAP con títulos altos de anticuerpos contra la proteína TTR mutada tienen un inicio de la enfermedad más tardío que los pacientes sin tales anticuerpos (Obayashi et al., Clin. Chim. Acta. 419 (2013), 127-131). Además, se ha demostrado que la inmunización activa contra la conformación patógena de TTR elimina casi completamente las deposiciones de TTR en ratones transgénicos con FAP (Terazaki et al., Lab. Invest. 86 (2006), 23-31).

Sin embargo, aunque podría haber parecido tentador investigar una estrategia inmunitaria para la intervención terapéutica, hasta ahora no se ha perseguido el uso de anticuerpos anti-TTR para el tratamiento de enfermedades relacionadas con TTR. Por ejemplo, en la solicitud internacional WO2010/030203 se ha descrito y propuesto un anticuerpo monoclonal aislado particular de ratón para TTR para su uso en el cribado de FAP y en la investigación y el tratamiento de enfermedades asociadas. Sin embargo, dado que los anticuerpos monoclonales de ratón inducen una respuesta de anticuerpo humano anti-ratón (HAMA), no son adecuados para la terapia en humanos. Por lo tanto, dado que la solicitud internacional caducó y aún no se ha publicado ningún desarrollo posterior, aparentemente no se ha seguido un enfoque terapéutico basado en anticuerpos. Más bien, hasta ahora, para los anticuerpos anti-TTR, sólo se ha investigado más a fondo su utilidad diagnóstica para pacientes con amiloidosis por TTR; véase, por ejemplo, Phay M. et al., Rejuvenation Res. 28 de octubre de 2013. [Publicación electrónica antes de la impresión].

Por el contrario, los experimentos realizados de acuerdo con la presente invención tuvieron éxito en el aislamiento de anticuerpos específicos de TTR monoclonales de origen humano que maduraron en el cuerpo humano y son específicos para especies de TTR mal plegadas, mal ensambladas, mutadas y/o agregadas y/o fragmentos de los mismos. Los sujetos humanos y los pacientes, respectivamente, que son la fuente de las células B de las que se han aislado los anticuerpos anti-TTR monoclonales de origen humano y el ADNc que codifica su dominio variable, respectivamente, no mostraron una cantidad sustancial de TTR mal plegada y no presentaban síntomas de afecciones asociadas con isoformas patógenas. Sin embargo, en otra realización de la presente invención, la fuente de las células B de las que podrían aislarse los anticuerpos monoclonales anti-TTR de origen humano y el ADNc que codifica su dominio variable, respectivamente, son pacientes que muestran síntomas de una enfermedad y/o trastorno asociado con amiloidosis por TTR. Por tanto, es prudente esperar que los anticuerpos anti-TTR monoclonales humanos de la presente invención y sus derivados, además de no ser inmunogénicos en humanos, presenten un efecto terapéuticamente beneficioso.

Por lo tanto, la presente invención se dirige a anticuerpos recombinantes de origen humano, fragmentos de unión a antígeno y moléculas de unión a antígeno similares como se caracterizan en las reivindicaciones, que son capaces de reconocer específicamente TTR. Si no se indica lo contrario, por "reconocer específicamente TTR", "anticuerpo específico de/para TTR" y "anticuerpo anti-TTR" se entienden anticuerpos que se unen de manera específica, general y colectiva a la forma monomérica nativa de TTR; anticuerpos que se unen específicamente a cualquiera de las formas de TTR, por ejemplo, TTR mutada, TTR oligomérica, fibrilar y/o no fibrilar. En el presente documento se proporcionan anticuerpos de origen humano selectivos para la longitud completa y/o fragmentos y/o formas mal plegadas, mal ensambladas y/o agregadas de TTR.

Como se mencionó anteriormente, preferiblemente el anticuerpo anti-TTR de la presente invención es un anticuerpo recombinante, en el que tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) de la cadena ligera y pesada variable, y/o sustancialmente la región variable completa están codificadas por un ADNc derivado de un ARNm obtenido de una célula B de memoria humana que produjo un anticuerpo anti-TTR. En una realización preferida, el anticuerpo anti-TTR de la presente invención muestra, en cualquier combinación, una más de las propiedades de unión y biológicas como se demuestra para los anticuerpos objeto ilustrados en los Ejemplos y Figuras adjuntos, preferiblemente una más de las propiedades de unión y biológicas como se demostró para los ejemplos de anticuerpos NI-301.59.F1, NI-301.35G11 y NI-301.37F1.

En una realización particularmente preferida de la presente invención, el anticuerpo anti-TTR o su fragmento de unión a TTR demuestra las características de unión inmunológica de un anticuerpo caracterizado por las regiones variables V_H y V_L como se establece en la Figura 1.

El fragmento de unión a antígeno del anticuerpo puede ser un fragmento Fv de cadena sencilla, un fragmento F(ab'), un fragmento F(ab) y un fragmento F(ab')₂, o cualquier otro fragmento de unión a antígeno. En una realización específica, más adelante, el anticuerpo o fragmento del mismo es un anticuerpo de isotipo IgG humano. Alternativamente, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico humano-roedor o rodentizado tal como un anticuerpo murino o murinizado, de rata o ratizado, siendo las versiones de roedor particularmente útiles para métodos de diagnóstico y estudios en animales.

Además, la presente invención se refiere a composiciones que comprenden el anticuerpo de la presente invención o fragmentos activos del mismo y a métodos inmunoterapéuticos e inmunodiagnósticos que usan tales composiciones en la prevención, diagnóstico o tratamiento de trastornos asociados con la amiloidosis por TTR, en los que una cantidad eficaz de la composición se administra a un paciente que la necesite.

La presente invención también se refiere a polinucleótidos que codifican al menos una región variable de una cadena de inmunoglobulina del anticuerpo de la invención. Dicha región variable comprende las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de V_H y V_L de la región variable como se expone en la Figura 1. En una realización preferida de la presente invención, el polinucleótido es un ADNc, preferiblemente derivado de ARNm obtenido de células B humanas de memoria que producen anticuerpos reactivos con especies de TTR mutantes, mal plegadas, mal ensambladas y/o agregadas.

Por consiguiente, la presente invención también abarca vectores que comprenden dichos polinucleótidos y células huésped transformadas con ellos, así como su uso para la producción de un anticuerpo y moléculas de unión equivalentes que son específicas para TTR. En una realización adicional de la presente invención, los anticuerpos o moléculas de unión son capaces de unirse a especies de TTR mal plegadas, mal ensambladas o agregadas o fragmentos de las mismas. Se conocen en la técnica medios y métodos para la producción recombinante de anticuerpos y sus imitadores, así como métodos de cribado de moléculas de unión competidoras, que pueden ser anticuerpos o no. Sin embargo, como se describe en el presente documento, en particular con respecto a las aplicaciones terapéuticas en humanos, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo humano en el sentido de que la aplicación de dicho anticuerpo está sustancialmente libre de una respuesta inmune dirigida contra dicho anticuerpo que de otro modo se observaría para anticuerpos quiméricos e incluso humanizados.

Además, en el presente documento se describen composiciones y métodos que se pueden usar para identificar TTR, en particular especies o fragmentos de TTR mutados, mal plegados, mal ensamblados o agregados en muestras y/o *in vivo*. Los anticuerpos anti-TTR descritos y los fragmentos de unión de los mismos pueden usarse para cribar sangre humana, plasma, suero, saliva, líquido peritoneal, líquido cefalorraquídeo ("CSF") y orina para detectar la presencia de TTR y/o especies de TTR mutadas, mal plegadas, mal ensambladas, o agregadas o fragmentos de las mismas en muestras, por ejemplo, usando ensayos basados en ELISA o adaptados a la superficie. En una realización, la presente invención se refiere a un método de diagnóstico o seguimiento de la progresión de un trastorno relacionado con especies de TTR mutadas, mal plegadas, mal ensambladas o agregadas o fragmentos de las mismas en un sujeto, comprendiendo el método determinar la presencia de especies o fragmentos de TTR mutados, mal plegados, mal ensamblados, o agregados en una muestra del sujeto que se va a diagnosticar con al menos un anticuerpo de la presente invención, en el que la presencia de especies o fragmentos de TTR mal plegados, mal ensamblados o agregados es indicativa del trastorno.

Además, en una realización de la presente invención, los anticuerpos anti-TTR se proporcionan para la preparación

de una composición para detección *in vivo* (también denominada formación de imágenes *in vivo*) o el direccionamiento de un agente terapéutico y/o de diagnóstico a TTR, en especies o fragmentos de TTR particulares mutados, mal plegados, mal ensamblados o agregados en el cuerpo humano o animal. Los métodos y composiciones descritos en este documento pueden ayudar en los trastornos asociados con la amiloidosis por TTR y caracterizados, por ejemplo, por la aparición de formas de TTR y pueden usarse para controlar la progresión de la enfermedad y la eficacia terapéutica de la terapia proporcionada al sujeto, por ejemplo en métodos de diagnóstico relacionados con la obtención de imágenes *in vivo*. Por lo tanto, en una realización, se proporciona el anticuerpo anti-TTR y/o la molécula de unión a TTR de la presente invención, en la que dicha detección (formación de imágenes) *in vivo* comprende gammagrafía, tomografía por emisión de positrones (PET), tomografía por emisión de fotón único (SPECT), formación de imágenes ópticas en el infrarrojo cercano (NIR) o imágenes de resonancia magnética (MRI).

Por tanto, la presente solicitud describe además métodos para tratar, diagnosticar o prevenir una enfermedad asociada con la amiloidosis por TTR. Los métodos comprenden administrar una concentración eficaz de un anticuerpo o derivado de anticuerpo preferiblemente humano al sujeto en el que el anticuerpo se dirige a TTR o fragmentos de la misma, preferiblemente especies de TTR o fragmentos de la misma mal plegados, mal ensamblados o agregados.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método para diagnosticar una enfermedad asociada con amiloidosis por TTR, monitorizar el tratamiento de la enfermedad con un anticuerpo anti-TTR o determinar la utilidad diagnóstica o terapéutica de un anticuerpo anti-TTR que comprende analizar el nivel de TTR mal plegada y/o agregada en una muestra, por ejemplo, sangre obtenida de un sujeto después de la administración de un anticuerpo anti-TTR al sujeto, en el que la presencia o aumento del nivel de TTR mal plegada y/o agregada en la muestra del sujeto en comparación con el control, tal como una muestra obtenida del sujeto antes de la administración del anticuerpo anti-TTR indica una enfermedad asociada con amiloidosis por TTR, en la que el anticuerpo anti-TTR es un anticuerpo de la presente invención.

En una realización preferida de la presente invención, en particular cuando se usan animales no humanos para probar anticuerpos recombinantes de origen humano como se ilustra en el Ejemplo 13 y otros anticuerpos anti-TTR previstos para uso en humanos en general, el nivel de TTR mal plegada y/o agregada en la muestra se analiza determinando un complejo formado entre el anticuerpo anti-TTR y la TTR mal plegada y/o agregada, por ejemplo mediante inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-IgG humano o antiidiotípico.

Con respecto al aspecto de diagnóstico en particular para un sujeto humano y un paciente, la presencia y el nivel elevado de TTR mal plegada y/o agregada y complejo de la misma con el anticuerpo anti-TTR, respectivamente, indica la presencia de depósitos de amiloide de TTR en el cuerpo humano, por ejemplo en el corazón, el sistema nervioso periférico (PNS), los ojos, los músculos, el tracto gastrointestinal, los riñones, el sistema vascular y el sistema nervioso central (CNS) de un paciente o sujeto. Por lo tanto, el método de la presente invención permite la identificación y determinación de una enfermedad asociada con la amiloidosis por TTR en el cuerpo del sujeto por un lado y la eliminación de los depósitos de TTR del cuerpo del paciente por el otro, indicando así también el progreso terapéutico de un tratamiento dado y la eficacia de un fármaco para el tratamiento de la amiloidosis por TTR, tal como un anticuerpo anti-TTR. Por lo tanto, como se demuestra en el Ejemplo 13, el anticuerpo anti-TTR de la presente invención es capaz de unirse a TTR mal plegada y/o agregada con suficiente afinidad para alterar la estabilidad de los depósitos patológicos de TTR tal como para capturar y eliminar la TTR mal plegada y/o agregada de los depósitos en un fluido corporal, en particular sangre. El intervalo de tiempo especificado después de la administración, es decir, el marco de tiempo después del cual se mide el nivel de TTR patológico y el complejo con el anticuerpo anti-TTR, respectivamente, lo determina un médico en ejercicio. Normalmente, se utiliza un intervalo de tiempo inferior a una semana. En una realización preferida, el nivel de TTR patológico en una muestra de un paciente o sujeto después de la administración de un anticuerpo anti-TTR o fragmento de unión a antígeno del mismo al paciente o sujeto se determina después de menos de o igual a 48 horas; véase también el Ejemplo 13.

La presente invención también se refiere al uso de cualquier anticuerpo anti-TTR y molécula de unión a TTR en el método descrito anteriormente. Sin embargo, debido a las propiedades ventajosas y en particular porque es de origen humano, se prefiere el uso de un anticuerpo anti-TTR de la presente descripción en el presente documento. En una realización preferida, el anticuerpo muestra sustancialmente las mismas actividades biológicas y de unión que cualquier anticuerpo seleccionado entre NI-301.59F1, NI-301.35G11, NI-301.37F1, NI-301.2F5, NI-301.28B3, NI-301.119C12, NI-301.5D8, NI-301.9D5, NI-301.104F5, NI-301.21F10, NI-301.9G12, NI-301.12D3, NI-301.37F1-PIMC, NI-301.44E4, NI-301.18C4, NI-301.11A10, NI-301.3C9, NI-301.14D8, NI-301.9X4 y NI-301.14C3. El anticuerpo anti-TTR también se puede alterar para facilitar el manejo del método de diagnóstico, incluido el marcaje del anticuerpo como se describe en detalle a continuación.

Otras realizaciones de la presente invención resultarán evidentes a partir de la descripción y los ejemplos que siguen.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Secuencias de aminoácidos de las regiones variables de los anticuerpos humanos NI-301.59F1, NI301.35G11, NI-301.37F1, NI-301.2F5, NI-301.28B3, NI-301.119C12, NI-301.5D8, NI301.9D5, NI-301.104F5, NI-301.21F10, NI-301.9G12, NI-301.12D3, NI-301.37F1PIMC, NI-301.44E4, NI-301.18C4, NI-301.11A10, NI-301.3C9,

NI- 301.14D8, NI301.9X4 y NI-301.14C3. Las regiones marco (FR) y determinantes de complementariedad (CDR) se indican con las CDR subrayadas. Se utilizó el esquema de numeración de Kabat (consultar: <http://www.bioinf.org.uk/abs/>).

5 Figura 2: Unión a la TTR agregada, de tipo silvestre y mutante mediante ELISA directo. A, B, C: las placas de ELISA se recubrieron con TTR humana de tipo silvestre agregada (●), V30M-TTR recombinante agregada (▼) y albúmina de suero bovino (BSA) (■) a 10 µg/mL, y se incubaron con los siguientes anticuerpos monoclonales humanos en un intervalo de concentración de 4 pM a 400 nM: A) NI-301.59F1, B) NI-301.35G11 y C) NI-301.37F1. Los valores de EC₅₀ se estimaron ajustando puntos de datos con el método de mínimos cuadrados. NI-301.59F1: TTR de tipo silvestre agregada EC₅₀ = 3.0 nM, V30M-TTR agregada EC₅₀ = 15.5 nM. NI-301.35G11: TTR de tipo silvestre agregada EC₅₀ = 3.9 nM, V30M-TTR agregada EC₅₀ = 5.0 nM. NI-301.37F1: TTR de tipo silvestre agregada EC₅₀ = 0.35 nM, V30M-TTR agregada EC₅₀ = 0.15 nM.

15 Figura 3: Especificidad para TTR agregada en inmunotransferencia de mancha. La proteína TTR humana de tipo silvestre en conformaciones nativas (1) o agregadas (2) y la proteína V30M-TTR recombinante agregada (3) se depositaron en una membrana de nitrocelulosa y se incubaron con los siguientes anticuerpos: A) anticuerpo policlonal de conejo comercial contra TTR (Dako-A0002; 150 ng/mL), B) NI-301.59F1, C) NI-301.35G11 y D) NI-301.37F1 (B, C y D: anticuerpos monoclonales humanos a 50 nM).

20 Figura 4: Especificidad para TTR agregada en transferencia Western. Proteína TTR humana de tipo silvestre (300 ng) en conformaciones nativas (1) o agregadas (2) y extracto de hígado de ratón de tipo silvestre (10 µg de proteína total) (3) se cargaron en un gel SDS-PAGE y se procesaron para transferencia Western con los siguientes anticuerpos: A) anticuerpo policlonal de conejo comercial contra TTR (Dako-A0002; 150 ng/mL), B) NI-301.59F1, C) NI301.35G11 y D) NI-301.37F1 (B, C y D : anticuerpos monoclonales humanos a 50 nM). Para evitar la disociación de los agregados de alto peso molecular, la muestra de TTR agregada se entrecruzó con glutaraldehído (1%, 5 min) antes de cargarla en el gel.

30 Figura 5: Ausencia de unión a TTR en plasma humano en transferencia Western. Se cargaron muestras de plasma (0,5 µL) de controles (n = 5), portadores de mutaciones asintomáticas (n = 5) y pacientes con FAP (n = 4) en un gel SDS-PAGE y se procesaron para transferencia Western con los siguientes anticuerpos: A) Anticuerpo policlonal de conejo comercial contra TTR (DakoA0002; 150 ng/mL), B) solo anticuerpo secundario (anti-IgG humana-HRP, dilución 1/10.000), C) NI-301.35G11 y D) NI-301.37F1 (C y D: anticuerpos monoclonales humanos a 50 nM).

35 Figura 6: Ausencia de unión a TTR en plasma humano en inmunotransferencia de mancha. La proteína TTR mutante y de tipo silvestre pura en conformaciones nativas y agregadas, y las muestras de plasma de controles, portadores de mutaciones asintomáticas y pacientes con FAP se depositaron en una membrana de nitrocelulosa y se incubaron con los siguientes anticuerpos: A) anticuerpo policlonal de conejo comercial contra TTR (Dako- A0002; 150 ng/mL), B) solo anticuerpo secundario (anti-IgG2a de ratón-HRP, dilución 1/10.000), y C) anticuerpo quimérico de ratón NI-301.mur35G11 (10 nM). Muestras 1-6: 150 ng de 1) TTR agregada de tipo silvestre, 2) TTR nativa de tipo nativa, 3) BSA, 4) V30M-TTR nativa, 5) L55P-TTR nativa y 6) Y78F-TTR nativa. Muestras 7-18: 2 µL de plasma recogido de 7-10) controles (n = 4), 11-14) portadores de mutaciones asintomáticos (n = 4) y 15-18) pacientes con FAP (n = 4).

45 Figura 7: Unión específica a TTR agregada en solución. Para la inmunoprecipitación (IP) de TTR se utilizaron proteína TTR humana de tipo silvestre y recombinante en conformaciones nativas y agregadas, y una muestra de plasma humano en 3 diluciones diferentes utilizando los siguientes anticuerpos: A) anticuerpo policlonal de conejo comercial contra TTR (Dako-A0002), B) NI-301.35G11 y C) NI-301.37F1. Las proteínas inmunoprecipitadas se sometieron a SDS-PAGE y se detectaron mediante transferencia Western (WB) con el anticuerpo Dako-A0002 (150 ng/mL). Carriles 1-2: controles de carga de WB: 300 ng de 1) TTR humana de tipo silvestre, 2) TTR recombinante de tipo silvestre Carriles 3-6: IP sobre proteína TTR pura: 3) TTR humana nativa de tipo silvestre, 4) TTR humana agregada de tipo silvestre, 5) TTR recombinante nativa de tipo silvestre y 6) TTR recombinante agregada de tipo silvestre Carriles 7-10: IP en plasma humano diluido 7) 10 veces, 8) 100 veces, 9) 1000 veces con PBS y 10) PBS solamente.

55 Figura 8: Unión específica a TTR en tejido de ratón con FAP. Los ratones transgénicos que expresan el alelo V30M-TTR humano sobre un fondo inactivado (KO) para TTR reproducen las características histopatológicas de FAP, incluidos los depósitos de TTR amorfos y amiloides en varios tejidos. Se procesaron secciones de tejido recolectados de hígado e intestino de A) ratones con FAP y B) ratones TTR-KO para inmunohistoquímica utilizando los siguientes anticuerpos: 1) anticuerpo policlonal de conejo comercial contra TTR (DakoA0002; dilución 1/1000), 2) NI-301.35G11 y 3) NI-301.37F1 (2 y 3: anticuerpos monoclonales humanos a 50 nM).

60 Figura 9: Unión específica a depósitos de TTR mal plegada pero no a TTR nativa en tejido humano. Los anticuerpos se caracterizaron por su capacidad para unirse a TTR en secciones de biopsia de piel de pacientes con FAP y páncreas de control sano: las acumulaciones de TTR mal plegada que son características de FAP están presentes en la biopsia de piel del paciente, mientras que las células alfa pancreáticas muestran expresión endógena de TTR. Las secciones se procesaron para inmunohistoquímica usando los siguientes anticuerpos: 1A) anticuerpo policlonal de conejo comercial contra TTR (Dako-A0002; dilución 1/1000), 1B) anticuerpo anti-IgG de conejo acoplado a HRP (dilución 1/125), 2A) anticuerpo quimérico de ratón NI-301.mur35G11 (50 nM), 2B) Anticuerpo anti-IgG2a de ratón acoplado a

HRP (dilución 1/125), 3A) NI-301.37F1 (50 nM), y 3B) IgG antihumano acoplado a HRP (dilución 1/125).

Figura 10: Epítomos de unión a TTR evaluados mediante análisis por Pepscan. Los epítomos de unión de anticuerpos en TTR se determinaron usando el método de exploración de péptidos. Además de los péptidos que cubren la secuencia completa de TTR humana de tipo silvestre (manchas 1 a 29), las mutaciones de TTR seleccionadas también se representaron en la membrana (manchas 30 a 44). La membrana de exploración de péptidos se incubó con los siguientes anticuerpos a 50 nM: A) NI301.59F1, B) NI-301.35G11 y C) NI-301.37F1. Como se resume en la Tabla D): NI-301.59F1 se une a EEEFVEGIY (TTR 61-69); NI-301.35G11 se une a GELHGLTTEEE (TTR 53-63); la mutación L55P evita la unión del anticuerpo; y NI-301.37F1 se une a WEPFA (TTR 41-45); la mutación E42G evita la unión de anticuerpos. Con el fin de determinar los requisitos de secuencia de los epítomos mencionados, los epítomos de unión del anticuerpo en TTR se identificaron adicionalmente usando el método de exploración con alanina. La secuencia completa de la proteína TTR humana de tipo silvestre se representó en la membrana como un conjunto de 151 péptidos sucesivos de 15 aminoácidos de longitud, comenzando en cada aminoácido de la proteína TTR. Para cada péptido, el aminoácido en la posición 10 fue reemplazado por una alanina, o por glicina o prolina cuando el aminoácido inicial era una alanina. La membrana de exploración de péptidos se incubó con los siguientes anticuerpos a 20 nM: E) NI-301.59F1, F) NI301.35G11 y G) NI-301.37F1. Como se resume en la Tabla H):

NI-301.59F1 se une a EEFXEGIY (TTR 62-69).

NI-301.35G11 se une a ELXGLTXE (TTR 54-61).

NI-301.37F1 se une a WEPFA (TTR 41-45), en las que X indica aminoácido; el reemplazo de E42 por alanina no interrumpió la unión, pero el reemplazo por guanina evitó la unión de anticuerpos como se informa en C.

Figura 11: Cinética de unión del anticuerpo a la proteína TTR en solución evaluada por resonancia de plasmón de superficie.

La cinética de unión del anticuerpo NI-301.37F1 a la proteína TTR se midió mediante resonancia de plasmón de superficie (SPR). El anticuerpo NI-301.37F1 se capturó en el sensor por medio de un anticuerpo anti-IgG humano, y la solución de proteína TTR se hizo pasar sobre la superficie del sensor, a concentraciones que oscilaban entre 3.2 y 316 nM. Se utilizó un modelo de unión simple 1:1 para ajustar los datos y derivar las constantes de asociación (k_a) y disociación (k_d) respectivas y la afinidad (KD). Se determinaron las propiedades de unión para A) proteína TTR humana de tipo silvestre en conformación nativa, B) proteína TTR humana de tipo silvestre desnaturalizada (conformación mal plegada) y C) proteína TTR-L55P mutante recombinante. TTR nativa de tipo silvestre: k_a = no determinada, k_d = no determinada, $KD > 316$ nM. TTR de tipo silvestre desnaturalizada: $k_a = 2.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_d = 2.6 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, $KD = 1.2$ nM. TTR-L55P recombinante: $k_a = 3.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_d = 4.6 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, $KD = 1.4$ nM

Figura 12: El tratamiento crónico con anticuerpo anti-TTR reduce la deposición patológica de TTR en el modelo de ratón con FAP.

Los ratones con FAP (Tg(6.0hMet30) x muTTR-KO) recibieron la administración semanal de NI-301.37F1 quimérico de ratón o anticuerpo de control de isotipo a razón de 3 mg/kg ip durante 12 semanas. Al final del período de tratamiento, se recogieron tejidos y se cuantificó el grado de deposición de TTR mediante inmunofluorescencia. A) Efecto del tratamiento en ratones de 7 meses ($n = 14-15$ ratones por grupo); B) Efecto del tratamiento en ratones de 17 meses ($n = 10$ ratones por grupo). Comparaciones grupales con prueba t de dos colas no pareadas.

Figura 13: Unión del anticuerpo a depósitos patológicos de TTR *in vivo*.

La participación con el objetivo se caracterizó en ratones adultos con FAP (7 meses) 48 horas después de la administración de una dosis única de anticuerpo NI-301.37F1 a razón de 30 mg/kg ip, o PBS. Los depósitos patológicos de TTR y la localización del anticuerpo inyectado se detectaron simultáneamente mediante inmunofluorescencia.

A, D) Depósitos patológicos de TTR en los riñones de (A) ratones inyectados con NI-301.37F1 o (D) con PBS. B, E) Detección de anticuerpo humano en (B) ratones inyectados con NI-301.37F1 o (E) con PBS. C, F) Imágenes superpuestas que muestran (C) la colocalización y (F) ausencia de tinción inespecífica de TTR y NI-301.37F1.

Figura 14: Detección sin tejido de TTR mal plegado *in vivo*.

Los ratones adultos con FAP recibieron una sola administración de NI-301.37F1 o anticuerpo de control de isotipo a razón de 3 mg/kg ip. Se recolectaron muestras de sangre antes de la inyección de anticuerpos ($t = 0$) y 48 horas después de la inyección de anticuerpos ($t = 48$ h). Las muestras de plasma se procesaron mediante inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-IgG humano y se analizaron mediante transferencia Western utilizando para la detección: A) un anticuerpo policlonal anti-TTR independiente de la conformación (Dako A0002, 150 ng/mL) y B) NI-301.37F1 (20 nM). En paralelo, una muestra de plasma obtenida de un ratón con FAP no inyectado se incubó con el anticuerpo NI-301.37F1 *in vitro*, antes del procesamiento.

Figura 15: Especificidad de anticuerpo evaluada frente a proteínas de agregación mediante ELISA.

Se evaluó la especificidad de anticuerpo para la proteína TTR midiendo la unión a proteínas de agregación seleccionadas mediante ELISA directo. La unión del anticuerpo se evaluó a 4 y 20 nM y la intensidad de la señal se expresó en veces de cambio con respecto a los niveles de fondo, medidos para cada ensayo en ausencia de anticuerpo anti-TTR.

A-B) Unión de NI-301.37F1 ensayada a 20 (A) y 4 nM (B)

C-D) Unión de NI-301.44E4 ensayada a 20 (C) y 4 nM (D).

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere en general a inmunoterapia y métodos no invasivos para la detección de enfermedades y afecciones asociadas con la presencia de isoformas patológicas, a menudo mutantes y/o mal plegadas de transtiretina (TTR). Más específicamente, la presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales recombinantes de origen humano y fragmentos de unión a antígeno de los mismos como se caracteriza en las reivindicaciones, que se han generado con base en la información de secuencia obtenida de poblaciones de donantes humanos seleccionadas y son capaces de unirse a tales isoformas de TTR y antígenos de las mismas. El anticuerpo monoclonal recombinante de origen humano de la presente invención se caracteriza ventajosamente por unirse específicamente a especies de TTR mal plegadas, mal ensambladas, mutadas y/o agregadas y/o fragmentos de las mismas, lo que permite un direccionamiento para el tratamiento y/o diagnóstico de especies de TTR alteradas patológicamente. Debido a su derivación humana, se puede esperar razonablemente que los anticuerpos recombinantes resultantes de la presente invención sean eficaces y seguros como agente terapéutico, y altamente específicos como reactivo de diagnóstico para la detección de TTR patológica sin producir falsos positivos.

Además, el anticuerpo de la presente invención, así como los derivados del mismo, se pueden usar para la terapia de combinación de pacientes después de trasplantes de órganos que, sin embargo, tienen el riesgo de desarrollar una amiloidosis por TTR debido a por ejemplo su deposición, por ejemplo mutaciones hereditarias en el TTR o un defecto en la producción de TTR en el hígado. Por lo tanto, como una realización ventajosa particular, la presente invención se refiere al anticuerpo monoclonal humano y cualquier derivado del mismo descrito en este documento para su uso en el tratamiento de pacientes, ya sea solo o en el tratamiento de pacientes que reciben, por ejemplo, fármacos inmunosupresores después del trasplante de órganos u otros agentes utilizados para los síntomas asociados con la amiloidosis por TTR, en los que el anticuerpo de la presente invención y cualquiera de sus derivados está diseñado para administrarse concomitantemente con el fármaco inmunosupresor y/o el agente que suprime los efectos secundarios adicionales o secuencialmente antes o después de la administración del mismo. En este contexto, el anticuerpo anti-TTR y el fragmento de unión a TTR de la presente invención son preferiblemente sustancialmente no inmunogénicos en humanos. En una realización de la presente invención, se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden tanto un anticuerpo monoclonal humano de la presente invención o cualquier derivado del mismo y uno o más fármacos inmunosupresores y/o utilizados para los síntomas asociados con la amiloidosis por TTR.

I. Definiciones

A menos que se indique lo contrario, un término como se usa en este documento tiene la definición proporcionada en el Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, Oxford University Press, 1997, revisado en 2000 y reimpresso en 2003, ISBN 0 19 850673 2.

Si no se indica específicamente lo contrario, el término "TTR" se usa indistintamente para referirse específicamente a las diferentes formas de transtiretina (TTR). El término "TTR" también se usa para identificar generalmente otros conformeros de TTR, por ejemplo, oligómeros y/o formas mal plegadas, mal ensambladas y/o agregadas de TTR. El término "TTR" también se usa para referirse colectivamente a todos los tipos y formas de TTR, tales como TTR mutada. Las letras añadidas delante de los términos TTR se utilizan para indicar el organismo del que se origina el ortólogo particular, por ejemplo hTTR para TTR humana o mTTR para origen murino. Además, a menos que se indique lo contrario, el sistema de numeración para la secuencia de aminoácidos de TTR usado en el presente documento se refiere a la proteína TTR madura, es decir, la proteína TTR secretada por las células después de la escisión del péptido señal. Esta numeración es la que se utiliza para definir las mutaciones de TTR encontradas en pacientes, tales como TTR-V30M o TTR-L55P, pero difiere de la utilizada para la secuencia de la proteína precursora de transtiretina (secuencia de referencia del NCBI: NP_000362.1). En este contexto, la posición y el aminoácido sustituido en una TTR mutante pueden indicarse de formas diferentes pero equivalentes; véase, por ejemplo, "TTR-V30M" y "V30M-TTR".

Los anticuerpos anti-TTR descritos en el presente documento se unen específicamente a TTR y sus epítomos y a diversas conformaciones de TTR y sus epítomos. Por ejemplo, en el presente documento se describen anticuerpos que se unen específicamente a especies de TTR alteradas patológicamente o fragmentos de las mismas, tales como oligómeros/fibrillas y/o formas mutadas, mal plegadas, mal ensambladas y/o agregadas de TTR o fragmentos de las mismas. El término (patológicamente) mutada, mal plegada, mal ensamblada, agregada/agregados de TTR, se usa de manera intercambiable para referirse específicamente a las formas mencionadas anteriormente. El término "formas agregadas" o "agregados" (patológicas), como se usa en el presente documento, describe los productos de una acumulación o formación de grupos debido a la interacción errónea/patológica de TTR entre sí. Estos agregados, acumulaciones o formas de agrupamiento pueden ser, consistir sustancialmente o consistir tanto en TTR y/o fragmentos de TTR como en oligómeros no fibrilares y/o oligómeros fibrilares y fibrillas de los mismos. Como se usa en este documento, la referencia a un anticuerpo que "se une específicamente", "se une selectivamente" o "se une preferentemente" a TTR se refiere a un anticuerpo que no se une a otras proteínas no relacionadas. En un ejemplo, un anticuerpo de TTR descrito en el presente documento puede unirse a TTR o un epítomo del mismo y no mostrar

unión por encima de aproximadamente 2 veces el fondo para otras proteínas. En una realización preferida, el anticuerpo de la presente invención no reconoce sustancialmente proteínas formadoras de amiloide no relacionadas seleccionadas del grupo que consiste en alfa-sinucleína (a-syn), Tau, proteína 43 de unión al ADN de respuesta transactiva (TDP-43), amiloide A en suero (SAA), proteína huntingtina (HTT); véase, por ejemplo la Figura 15. Un anticuerpo que "se une específicamente" o "se une selectivamente" a un conformero de TTR se refiere a un anticuerpo que no se une a todas las conformaciones de TTR, es decir, no se une al menos a otro conformero de TTR.

Por ejemplo, en el presente documento se describen anticuerpos que se pueden unir preferentemente a formas mal plegadas, mal ensambladas y/o agregadas de TTR tanto *in vitro* como en tejidos obtenidos de pacientes con enfermedades asociadas con amiloidosis por TTR o con riesgo de desarrollar enfermedades asociadas con amiloidosis por TTR. Dado que las secuencias de los anticuerpos de TTR de la presente invención se han obtenido de sujetos humanos, los anticuerpos de TTR de la presente invención también pueden denominarse "autoanticuerpos humanos" o "anticuerpos de origen humano" para enfatizar que esos anticuerpos fueron de hecho expresados inicialmente por los sujetos y no son constructos sintéticos generados, por ejemplo, por medio de inmunoglobulinas humanas que expresan bibliotecas de fagos, que hasta ahora representaban un método común para intentar proporcionar anticuerpos similares a los humanos.

Se entiende que el término "péptido" incluye los términos "polipéptido" y "proteína" (que, a veces, se pueden usar indistintamente en este documento) dentro de su significado. De manera similar, también se contemplan fragmentos de proteínas y polipéptidos y pueden denominarse en el presente documento como "péptidos". No obstante, el término "péptido" denota preferiblemente un polímero de aminoácidos que incluye al menos 5 aminoácidos contiguos, preferiblemente al menos 10 aminoácidos contiguos, más preferiblemente al menos 15 aminoácidos contiguos, aún más preferiblemente al menos 20 aminoácidos contiguos, y particularmente preferido al menos 25 aminoácidos contiguos. Además, el péptido de acuerdo con la presente invención normalmente no tiene más de 100 aminoácidos contiguos, preferiblemente menos de 80 aminoácidos contiguos, más preferiblemente menos de 50 aminoácidos contiguos y aún más preferiblemente no más de 15 aminoácidos contiguos del polipéptido TTR.

Polinucleótidos:

El término "polinucleótido" pretende abarcar un ácido nucleico singular así como varios ácidos nucleicos, y se refiere a una molécula o constructo de ácido nucleico aislado, por ejemplo, ARN mensajero (ARNm) o ADN plasmídico (ADN)p. Un polinucleótido puede comprender un enlace fosfodiéster convencional o un enlace no convencional (por ejemplo, un enlace amida, como el que se encuentra en los ácidos nucleicos peptídicos (PNA)). El término "ácido nucleico" se refiere a uno o más segmentos de ácido nucleico, por ejemplo, fragmentos de ADN o ARN, presentes en un polinucleótido. Por ácido nucleico o polinucleótido "aislado" se entiende una molécula de ácido nucleico, ADN o ARN, que se ha eliminado de su entorno nativo. Por ejemplo, un polinucleótido recombinante que codifica un anticuerpo contenido en un vector se considera aislado para los propósitos de la presente invención. Otros ejemplos de un polinucleótido aislado incluyen polinucleótidos recombinantes mantenidos en células huésped heterólogas o polinucleótidos purificados (parcial o sustancialmente) en solución. Las moléculas de ARN aisladas incluyen transcritos de ARN *in vivo* o *in vitro* de polinucleótidos de la presente invención. Los polinucleótidos o ácidos nucleicos aislados de acuerdo con la presente invención incluyen además tales moléculas producidas sintéticamente. Además, un polinucleótido o un ácido nucleico puede ser o puede incluir un elemento regulador, tal como un promotor, un sitio de unión al ribosoma o un terminador de transcripción.

Como se usa en el presente documento, una "región codificante" es una porción de ácido nucleico que consta de codones traducidos en aminoácidos. Aunque un "codón de parada" (TAG, TGA o TAA) no se traduce en un aminoácido, se puede considerar que forma parte de una región codificante, pero cualquier secuencia flanqueante, por ejemplo, promotores, sitios de unión a ribosomas, terminadores transcripcionales, intrones y similares no forman parte de una región codificante. Pueden estar presentes dos o más regiones codificantes de la presente invención en un único constructo polinucleotídico, por ejemplo, en un solo vector, o en constructos polinucleotídicos separados, por ejemplo, en vectores separados (diferentes). Además, cualquier vector puede contener una única región codificante, o puede comprender dos o más regiones codificantes, por ejemplo, un único vector puede codificar por separado una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina y una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina. Además, un vector, polinucleótido o ácido nucleico de la invención puede codificar regiones codificantes heterólogas, fusionadas o no fusionadas con un ácido nucleico que codifica una molécula de unión, un anticuerpo o fragmento, variante o derivado del mismo. Las regiones codificantes heterólogas incluyen, sin limitación, elementos o motivos especializados, tales como un péptido señal secretor o un dominio funcional heterólogo.

En determinadas realizaciones, el polinucleótido o ácido nucleico es ADN. En el caso del ADN, un polinucleótido que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido normalmente puede incluir un promotor y/u otros elementos de control de la transcripción o traducción operables asociados con una o más regiones codificantes. Una asociación operable es cuando una región codificante para un producto génico, por ejemplo, un polipéptido, se asocia con una o más secuencias reguladoras de tal manera que coloque la expresión del producto génico bajo la influencia o el control de la secuencia o secuencias reguladoras. Dos fragmentos de ADN (tales como una región codificante de polipéptido y un promotor asociado con el mismo) están "operativamente asociados" o "operativamente ligados" si la inducción de la función del promotor da como resultado la transcripción del ARNm que codifica el producto génico deseado y si la

naturaleza del enlace entre los dos fragmentos de ADN no interfieren con la capacidad de las secuencias reguladoras de la expresión para dirigir la expresión del producto génico o interfieren con la capacidad de transcripción de la plantilla de ADN. Por lo tanto, una región promotora sería operable asociada con un ácido nucleico que codifica un polipéptido si el promotor fuera capaz de efectuar la transcripción de ese ácido nucleico. El promotor puede ser un promotor específico de la célula que dirige la transcripción sustancial del ADN solo en células predeterminadas. Otros elementos de control de la transcripción, además de un promotor, por ejemplo potenciadores, operadores, represores y señales de terminación de la transcripción, pueden operarse asociados con el polinucleótido para dirigir la transcripción específica de la célula. En este documento se describen promotores adecuados y otras regiones de control de la transcripción.

Una "molécula de unión" como se usa en el contexto de la presente invención se refiere principalmente a anticuerpos y fragmentos de los mismos.

Anticuerpos:

Los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina" se usan indistintamente en el presente documento. Un anticuerpo o inmunoglobulina es una molécula de unión que comprende al menos el dominio variable de una cadena pesada y normalmente comprende al menos los dominios variables de una cadena pesada y una cadena ligera. Las estructuras básicas de inmunoglobulina en sistemas de vertebrados se conocen relativamente bien; véase, por ejemplo, Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988).

Como se discutirá con más detalle a continuación, el término "inmunoglobulina" comprende varias clases amplias de polipéptidos que pueden distinguirse bioquímicamente. Los expertos en la técnica apreciarán que las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon (γ , μ , α , δ , ϵ) con algunas subclases entre ellas (por ejemplo, $\gamma 1$ - $\gamma 4$). Es la naturaleza de esta cadena la que determina la "clase" del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgG o IgE, respectivamente. Las subclases de inmunoglobulinas (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, etc., están bien caracterizadas y se sabe que confieren especialización funcional. Las versiones modificadas de cada una de estas clases e isotipos son fácilmente discernibles para el experto en la materia a la vista de la presente divulgación y, por consiguiente, están dentro del alcance de la presente invención. Todas las clases de inmunoglobulinas están claramente dentro del alcance de la presente invención, la siguiente discusión se dirigirá generalmente a la clase IgG de moléculas de inmunoglobulina. Con respecto a la IgG, una molécula de inmunoglobulina estándar comprende dos polipéptidos de cadena ligera idénticos de peso molecular aproximadamente 23.000 Dalton y dos polipéptidos de cadena pesada idénticos de peso molecular 53.000-70.000. Las cuatro cadenas están típicamente unidas por enlaces disulfuro en una configuración "Y" en la que las cadenas ligeras rodean las cadenas pesadas comenzando en la boca de la "Y" y continuando a través de la región variable.

Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda (κ , λ). Cada clase de cadena pesada puede unirse con una cadena ligera kappa o lambda. En general, las cadenas ligeras y pesadas están unidas covalentemente entre sí, y las porciones de "cola" de las dos cadenas pesadas están unidas entre sí mediante enlaces disulfuro covalentes o enlaces no covalentes cuando las inmunoglobulinas son generadas por hibridomas, células B o células huésped modificadas genéticamente. En la cadena pesada, las secuencias de aminoácidos van desde un extremo terminal N en los extremos bifurcados de la configuración Y hasta el extremo terminal C en la parte inferior de cada cadena.

Tanto las cadenas ligera como pesada se dividen en regiones de homología estructural y funcional. Los términos "constante" y "variable" se utilizan funcionalmente. A este respecto, se apreciará que los dominios variables de las porciones de la cadena ligera (V_L) y pesada (V_H) determinan el reconocimiento y la especificidad del antígeno. Por el contrario, los dominios constantes de la cadena ligera (CL) y la cadena pesada ($CH1$, $CH2$ o $CH3$) confieren importantes propiedades biológicas tales como secreción, movilidad transplacentaria, unión al receptor Fc, unión al complemento y similares. Por convención, la numeración de los dominios de la región constante aumenta a medida que se vuelven más distales del sitio de unión a antígeno o del extremo amino del anticuerpo. La porción del terminal N es una región variable y en la porción del terminal C es una región constante; los dominios $CH3$ y CL comprenden realmente el extremo terminal carboxilo de la cadena pesada y ligera, respectivamente.

Como se indicó anteriormente, la región variable permite que el anticuerpo reconozca selectivamente y se una específicamente a epítopos en antígenos. Es decir, el dominio V_L y el dominio V_H , o subconjunto de las regiones determinantes de complementariedad (CDR), de un anticuerpo se combinan para formar la región variable que define un sitio tridimensional de unión a antígeno. Esta estructura de anticuerpo cuaternario forma el sitio de unión a antígeno presente al final de cada brazo de la Y. Más específicamente, el sitio de unión a antígeno está definido por tres CDR en cada una de las cadenas V_H y V_L . Cualquier anticuerpo o fragmento de inmunoglobulina que contenga una estructura suficiente para unirse específicamente a TTR se indica en el presente documento de manera intercambiable como un "fragmento de unión" o un "fragmento inmuno-específico".

En los anticuerpos de origen natural, un anticuerpo comprende seis regiones hipervariables, a veces denominadas "regiones determinantes de complementariedad" o "CDR" presentes en cada dominio de unión a antígeno, que son secuencias cortas no contiguas de aminoácidos que están específicamente posicionadas para formar el dominio de unión a antígeno cuando el anticuerpo asume su configuración tridimensional en un entorno acuoso. Las "CDR" están

flanqueadas por cuatro regiones "marco" relativamente conservadas o "FR" que muestran menos variabilidad intermolecular. Las regiones marco adoptan en gran medida una conformación de lámina β y las CDR forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de la estructura de la lámina β . Por lo tanto, las regiones marco actúan para formar un andamio que proporciona el posicionamiento de las CDR en la orientación correcta mediante interacciones no covalentes entre cadenas. El dominio de unión a antígeno formado por las CDR posicionadas define una superficie complementaria al epítipo del antígeno inmunorreactivo. Esta superficie complementaria promueve la unión no covalente del anticuerpo a su epítipo análogo. Los aminoácidos que comprenden las CDR y las regiones marco, respectivamente, pueden identificarse fácilmente para cualquier región variable de cadena pesada o ligera dada por un experto en la técnica, ya que se han definido con precisión; véase "Sequences of Proteins of Immunological Interest," Kabat, E., et al., Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, (1983); y Chothia y Lesk, J. Mol. Biol., 196 (1987), 901-917.

En el caso de que haya dos o más definiciones de un término que se use y/o acepte en la técnica, la definición del término como se usa en este documento pretende incluir todos esos significados a menos que se indique explícitamente lo contrario. Un ejemplo específico es el uso del término "región determinante de complementariedad" ("CDR") para describir los sitios de combinación de antígenos no contiguos que se encuentran dentro de la región variable de polipéptidos de cadena pesada y ligera. Esta región particular ha sido descrita por Kabat et al., Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983) y por Chothia y Lesk, J. Mol. Biol., 196 (1987), 901-917, en las que las definiciones incluyen superposiciones o subconjuntos de residuos de aminoácidos cuando se comparan entre sí. No obstante, la aplicación de cualquiera de las definiciones para hacer referencia a una CDR de un anticuerpo o variantes del mismo se pretende que esté dentro del alcance del término tal como se define y usa en el presente documento. Los residuos de aminoácidos apropiados que abarcan las CDR como se define en cada una de las referencias citadas anteriormente se exponen a continuación en la Tabla I como comparación. Los números exactos de residuos que abarcan una CDR particular variarán dependiendo de la secuencia y el tamaño de la CDR. Los expertos en la técnica pueden determinar de forma rutinaria qué residuos comprenden una región hipervariable o CDR particular del subtipo de anticuerpo IgG humano dada la secuencia de aminoácidos de la región variable del anticuerpo.

Tabla I: Definiciones de CDR ¹		Kabat	Chothia
VH CDR1		31-35	26-32
VH CDR2		50-65	52-58
VH CDR3		95-102	95-102
VL CDR1		24-34	26-32
VL CDR2		50-56	50-52
VL CDR3		89-97	91-96
¹ La numeración de todas las definiciones de CDR en la Tabla I está de acuerdo con las convenciones de numeración establecidas por Kabat et al., (véase más adelante).			

Kabat et al., también definen un sistema de numeración para secuencias de dominios variables que es aplicable a cualquier anticuerpo. Un experto en la materia puede asignar sin ambigüedades este sistema de "numeración de Kabat" a cualquier secuencia de dominio variable, sin depender de ningún dato experimental más allá de la propia secuencia. Como se usa en el presente documento, "numeración de Kabat" se refiere al sistema de numeración establecido por Kabat et al., Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, "Sequence of Proteins of Immunological Interest" (1983). A menos que se especifique lo contrario, las referencias a la numeración de posiciones específicas de residuos de aminoácidos en un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo de la presente invención están de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat, que sin embargo es teórico y puede no aplicarse igualmente a cada anticuerpo de la presente invención. Por ejemplo, dependiendo de la posición de la primera CDR, las siguientes CDR podrían desplazarse en cualquier dirección.

Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno, fragmentos inmuno-específicos, variantes o derivados de los mismos de la invención incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos policlonales, monoclonales, multispecíficos, humanos, humanizados, primatizados, murinizados o quiméricos, anticuerpos de cadena sencilla, fragmentos de unión a epítipo, por ejemplo, Fab, Fab' y F(ab')₂, Fd, Fv, Fv de cadena sencilla (scFv), anticuerpos de cadena sencilla, Fv unidos por disulfuro (sdFv), fragmentos que comprenden ya sea un dominio V_L o V_H, fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab y anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) (que incluyen, por ejemplo, anticuerpos anti-Id para los anticuerpos descritos en este documento). Las moléculas de scFv son conocidas en la técnica y se describen, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos No. 5.892.019. Las moléculas de inmunoglobulina o anticuerpos de la invención pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina.

En una realización, el anticuerpo de la presente invención no es IgM o un derivado del mismo con una estructura pentavalente. En particular, en aplicaciones específicas de la presente invención, especialmente en el uso terapéutico, las IgM son menos útiles que las IgG y otros anticuerpos bivalentes o las moléculas de unión correspondientes, ya que las IgM debido a su estructura pentavalente y la falta de maduración por afinidad a menudo muestran reactividades cruzadas inespecíficas y una muy baja afinidad.

El anticuerpo de la presente invención no es un anticuerpo policlonal, es decir, consiste sustancialmente en una especie de anticuerpo particular en lugar de ser una mezcla obtenida de una muestra de inmunoglobulina plasmática.

Los fragmentos de anticuerpos, incluidos los anticuerpos de cadena sencilla, pueden comprender la región o regiones variables solas o en combinación con la totalidad o una parte de lo siguiente: región bisagra, dominios CH1, CH2 y CH3. También se incluyen en la invención fragmentos de unión a TTR que comprenden cualquier combinación de región o regiones variables con una región bisagra, dominios CH1, CH2 y CH3.

En un aspecto, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo monoclonal humano aislado de un ser humano. Opcionalmente, la región marco del anticuerpo humano se alinea y adopta de acuerdo con las secuencias de la región variable de la línea germinal humana pertinentes en la base de datos; véase, por ejemplo, Vbase (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) alojada por el MRC Center for Protein Engineering (Cambridge, Reino Unido). Por ejemplo, los aminoácidos que se considera que se desvían potencialmente de la secuencia de la línea germinal verdadera podrían deberse a las secuencias del cebador de PCR incorporadas durante el proceso de clonación. En comparación con los anticuerpos de tipo humano generados artificialmente, tales como los fragmentos de anticuerpos de cadena sencilla (scFv) de una biblioteca de anticuerpos presentada en fagos o ratones xenogénicos, el anticuerpo monoclonal humano de la presente invención se caracteriza porque (i) se obtiene usando la respuesta inmune humana en lugar de aquella de sustitutos de animales, es decir, el anticuerpo se ha generado en respuesta a TTR natural en su conformación relevante en el cuerpo humano, (ii) habiendo protegido al individuo o es al menos significativo para la presencia de TTR, y (iii) dado que el anticuerpo es de origen humano se minimizan los riesgos de reactividad cruzada contra autoantígenos. Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención, los términos "anticuerpo monoclonal humano", "autoanticuerpo monoclonal humano", "anticuerpo humano" y similares se utilizan para indicar una molécula de unión a TTR que es de origen humano, es decir, que se ha aislado de una célula humana tal como una célula B o un hibridoma de la misma o cuyo ADNc se ha clonado directamente a partir de ARNm de una célula humana, por ejemplo, una célula B de memoria humana. Un anticuerpo humano sigue siendo "humano", es decir, de origen humano incluso si se realizan sustituciones de aminoácidos en el anticuerpo, por ejemplo, para mejorar las características de unión.

En una realización, los anticuerpos de origen humano de la presente invención comprenden regiones heterólogas en comparación con los anticuerpos de origen natural, por ejemplo, sustituciones de aminoácidos en la región marco, región constante fusionada exógenamente a la región variable, diferentes aminoácidos en los extremos terminales C o N y similares.

Los anticuerpos derivados de bibliotecas de inmunoglobulina humana o de animales transgénicos para una o más inmunoglobulinas humanas y que no expresan inmunoglobulinas endógenas, como se describe más adelante y, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos N° 5.939.598 de Kucherlapati et al., se denominan anticuerpos de tipo humano con el fin de distinguirlos de los anticuerpos verdaderamente humanos de la presente invención.

Por ejemplo, el apareamiento de cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos de tipo humano tales como anticuerpos sintéticos y semisintéticos típicamente aislados de la presentación en fagos no refleja necesariamente el apareamiento original tal como ocurrió en la célula B humana original. Por consiguiente, los fragmentos Fab y scFv obtenidos a partir de bibliotecas de expresión recombinante como se usan comúnmente en la técnica anterior pueden considerarse artificiales con todos los posibles efectos asociados sobre la inmunogenicidad y la estabilidad.

Por el contrario, la presente invención proporciona anticuerpos aislados madurados por afinidad de sujetos humanos seleccionados, que se caracterizan por su utilidad terapéutica y su tolerancia en el hombre.

Como se usa en este documento, el término "anticuerpo rodentizado" o "inmunoglobulina rodentizada" se refiere a un anticuerpo que comprende una o más CDR de un anticuerpo humano de la presente invención; y una región marco humana que contiene sustituciones y/o eliminaciones y/o inserciones de aminoácidos que se basan en una secuencia de anticuerpo de roedor. Cuando se hace referencia a roedores, se utilizan preferiblemente secuencias que se originan en ratones y ratas, en las que los anticuerpos que comprenden tales secuencias se denominan "murinizados" o "ratinizados" respectivamente. La inmunoglobulina humana que proporciona las CDR se denomina "parental" o "aceptora" y el anticuerpo de roedor que proporciona los cambios del marco se denomina "donante". No es necesario que estén presentes regiones constantes, pero si lo están, normalmente son sustancialmente idénticas a las regiones constantes de anticuerpos de roedores, es decir, al menos aproximadamente del 85% al 90%, preferiblemente aproximadamente el 95% o más idénticas. Por lo tanto, en algunas realizaciones, una inmunoglobulina de cadena ligera o pesada humana murinizada de longitud completa contiene una región constante de ratón, CDR humanas y un marco sustancialmente humano que tiene varias sustituciones de aminoácidos "murinizadas". Normalmente, un "anticuerpo murinizado" es un anticuerpo que comprende una cadena ligera variable murinizada y/o una cadena pesada variable murinizada. Por ejemplo, un anticuerpo murinizado no abarcaría un anticuerpo quimérico típico, por

ejemplo, porque la región variable completa de un anticuerpo quimérico no es de ratón. Un anticuerpo modificado que ha sido "murinizado" mediante el proceso de "murinización" se une al mismo antígeno que el anticuerpo parental que proporciona las CDR y normalmente es menos inmunogénico en ratones, en comparación con el anticuerpo parental. Las explicaciones anteriores con respecto a los anticuerpos "murinizados" se aplican de manera análoga a los anticuerpos "rodentizados", tales como los "anticuerpos ratinizados", en los que se utilizan secuencias de rata en lugar de las murinas.

Como se usa en este documento, el término "porción de cadena pesada" incluye secuencias de aminoácidos derivadas de una cadena pesada de inmunoglobulina. Un polipéptido que comprende una porción de cadena pesada comprende al menos uno de: un dominio CH1, un dominio bisagra (por ejemplo, región de bisagra superior, media y/o inferior), un dominio CH2, un dominio CH3 o una variante o fragmento del mismo. Por ejemplo, un polipéptido de unión para usar en la invención puede comprender una cadena polipeptídica que comprende un dominio CH1; una cadena polipeptídica que comprende un dominio CH1, al menos una parte de un dominio bisagra y un dominio CH2; una cadena polipeptídica que comprende un dominio CH1 y un dominio CH3; una cadena polipeptídica que comprende un dominio CH1, al menos una parte de un dominio bisagra y un dominio CH3, o una cadena polipeptídica que comprende un dominio CH1, al menos una parte de un dominio bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3. En otra realización, un polipéptido de la invención comprende una cadena polipeptídica que comprende un dominio CH3. Además, un polipéptido de unión para su uso en la invención puede carecer de al menos una parte de un dominio CH2 (por ejemplo, todo o parte de un dominio CH2). Como se expuso anteriormente, un experto en la técnica entenderá que estos dominios (por ejemplo, las porciones de cadena pesada) pueden modificarse de manera que varíen en la secuencia de aminoácidos de la molécula de inmunoglobulina de origen natural.

En ciertos anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos descritos en este documento, las porciones de cadena pesada de una cadena polipeptídica de un multímero son idénticas a las de una segunda cadena polipeptídica del multímero. Alternativamente, los monómeros de la invención que contienen porciones de cadena pesada no son idénticos. Por ejemplo, cada monómero puede comprender un sitio de unión objetivo diferente, formando, por ejemplo, un anticuerpo o diacuerpo biespecífico.

En otra realización, los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos descritos en este documento están compuestos de una única cadena polipeptídica tal como scFv y deben expresarse intracelularmente (intracuerpos) para posibles aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico *in vivo*.

Las porciones de cadena pesada de un polipéptido de unión para uso en los métodos de diagnóstico y tratamiento descritos en este documento pueden derivarse de diferentes moléculas de inmunoglobulina. Por ejemplo, una porción de cadena pesada de un polipéptido puede comprender un dominio CH1 derivado de una molécula de IgG1 y una región bisagra derivada de una molécula de IgG3. En otro ejemplo, una porción de cadena pesada puede comprender una región bisagra derivada, en parte, de una molécula de IgG1 y, en parte, de una molécula de IgG3. En otro ejemplo, una porción de cadena pesada puede comprender una bisagra quimérica derivada, en parte, de una molécula de IgG1 y, en parte, de una molécula de IgG4.

Como se usa en este documento, el término "porción de cadena ligera" incluye secuencias de aminoácidos derivadas de una cadena ligera de inmunoglobulina. Preferiblemente, la porción de cadena ligera comprende al menos uno de un dominio VL o CL.

Se cree que el tamaño mínimo de un péptido o epítipo polipeptídico para un anticuerpo es de aproximadamente cuatro a cinco aminoácidos. Los epítipos de péptidos o polipéptidos contienen preferiblemente al menos siete, más preferiblemente al menos nueve y lo más preferiblemente entre al menos aproximadamente 15 y aproximadamente 30 aminoácidos. Dado que una CDR puede reconocer un péptido o polipéptido antigénico en su forma terciaria, los aminoácidos que comprenden un epítipo no necesitan ser contiguos y, en algunos casos, puede que ni siquiera estén en la misma cadena peptídica. En la presente invención, un epítipo peptídico o polipeptídico reconocido por los anticuerpos de la presente invención contiene una secuencia de al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, más preferiblemente al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, o entre aproximadamente 15 y aproximadamente 30 aminoácidos contiguos o no contiguos de TTR.

Por "unión específica", o "reconocimiento específico", usados indistintamente en el presente documento, generalmente se quiere decir que una molécula de unión, por ejemplo, un anticuerpo se une a un epítipo a través de su dominio de unión a antígeno, y que la unión implica cierta complementariedad entre el dominio de unión a antígeno y el epítipo. De acuerdo con esta definición, se dice que un anticuerpo "se une específicamente" a un epítipo cuando se une a ese epítipo, a través de su dominio de unión a antígeno, más fácilmente de lo que se uniría a un epítipo aleatorio no relacionado. El término "especificidad" se usa en este documento para calificar la afinidad relativa por la que un determinado anticuerpo se une a un cierto epítipo. Por ejemplo, se puede considerar que el anticuerpo "A" tiene una mayor especificidad por un epítipo dado que el anticuerpo "B", o se puede decir que el anticuerpo "A" se une al epítipo "C" con una especificidad más alta que la que tiene por el epítipo "D" relacionado.

Cuando esté presente, el término "características de unión inmunológica" u otras características de unión de un anticuerpo con un antígeno, en todas sus formas gramaticales, se refiere a la especificidad, afinidad, reactividad

cruzada y otras características de unión de un anticuerpo.

Por "unión preferencial" se entiende que la molécula de unión, por ejemplo, el anticuerpo se une específicamente a un epítipo más fácilmente de lo que se uniría a un epítipo relacionado, similar, homólogo o análogo. Por lo tanto, un anticuerpo que "se une preferentemente" a un epítipo dado se unirá más probablemente a ese epítipo que a un epítipo relacionado, incluso aunque tal anticuerpo pueda reaccionar de forma cruzada con el epítipo relacionado.

A modo de ejemplo no limitativo, se puede considerar que una molécula de unión, por ejemplo, un anticuerpo se une a un primer epítipo preferentemente si une dicho primer epítipo con una constante de disociación (K_D) que es menor que la K_D del anticuerpo para el segundo epítipo. En otro ejemplo no limitante, se puede considerar que un anticuerpo se une a un primer antígeno preferentemente si se une al primer epítipo con una afinidad que es al menos un orden de magnitud menor que la K_D del anticuerpo por el segundo epítipo. En otro ejemplo no limitante, se puede considerar que un anticuerpo se une a un primer epítipo preferentemente si se une al primer epítipo con una afinidad que es al menos dos órdenes de magnitud menor que la K_D del anticuerpo por el segundo epítipo.

En otro ejemplo no limitante, se puede considerar que una molécula de unión, por ejemplo, un anticuerpo se une a un primer epítipo preferentemente si se une al primer epítipo con una constante de disociación (k (disociación)) que es menor que la k (disociación) del anticuerpo para el segundo epítipo. En otro ejemplo no limitante, se puede considerar que un anticuerpo se une a un primer epítipo preferentemente si se une al primer epítipo con una afinidad que es al menos un orden de magnitud menor que la k (disociación) del anticuerpo por el segundo epítipo. En otro ejemplo no limitante, se puede considerar que un anticuerpo se une a un primer epítipo preferentemente si se une al primer epítipo con una afinidad que es al menos dos órdenes de magnitud menor que la k (disociación) del anticuerpo por el segundo epítipo.

Se puede decir que una molécula de unión, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado descrito en el presente documento, se une a TTR o un fragmento, variante o conformación específica del mismo con una velocidad de disociación (k (disociación)) de menos que o igual a $5 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, 10^{-2} s^{-1} , $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ o 10^{-3} s^{-1} . Más preferiblemente, se puede decir que un anticuerpo de la invención se une a TTR o un fragmento, variante o conformación específica del mismo con una velocidad de disociación (k (disociación)) menor o igual a $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, 10^{-4} s^{-1} , $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, o 10^{-5} s^{-1} , $5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$, 10^{-6} s^{-1} , $5 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ o 10^{-7} s^{-1} .

Se puede decir que una molécula de unión, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado descrito en el presente documento, se une a TTR o un fragmento, variante o conformación específica del mismo con una velocidad de asociación (k (asociación)) de mayor que o igual a $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ o $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Más preferiblemente, se puede decir que un anticuerpo de la invención se une a TTR o un fragmento, variante o conformación específica del mismo con una velocidad de asociación (k (asociación)) mayor o igual a $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, o $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ o $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Se dice que una molécula de unión, por ejemplo, un anticuerpo, inhibe competitivamente la unión de un anticuerpo de referencia a un epítipo dado si se une preferentemente a ese epítipo en la medida en que bloquea, hasta cierto grado, la unión del anticuerpo de referencia al epítipo. La inhibición competitiva se puede determinar mediante cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, ensayos de ELISA de competición. Se puede decir que un anticuerpo inhibe competitivamente la unión del anticuerpo de referencia a un epítipo dado en al menos un 90%, al menos un 80%, al menos un 70%, al menos un 60% o al menos un 50%.

Como se usa en este documento, el término "afinidad" se refiere a una medida de la fuerza de la unión de un epítipo individual con la CDR de una molécula de unión, por ejemplo, una molécula de inmunoglobulina; véase, por ejemplo, Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. (1988) en las páginas 27-28. Como se usa en el presente documento, el término "avidez" se refiere a la estabilidad general del complejo entre una población de inmunoglobulinas y un antígeno, es decir, la fuerza de combinación funcional de una mezcla de inmunoglobulinas con el antígeno; véase, por ejemplo, Harlow en las páginas 29-34. La avidez está relacionada tanto con la afinidad de las moléculas de inmunoglobulina individuales en la población con epítopos específicos como con las valencias de las inmunoglobulinas y el antígeno. Por ejemplo, la interacción entre un anticuerpo monoclonal bivalente y un antígeno con una estructura de epítipo muy repetida, como un polímero, sería de gran avidez. La afinidad o avidez de un anticuerpo por un antígeno se puede determinar experimentalmente usando cualquier método adecuado; véase, por ejemplo, Berzofsky et al., "Antibody-Antigen Interactions" en *Fundamental Immunology*, Paul, WE, Ed., Raven Press Nueva York, NY (1984), Kuby, Janis Immunology, WH Freeman and Company Nueva York, NY (1992) y los métodos descritos en este documento. Las técnicas generales para medir la afinidad de un anticuerpo por un antígeno incluyen ELISA, RIA y resonancia de plasmón de superficie. La afinidad medida de una interacción anticuerpo-antígeno particular puede variar si se mide en diferentes condiciones, por ejemplo, concentración de sal, pH. Por lo tanto, las mediciones de afinidad y otros parámetros de unión a antígeno, por ejemplo, K_D , IC_{50} , se realizan preferiblemente con soluciones estandarizadas de anticuerpo y antígeno, y un tampón estandarizado.

Las moléculas de unión, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de las mismas de la invención también se pueden describir o especificar en términos de su reactividad cruzada. Como se usa en el presente documento, el término "reactividad cruzada" se refiere a la capacidad de un anticuerpo, específico

para un antígeno, de reaccionar con un segundo antígeno; una medida de relación entre dos sustancias antigénicas diferentes. Por lo tanto, un anticuerpo tiene reactividad cruzada si se une a un epítipo distinto del que indujo su formación. El epítipo de reactividad cruzada generalmente contiene muchas de las mismas características estructurales complementarias que el epítipo inductor y, en algunos casos, puede encajar mejor que el original.

Por ejemplo, ciertos anticuerpos tienen cierto grado de reactividad cruzada, ya que se unen a epítopos relacionados pero no idénticos, por ejemplo, epítopos con al menos 95%, al menos 90%, al menos 85%, al menos 80 %, al menos 75%, al menos 70%, al menos 65%, al menos 60%, al menos 55% y al menos 50% de identidad (calculado usando métodos conocidos en la técnica y descritos en este documento) con un epítipo de referencia . Se puede decir que un anticuerpo tiene poca o ninguna reactividad cruzada si no se une a epítopos con menos del 95%, menos del 90%, menos del 85%, menos del 80%, menos del 75%, menos del 70%, menos del 65%, menos del 60%, menos del 55% y menos del 50% de identidad (calculado usando métodos conocidos en la técnica y descritos en el presente documento) a un epítipo de referencia. Un anticuerpo puede considerarse "altamente específico" para un cierto epítipo, si no se une a ningún otro análogo, ortólogo u homólogo de ese epítipo.

Las moléculas de unión, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de las mismas de la invención también pueden describirse o especificarse en términos de su afinidad de unión a TTR y/o especies de TTR mutadas, mal plegadas, mal ensambladas y/o agregadas y/o fragmentos de las mismas. Las afinidades de unión preferidas incluyen aquellas con una constante de disociación o K_d menor que 5×10^{-2} M, 10^{-2} M, 5×10^{-3} M, 10^{-3} M, 5×10^{-4} M, 10^{-4} M, 5×10^{-5} M, 10^{-5} M, 5×10^{-6} M, 10^{-6} M, 5×10^{-7} M, 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 10^{-12} M, 5×10^{-13} M, 10^{-13} M, 5×10^{-14} M, 10^{-14} M, 5×10^{-15} M, o 10^{-15} M.

En una realización, el anticuerpo de la presente invención tiene una K_d para diferentes isoformas de TTR como se ilustra para los ejemplos de anticuerpos en la Tabla V a continuación, es decir, una K_d de > 300 nM para la TTR nativa de tipo silvestre y/o una K_d de ≤ 15 nM, preferiblemente ≤ 5 nM, y más preferiblemente ≤ 2 nM para TTR desnaturalizada, y/o una K_d de ≤ 35 nM, preferiblemente de ≤ 20 nM para TTR-V30M nativa, y/o una K_d de ≤ 150 nM, preferiblemente de ≤ 5 nM, y lo más preferiblemente ≤ 2 nM para TTR-L55P nativa.

Como se indicó anteriormente, las estructuras de subunidades y la configuración tridimensional de las regiones constantes de las diversas clases de inmunoglobulinas son bien conocidas. Como se usa en este documento, el término "dominio V_H " incluye el dominio variable del terminal amino de una cadena pesada de inmunoglobulina y el término "dominio $CH1$ " incluye el primer dominio de región constante (principalmente del terminal amino) de una cadena pesada de inmunoglobulina. El dominio $CH1$ es adyacente al dominio V_H y es el terminal amino a la región bisagra de una molécula de cadena pesada de inmunoglobulina.

Como se usa en este documento, el término "dominio $CH2$ " incluye la porción de una molécula de cadena pesada que se extiende, por ejemplo, desde aproximadamente el residuo 244 al residuo 360 de un anticuerpo usando esquemas de numeración convencionales (residuos 244 a 360, sistema de numeración de Kabat; y residuos 231-340, sistema de numeración de la UE; véase Kabat EA et al., en la obra citada). El dominio $CH2$ es único en el sentido de que no está estrechamente emparejado con otro dominio. Más bien, se interponen dos cadenas de carbohidratos ramificadas unidas a N entre los dos dominios $CH2$ de una molécula de IgG nativa intacta. También está bien documentado que el dominio $CH3$ se extiende desde el dominio $CH2$ hasta el extremo terminal C de la molécula de IgG y comprende aproximadamente 108 residuos.

Como se usa en este documento, el término "región bisagra" incluye la porción de una molécula de cadena pesada que une el dominio $CH1$ al dominio $CH2$. Esta región bisagra comprende aproximadamente 25 residuos y es flexible, lo que permite que las dos regiones de unión a antígeno del extremo terminal N se muevan de forma independiente. Las regiones bisagra se pueden subdividir en tres dominios distintos: dominios bisagra superior, medio e inferior; véase Roux et al., J. Immunol. 161 (1998), 4083-4090.

Como se usa en este documento, el término "enlace disulfuro" incluye el enlace covalente formado entre dos átomos de azufre. El aminoácido cisteína comprende un grupo tiol que puede formar un enlace disulfuro o puente con un segundo grupo tiol. En la mayoría de las moléculas de IgG de origen natural, las regiones $CH1$ y CL están unidas por un enlace disulfuro y las dos cadenas pesadas están unidas por dos enlaces disulfuro en las posiciones correspondientes a 239 y 242 utilizando el sistema de numeración de Kabat (posición 226 o 229, sistema de numeración de la UE).

Como se usa en este documento, los términos "enlazado", "fusionado" o "fusión" se usan indistintamente. Estos términos se refieren a la unión de dos elementos o componentes más, por cualquier medio que incluya conjugación química o medios recombinantes. Una "fusión en el marco" se refiere a la unión de dos o más marcos de lectura abiertos (ORF) de polinucleótidos para formar un ORF continuo más largo, de una manera que mantiene el marco de lectura de traducción correcto de los ORF originales. Por lo tanto, una proteína de fusión recombinante es una única proteína que contiene dos o más segmentos que corresponden a polipéptidos codificados por los ORF originales (segmentos que normalmente no están unidos de esta manera en la naturaleza). Aunque el marco de lectura se hace así continuo a lo largo de los segmentos fusionados, los segmentos pueden estar separados física o espacialmente,

por ejemplo, por una secuencia enlazadora en el marco. Por ejemplo, los polinucleótidos que codifican las CDR de una región variable de inmunoglobulina pueden fusionarse, en el marco, pero estar separados por un polinucleótido que codifica al menos una región marco de inmunoglobulina o regiones CDR adicionales, siempre que las CDR "fusionadas" estén traducidas conjuntamente como parte de un polipéptido continuo.

El término "expresión" como se usa en este documento se refiere a un proceso por el cual un gen produce un compuesto bioquímico, por ejemplo, un ARN o polipéptido. El proceso incluye cualquier manifestación de la presencia funcional del gen dentro de la célula, incluyendo, sin limitación, la inactivación del gen, así como la expresión transitoria y la expresión estable. Incluye, sin limitación, la transcripción del gen en ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia (ARNt), ARN pequeño de horquilla (ARNph), ARN pequeño de interferencia (ARNpi) o cualquier otro producto de ARN, y la traducción de ARNm en polipéptido o polipéptidos. Si el producto final deseado es un compuesto bioquímico, la expresión incluye la creación de ese compuesto bioquímico y cualquier precursor. La expresión de un gen produce un "producto génico". Como se usa en el presente documento, un producto génico puede ser un ácido nucleico, por ejemplo, un ARN mensajero producido por la transcripción de un gen, o un polipéptido que se traduce a partir de una transcripción. Los productos génicos descritos en el presente documento incluyen además ácidos nucleicos con modificaciones postranscripcionales, por ejemplo, poliadenilación, o polipéptidos con modificaciones postraduccionales, por ejemplo, metilación, glicosilación, adición de lípidos, asociación con otras subunidades proteicas, escisión proteolítica y similares.

Como se usa en este documento, el término "muestra" se refiere a cualquier material biológico obtenido de un sujeto o paciente. En un aspecto, una muestra puede comprender sangre, líquido peritoneal, CSF, saliva u orina. En otros aspectos, una muestra puede comprender sangre completa, plasma sanguíneo, suero sanguíneo, células B enriquecidas a partir de muestras de sangre y células cultivadas (por ejemplo, células B de un sujeto). Una muestra también puede incluir una biopsia o una muestra de tejido que incluya tejido neural. En otros aspectos más, una muestra puede comprender células completas y/o un lisado de las células. Las muestras de sangre se pueden recolectar mediante métodos conocidos en la técnica. En un aspecto, el sedimento se puede resuspender mediante agitación tipo vórtice a 4 °C en 200 µL de tampón (Tris 20 mM, pH 7.5, Nonidet al 0.5%, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, NaCl 0.1 M, inhibidor de proteasa IX Sigma e inhibidores de la fosfatasa IX Sigma 1 y 2). La suspensión se puede mantener en hielo durante 20 min con agitación tipo vórtice intermitente. Después de centrifugar a 15.000 x g durante 5 min a aproximadamente 4 °C, se pueden almacenar alícuotas de sobrenadante a aproximadamente -70 °C.

Enfermedades:

A menos que se indique lo contrario, los términos "trastorno" y "enfermedad" se usan indistintamente en el presente documento y comprenden cualquier cambio fisiológico no deseado en un sujeto, un animal, un órgano aislado, tejido o célula/cultivo celular.

La amiloidosis por transtiretina (TTR) es un mecanismo fisiopatológico que interviene en muchas enfermedades diferentes que se caracterizan por el depósito anormal de la proteína TTR en varios tejidos como resultado de un cambio estructural (es decir, conformacional) de la proteína TTR. La proteína TTR mal plegada y mal ensamblada es tóxica y ocurre a menudo como consecuencia de mutaciones en el gen TTR. La toxicidad de TTR mal plegada conduce a daños en los tejidos locales, que al acumularse con el tiempo pueden provocar disfunción orgánica e incluso insuficiencia orgánica. Hay muchos tipos de tejidos y órganos que son susceptibles a la amiloidosis por TTR, como el sistema nervioso periférico y autónomo, el corazón, las leptomeninges, los ojos, los tendones, los ligamentos o los riñones. La amplia gama de tejidos que pueden verse afectados por la amiloidosis por TTR es una razón para la diversidad de síntomas que presentan los pacientes con amiloidosis por TTR. De hecho, los pacientes con amiloidosis por TTR se clasifican clínicamente como personas que padecen diferentes enfermedades, de acuerdo con el tejido u órgano más afectado por la amiloidosis por TTR y los síntomas correspondientes.

Sobre esta base, la amiloidosis por TTR se ha clasificado en una forma neuropática, en la que el sistema nervioso periférico y autónomo se ve afectado principalmente y los pacientes presentan principalmente dolor, parestesia, debilidad muscular y disfunción autónoma. También existe una forma cardíaca de amiloidosis por TTR, en la que el corazón se ve afectado principalmente y los pacientes presentan principalmente hipo o hipertensión ortostática, arritmia y cardiomegalia. Estas dos formas no son mutuamente excluyentes y muchos pacientes presentan una combinación de las dos. Cuando la amiloidosis por TTR afecta a otros tejidos, puede producir opacidad vítrea, sequedad ocular o glaucoma, proteinuria, hipertiroidismo, síndrome del túnel carpiano o preeclampsia.

Por lo tanto, en una realización de la presente invención, los anticuerpos de la presente invención, los polinucleótidos, los vectores y/o las células de la presente invención se utilizan para la preparación de una composición farmacéutica o de diagnóstico para tratamiento profiláctico y/o terapéutico de las enfermedades por amiloidosis por TTR, para controlar la progresión de la enfermedad y/o la respuesta al tratamiento, y para el diagnóstico de enfermedades asociadas con la amiloidosis por TTR que comprenden polineuropatía amiloide familiar (FAP), miocardiopatía amiloide familiar (FAC), amiloidosis sistémica senil (SSA), amiloidosis leptomeníngea/del sistema nervioso central (CNS) que incluye enfermedad de Alzheimer, amiloidosis ocular, amiloidosis renal, hipertiroidismo, síndrome del túnel carpiano, desgarras del manguito rotador y estenosis espinal lumbar y preeclampsia.

Tratamiento:

Como se usa en este documento, los términos "tratar" o "tratamiento" se refieren tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas, en las que el objeto es prevenir o ralentizar (disminuir) un cambio o trastorno fisiológico no deseado, tal como el desarrollo de deficiencia cardíaca. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, entre otros, alivio de los síntomas, disminución de la extensión de la enfermedad, estado estabilizado (es decir, sin empeoramiento) de la enfermedad, retraso o enlentecimiento de la progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado patológico, y remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable. "Tratamiento" también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya padecen la afección o trastorno, así como los que son propensos a tener la afección o trastorno o aquellos en los que se debe prevenir la manifestación de la afección o trastorno.

Si no se indica lo contrario, el término "fármaco", "medicina" o "medicamento" se utilizan indistintamente en este documento e incluirán, entre otros, todos los (A) artículos, medicinas y preparaciones para uso interno o externo, y cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinada a ser utilizada para el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento o prevención de enfermedades del hombre o de otros animales; y (B) artículos, medicinas y preparaciones (distintos de los alimentos) destinados a afectar la estructura o cualquier función del cuerpo del hombre o de otros animales; y (C) artículos destinados a ser utilizados como un componente de cualquier artículo especificado en la cláusula (A) y (B). El término "fármaco", "medicina" o "medicamento" incluirá la fórmula completa de la preparación destinada a ser utilizada en el hombre u otros animales que contengan uno o más "agentes", "compuestos", "sustancias" o "composiciones (químicas)" como y en algún otro contexto también otros excipientes farmacéuticamente inactivos como rellenos, desintegrantes, lubricantes, deslizantes, aglutinantes o que garantizan un fácil transporte, desintegración, desagregación, disolución y disponibilidad biológica del "fármaco", "medicina" o "medicamento" en una ubicación objetivo prevista dentro del cuerpo del hombre u otros animales, por ejemplo, en la piel, en el estómago o en el intestino. Los términos "agente", "compuesto" o "sustancia" se usan indistintamente en este documento e incluirán, en un contexto más particular, pero no se limitan a todos los agentes farmacológicamente activos, es decir, agentes que inducen un efecto biológico o farmacológico deseado o son investigados o probados para determinar la capacidad de inducir tal posible efecto farmacológico mediante los métodos de la presente invención.

Por "sujeto" o "individuo" o "animal" o "paciente" o "mamífero" se entiende cualquier sujeto, particularmente un sujeto mamífero, por ejemplo, un paciente humano, para quien se desea el diagnóstico, pronóstico, prevención o terapia.

Vehículos farmacéuticos:

Los vehículos y rutas de administración farmacéuticamente aceptables se pueden tomar de la literatura correspondiente conocida por el experto en la técnica. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden formular de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica; véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (2000) de la Universidad de Ciencias de Filadelfia, ISBN 0-683-306472, Vaccine Protocols 2nd Edition de Robinson et al., Humana Press, Totowa, Nueva Jersey, EE. UU., 2003; Banga, Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing, and Delivery Systems. 2a Edición de Taylor y Francis. (2006), ISBN: 0-8493-1630-8. Los ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones de aceite/agua, varios tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, etc. Las composiciones que comprenden dichos vehículos pueden formularse por métodos convencionales bien conocidos. Estas composiciones farmacéuticas se pueden administrar al sujeto en una dosis adecuada. La administración de las composiciones adecuadas se puede realizar de diferentes formas. Los ejemplos incluyen la administración de una composición que contiene un vehículo farmacéuticamente aceptable por métodos oral, intranasal, rectal, tópico, intraperitoneal, intravenoso, intramuscular, subcutáneo, subdérmico, transdérmico, intratecal e intracraneal. Las formulaciones en aerosol, tales como las formulaciones en aerosol nasal, incluyen soluciones acuosas purificadas u otras soluciones del agente activo con agentes conservantes y agentes isotónicos. Preferiblemente, tales formulaciones se ajustan a un pH y un estado isotónico compatibles con las membranas mucosas nasales. También se prevén en la presente invención composiciones farmacéuticas para administración oral, tales como moléculas de anticuerpos de dominio único (por ejemplo, "nanocuerpos^{MR}"), etc. también están contempladas en la presente invención. Dichas formulaciones orales pueden estar en forma de tableta, cápsula, polvo, líquido o semisólido. Una tableta puede comprender un vehículo sólido, tal como gelatina o un adyuvante. Las formulaciones para administración rectal o vaginal se pueden presentar como un supositorio con un vehículo adecuado; véase también O'Hagan et al., Nature Reviews, Drug Discovery 2 (9) (2003), 727-735. Puede encontrarse orientación adicional con respecto a formulaciones que son adecuadas para varios tipos de administración en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mace Publishing Company, Filadelfia, PA, 17ª ed. (1985) y actualizaciones correspondientes. Para una breve revisión de los métodos para la administración de fármacos, véase Langer, Science 249 (1990), 1527-1533.

II. Anticuerpos de la presente invención

La presente invención se refiere generalmente a anticuerpos anti-TTR de origen humano y fragmentos de unión a antígeno de los mismos como se caracteriza en las reivindicaciones, que preferiblemente demuestran las

características de unión inmunológica y/o propiedades biológicas como se describe para los anticuerpos ilustrados en los Ejemplos. De acuerdo con la presente invención, se clonaron anticuerpos monoclonales humanos específicos para TTR a partir de un grupo de sujetos humanos sanos. Sin embargo, en otra realización de la presente invención, los anticuerpos anti-TTR monoclonales humanos también podrían clonarse a partir de pacientes que muestran síntomas de una enfermedad y/o trastorno asociado con la amiloidosis por TTR.

En el curso de los experimentos realizados de acuerdo con la presente invención, se evaluó la capacidad de los anticuerpos presentes en los medios acondicionados de células B de memoria humana cultivadas para unirse a TTR y a más de otras 10 proteínas, incluida la albúmina de suero bovino (BSA). Solo los sobrenadantes de células B capaces de unirse a la proteína TTR pero no a ninguna de las otras proteínas en el cribado se seleccionaron para análisis adicionales, incluida la determinación de la clase de anticuerpos y la subclase de cadenas ligeras. Las células B seleccionadas se procesaron luego para la clonación de anticuerpos.

En resumen, esto consistió en la extracción de ARN mensajeros de las células B seleccionadas, retrotranscripción por RT-PCR, amplificación de las regiones codificantes de anticuerpos por PCR, clonación en vectores plasmídicos y secuenciación. A continuación, se produjeron anticuerpos humanos seleccionados mediante expresión recombinante en células HEK293 o CHO y purificación, y posteriormente se caracterizaron por su capacidad para unirse a proteína TTR humana. La combinación de varias pruebas, por ejemplo, la expresión recombinante de los anticuerpos en células HEK293 o CHO y la posterior caracterización de sus especificidades de unión hacia la proteína TTR humana, y su unión distintiva a formas patológicamente mal plegadas, mal ensambladas y/o agregadas de las mismas confirmó que por primera vez se han clonado anticuerpos humanos que son altamente específicos para TTR y reconocen de forma distintiva y se unen selectivamente a las formas patológicamente agregadas de la proteína TTR, tales como las fibrillas de TTR. En algunos casos, también se generaron anticuerpos quiméricos de ratón sobre la base de los dominios variables de los anticuerpos humanos de la presente invención. Estos anticuerpos quiméricos de ratón han mostrado igual afinidad, especificidad y selectividad de unión a TTR humana que los anticuerpos humanos como se muestra en las Figuras 6 y 9 y en los Ejemplos 4 y 8.

Por lo tanto, la presente invención se refiere en general a un anticuerpo anti-TTR monoclonal recombinante derivado de origen humanos y a fragmentos de unión, derivados y variantes del mismo como se caracteriza en las reivindicaciones. En una realización de la invención, el anticuerpo es capaz de unirse a TTR humana.

En una realización, la presente invención está dirigida a un anticuerpo anti-TTR, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivados del mismo, en el que el anticuerpo se une específicamente al mismo epítipo de TTR como anticuerpo de referencia seleccionado del grupo que consiste en NI-301.59F1, NI-301.35G11, NI-301.37F1 y NI-301.12D3. El mapeo de epítopos identificó una secuencia dentro de la TTR humana que incluye los aminoácidos 61-EEEFVEGIY-69 (SEQ ID NO: 49) como el epítipo lineal único reconocido por el anticuerpo NI-301.59F1 de esta invención, una secuencia dentro de la TTR humana que incluye los aminoácidos 53-GELHGLTTEEE-63 (SEQ ID NO: 50) como el epítipo lineal único reconocido por el anticuerpo NI-301.35G11 de esta invención, una secuencia dentro de la TTR humana que incluye los aminoácidos 41-WEPFA-45 (SEQ ID NO: 51) como el epítipo lineal único reconocido por el anticuerpo NI-301.37F1 (véase la Figura 10 y el Ejemplo 9). Por lo tanto, en una realización se proporciona el anticuerpo de la presente invención, en el que el anticuerpo se une específicamente a un epítipo de TTR que comprende la secuencia de aminoácidos EEEFVEGIY (SEQ ID NO: 49), GELHGLTTEEE (SEQ ID NO: 50), o WEPFA (SEQ ID NO: 51).

En este contexto, como se explica en el Ejemplo 9, los epítopos de unión de los ejemplos de anticuerpos NI-301.59F1, NI-301.35G11 y NI-301.37F1 se han analizado utilizando un panel de 29 péptidos secuenciales de 15 aminoácidos de longitud y 11 superposiciones de aminoácidos (es decir, primer péptido TTRaa₁₋₁₅; segundo péptido TTRaa₅₋₁₉; etc.), en los que el anticuerpo NI-301.59F1 y NI-301.35G11 reconocen dos péptidos superpuestos, (15 y 16) y (13 y 14), respectivamente, y el anticuerpo NI 301.37F1 reconoce tres péptidos superpuestos (9, 10 y 11); véase el Ejemplo 9 y la Figura 10.

Por lo tanto, con respecto a la secuencia de aminoácidos del polipéptido TTR maduro y el correspondiente mapeo de péptidos, esto significa que el anticuerpo NI-301.59F1 que se une al epítipo EEEFVEGIY (SEQ ID NO: 49) es capaz de reconocer péptidos que tienen la secuencia de aminoácidos GLTTEEEFVEGIYKV (SEQ ID NO: 85) y EEEFVEGIYKVEIDT (SEQ ID NO: 86).

Asimismo, el anticuerpo anti-TTR NI-301.35G11 que se une al epítipo GELHGLTTEEE (SEQ ID NO: 50) es capaz de reconocer péptidos que tienen la secuencia de aminoácidos TSESGELHGLTTEEE (SEQ ID NO: 87) y GELHGLTTEEEFVEG (SEQ ID NO: 88).

De forma similar, el anticuerpo anti-TTR NI-301.37F1 que se une al epítipo WEPFA (SEQ ID NO: 51) es capaz de reconocer péptidos con las secuencias de aminoácidos FRKAADDTWEPFASG (SEQ ID NO: 89), ADDTWEPFASGKTSE (SEQ ID NO: 90) y WEPFASGKTSESGEL (SEQ ID NO: 91).

Por lo tanto, los anticuerpos objetivo de la presente invención ilustrados en los ejemplos son diferentes de los anticuerpos que reconocen cualquiera de los epítopos mencionados en el contexto únicamente de aminoácidos del

terminal N y/o terminal C adicionales. Por lo tanto, en una realización preferida de la presente invención, la unión específica de un anticuerpo anti-TTR a un epítipo de TTR que comprende la secuencia de aminoácidos EEEFVEGIY (SEQ ID NO: 49), GELHGLTTEEE (SEQ ID NO: 50) o WEPFA (SEQ ID NO: 51) se determina con péptidos secuenciales de 15 aminoácidos de longitud y superposición de 11 aminoácidos de acuerdo con el Ejemplo 9 y las Figuras 10A a D.

En este contexto, el mapeo de epítopos extendido realizado de acuerdo con la presente invención y descrito en el Ejemplo 9 usando un panel de 151 péptidos secuenciales de 15 aminoácidos de longitud y 14 superposiciones de aminoácidos, en el que para cada péptido el aminoácido en la posición 10 fue reemplazado por una alanina por aminoácidos que no son alanina, mientras que las alaninas fueron reemplazadas por glicina o prolina reveló que el anticuerpo NI-301.59F1 se une al epítipo EEFXEGIY (TTRaa₆₂₋₆₉) y el anticuerpo NI-301.35G11 se une a ELXGLTXE (TTRaa₅₄₋₆₁) mientras que no se han determinado más requisitos de secuencia para el epítipo del anticuerpo NI-301.37F1. Por consiguiente, en otra realización, la determinación de si un anticuerpo dado se une al mismo epítipo que los anticuerpos NI-301.59F1, NI301.35G11 y NI-301.37F1 se realiza de acuerdo con el Ejemplo 9 y las Figuras 10E a H.

No hace falta decir que el mapeo de epítopos y la determinación de si un anticuerpo dado se une al mismo epítipo que un anticuerpo objetivo usado en el Ejemplo 9 y que se muestra en la Figura 10 también se puede aplicar a cualquier otro anticuerpo anti-TTR de la presente invención descrito en los Ejemplos con la región variable representada en la Figura 1A-1T.

Por consiguiente, la presente invención se refiere generalmente a cualquier anticuerpo anti-TTR y molécula similar a un anticuerpo como se caracteriza en las reivindicaciones, que se une al mismo epítipo que un anticuerpo ilustrado en los Ejemplos y que tiene al menos las CDR y/o región pesada y ligera variable como se muestra en cualquiera de las Figuras 1A-1T.

En una realización adicional, el anticuerpo se une específicamente a la secuencia de aminoácidos GELHGLTTEEE (SEQ ID NO: 50) pero no a GELHGPTTEEE, correspondiente al epítipo mutante de TTR-L55P, o el anticuerpo se une específicamente a la secuencia de aminoácidos WEPFA (SEQ ID NO: 51) pero no WGPFA, correspondiente al epítipo mutante TTR-E42G.

Además, sin pretender quedar ligado a observaciones experimentales iniciales como se demuestra en los Ejemplos 3 a 8 y se muestra en las Figuras 2, 3, 4, 7 y 9, los anticuerpos anti-TTR monoclonales humanos NI-301.59F1, NI-301.35G11, NI-301.37F1 de la presente invención se caracterizan preferiblemente por unirse específicamente a TTR patológica mal plegada, mal ensamblada o agregada y que no reconoce sustancialmente TTR en la forma fisiológica. Por lo tanto, la presente invención proporciona un conjunto de anticuerpos anti-TTR humanos con propiedades de unión particularmente útiles para fines diagnósticos y terapéuticos. Por lo tanto, en una realización, la presente invención proporciona anticuerpos que son capaces de unirse específicamente a formas patológicamente agregadas de TTR.

En una realización, el anticuerpo de la presente invención exhibe las propiedades de unión de los ejemplos de anticuerpos NI-301.59F1, NI-301.35G11 y NI-301.37F1 como se describe en los Ejemplos. El anticuerpo anti-TTR de la presente invención reconoce preferentemente TTR alterada patológicamente, tal como especies de TTR mutadas, mal plegadas, mal ensambladas o agregadas y fragmentos de las mismas en lugar de TTR fisiológica. Por lo tanto, en una realización, el anticuerpo de la presente invención no reconoce sustancialmente especies de TTR fisiológicas.

El término "no reconoce sustancialmente" cuando se usa en la presente solicitud para describir la afinidad de unión de una molécula de un grupo que comprende un anticuerpo, un fragmento del mismo o una molécula de unión para una molécula objetivo específica, antígeno y/o conformación de la molécula objetivo y/o antígeno significa que la molécula del grupo mencionado anteriormente se une a dicha molécula, antígeno y/o conformación con una afinidad de unión que es al menos 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces o 9 veces menor que la afinidad de unión de la molécula del grupo mencionado anteriormente para unirse a otra molécula, antígeno y/o conformación. Muy a menudo, la constante de disociación (KD) se utiliza como medida de la afinidad de unión. A veces, es la EC₅₀ en un ensayo específico como, por ejemplo, un ensayo ELISA que se usa como medida de la afinidad de unión. Preferiblemente, el término "no reconoce sustancialmente" cuando se usa en la presente solicitud significa que la molécula del grupo mencionado anteriormente se une a dicha molécula, antígeno y/o conformación con una afinidad de unión que es al menos 10 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces, 1000 veces o 10000 veces menor que la afinidad de unión de dicha molécula del grupo mencionado anteriormente para unirse a otra molécula, antígeno y/o conformación.

Además, o alternativamente, el anticuerpo anti-TTR de la presente invención se une a formas mal plegadas, mal ensambladas o agregadas de TTR humana que causan enfermedades. En este contexto, las afinidades de unión pueden estar en el intervalo que se muestra para los ejemplos de anticuerpos NI-301.59F1, NI-301.35G11 y NI-301.37F1 en la Figura 2, Figura 10 respectiva, es decir, que tienen la mitad de concentraciones efectivas máximas (EC₅₀) de aproximadamente 1 pM a 500 nM, preferiblemente una EC₅₀ de aproximadamente 50 pM a 100 nM, lo más preferiblemente una EC₅₀ de aproximadamente 1 nM a 20 nM para TTR agregada humana y TTR recombinante

agregada como se muestra para NI-301.59F1 y NI-301.35G11, o una EC_{50} de aproximadamente 100 pM a 1 nM para TTR agregada humana y TTR recombinante agregada como se muestra para NI-301.37F1.

En particular, el anticuerpo anti-TTR, fragmento de unión o derivado del mismo tiene una afinidad de unión correspondiente a un valor de EC_{50} de ≤ 5 nM para la unión de V30M-TTR agregada de tipo silvestre y/o una EC_{50} de ≤ 20 nM, preferiblemente ≤ 10 nM, y lo más preferiblemente ≤ 1 nM para la unión de V30M-TTR agregada; véase el Ejemplo 3 y la Figura 2.

Algunos anticuerpos pueden unirse a una amplia gama de biomoléculas, por ejemplo, proteínas. Como apreciará el experto en la técnica, el término específico se usa en este documento para indicar que otras biomoléculas distintas de las proteínas TTR o fragmentos de las mismas no se unen significativamente a la molécula de unión a antígeno, por ejemplo, uno de los anticuerpos de la presente invención. Preferiblemente, el nivel de unión a una biomolécula distinta de TTR da como resultado una afinidad de unión que es como máximo solo 20% o menos, 10% o menos, solo 5% o menos, solo 2% o menos o solo 1% o menos (es decir, al menos 5, 10, 20, 50 o 100 veces menor, o algo más, de la afinidad por TTR, respectivamente; véase, por ejemplo, la Figura 2).

En una realización, el anticuerpo anti-TTR de la presente invención se une preferentemente a formas agregadas de TTR, TTR mal plegada, TTR mal ensamblada y/o fragmentos, derivados, fibrillas y/u oligómeros de los mismos. En otra realización, el anticuerpo anti-TTR de la presente invención se une preferentemente tanto a TTR nativa como a formas patológicamente mal plegadas, mal ensambladas o agregadas de TTR.

Como se mencionó anteriormente, los depósitos de TTR amorfos y amiloides pueden conducir a diferentes enfermedades dependiendo de en qué parte del cuerpo se produzcan las especies de TTR mal plegadas, mal ensambladas y/o agregadas o fragmentos de las mismas. Por ejemplo, los pacientes con polineuropatía amiloide familiar (FAP) presentan depósitos de TTR principalmente en las fibras nerviosas de pequeño diámetro y, por lo tanto, presentan principalmente síntomas tales como percepciones sensoriales alteradas y disfunciones autonómicas, incluidas disfunciones gastrointestinales o impotencia; los pacientes con miocardiopatía amiloide familiar (FAC) o amiloidosis sistémica senil (SSA) presentan depósitos de TTR principalmente en el corazón y, por lo tanto, presentan síntomas como insuficiencia cardíaca o arritmia cardíaca; los pacientes con depósitos de TTR en los riñones pueden presentar disfunciones renales y proteinuria.

Por lo tanto, en una realización, el anticuerpo de la presente invención es útil para el tratamiento de polineuropatía amiloide familiar (FAP), miocardiopatía amiloide familiar (FAC), amiloidosis sistémica senil (SSA), amiloidosis familiar sistémica, amiloidosis leptomeníngea/del sistema nervioso central (CNS) que incluye enfermedad de Alzheimer, amiloidosis ocular, amiloidosis renal, hipertiroidismo, amiloidosis de ligamentos que incluye síndrome del túnel carpiano, desgarros del manguito rotador y estenosis espinal lumbar y preeclampsia, y síntomas de los mismos.

La presente invención también se refiere a un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivados del mismo, en el que el anticuerpo comprende un dominio de unión a antígeno idéntico al de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en NI-301.59F1, NI-301.35G11, NI-301.37F1, NI-301.2F5, NI-301.28B3, NI-301.119C12, NI-301.5D8, NI-301.9D5, NI-301.104F5, NI-301.21F10, NI-301.9G12, NI-301.12D3, NI-301.44E4, NI-301.18C4, NI-301.11A10, NI-301.3C9, NI-301.14D8, NI-301.9X4 y NI-301.14C3.

La presente invención ejemplifica además varias moléculas de unión, por ejemplo, anticuerpos y fragmentos de unión de los mismos, que se caracterizan por comprender en su región variable, por ejemplo, dominio de unión de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de la región variable V_H y V_L que comprende una cualquiera de las secuencias de aminoácidos representadas en la Figura 1. Las secuencias de nucleótidos correspondientes que codifican las regiones variables identificadas anteriormente se exponen en la Tabla II a continuación. En la Figura 1 se representan ejemplos de conjuntos de CDR de las secuencias de aminoácidos anteriores de la región V_H y/o V_L . Sin embargo, como se discute a continuación, el experto en la técnica es muy consciente del hecho de que además o alternativamente pueden usarse CDR, que difieren en su secuencia de aminoácidos de las expuestas en la Figura 1 en uno, dos, tres o incluso más aminoácidos en el caso de CDR2 y CDR3. Por lo tanto, en una realización, se proporciona el anticuerpo de la presente invención o un fragmento de unión a TTR del mismo que comprende en su región variable las regiones determinantes de complementariedad (CDR) como se muestra en la Figura 1 y/o una o más CDR de las mismas que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos.

En una realización, el anticuerpo de la presente invención es cualquiera de los anticuerpos que comprenden una secuencia de aminoácidos de la región V_H y V_L como se muestra en la Figura 1 o una región V_H y V_L de la misma que comprende una o más sustituciones de aminoácidos. Preferiblemente, el anticuerpo de la presente invención se caracteriza por la conservación del emparejamiento análogo de la cadena pesada y ligera como estaba presente en la célula B humana.

En una realización adicional de la presente invención, el anticuerpo anti-TTR, el fragmento de unión a TTR, su variante sintética o biotecnológica se puede optimizar para que tenga una afinidad de unión apropiada con las propiedades objetivo y farmacocinéticas. Por lo tanto, al menos un aminoácido en la CDR o región variable, que es propenso a modificaciones seleccionadas del grupo que consiste en glicosilación, oxidación, desaminación, escisión de enlaces

peptídicos, formación de isoaspartato y/o cisteína no apareada, se sustituye por un aminoácido mutado que carece de dicha alteración o en el que al menos una fracción de carbohidrato se elimina o se añade química o enzimáticamente al anticuerpo. Se pueden encontrar ejemplos de optimización de aminoácidos en por ejemplo, las solicitudes internacionales WO 2010/121140 y WO 2012/049570. Se describen modificaciones adicionales que optimizan las propiedades del anticuerpo en Gavel et al., Protein Engineering 3 (1990), 433-442 y Helenius et al., Annu. Rev. Biochem. 73 (2004), 1019-1049.

Alternativamente, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, derivado o variante del mismo, que compite por unirse a TTR con al menos uno de los anticuerpos que tienen la región V_H y V_L como se muestra en cualquiera de la Figura 1 A a T.

Los resultados experimentales proporcionados en la Figura 2 y el Ejemplo 3 sugieren que algunos de los anticuerpos anti-TTR de la presente invención se unen preferentemente a formas mal plegadas, mal ensambladas o agregadas de anti-TTR humana sobre las formas fisiológicas de las proteínas. Por lo tanto, en una realización, el anticuerpo de la presente invención reconoce preferentemente TTR mal plegada, mal ensamblada y/o agregada y/o fragmento y/o derivados de la misma sobre la TTR fisiológica.

El anticuerpo de la presente invención puede ser humano, en particular para aplicaciones terapéuticas. Alternativamente, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo de roedor, rodentizado o de roedor-humano quimérico, preferiblemente un anticuerpo murino, murinizado o murino-humano quimérico o un anticuerpo de rata ratinizado o de rata-humano quimérico que son particularmente útiles para métodos de diagnóstico y estudios en animales. En una realización, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo de roedor-humano quimérico o rodentizado.

Además, en una realización, el anticuerpo quimérico de la presente invención, es decir, que comprende los dominios variables de un anticuerpo humano, por ejemplo, NI-301.35G11 y los dominios constantes genéricos ligero y pesado de murino exhiben las propiedades de unión de los ejemplos de anticuerpos quiméricos murinos NI-301.mur35G11 como se describe en los Ejemplos. Además, los anticuerpos quiméricos de ratón de la presente invención se unen con una alta afinidad a la TTR humana como se describe en los Ejemplos 4 y 8. Preferiblemente, la afinidad de unión de los anticuerpos quiméricos es similar a la de sus contrapartes humanas.

En una realización, el anticuerpo de la presente invención se proporciona mediante cultivos de células B simples u oligoclonales que se cultivan y el sobrenadante del cultivo, que contiene anticuerpos producidos por dichas células B, se criba para determinar la presencia y afinidad de anticuerpos anti-TTR en el mismo. El proceso de cribado comprende cribar la unión a agregados monomérico fibrilares o no fibrilares nativos como oligómeros de hTTR derivada de un péptido hTTR sintético de longitud completa o por ejemplo, purificada de plasma humano o expresión recombinante.

Además o alternativamente, el proceso de cribado para determinar la presencia y afinidad de anticuerpos anti-TTR puede comprender las etapas de un ensayo de inmunorreactividad de placa amiloide de tejido sensible (TAPIR) tal como se describe en la solicitud internacional WO 2004/095031. Además, o alternativamente, se pueden realizar cribados en secciones renales, de corazón para detectar la unión a anti-TTR, tal como se describe por analogía en la solicitud internacional WO 2008/081008 para secciones de cerebro y médula espinal.

Como se mencionó anteriormente, debido a su generación tras una respuesta inmune humana, el anticuerpo monoclonal humano de la presente invención reconocerá epítomos que son de particular relevancia patológica y que podrían no ser accesibles o menos inmunogénicos en el caso de procesos de inmunización para la generación de, por ejemplo, anticuerpos monoclonales de ratón y cribado *in vitro* de bibliotecas de presentación en fagos, respectivamente. Por consiguiente, es prudente estipular que el epítipo del anticuerpo anti-TTR humano de la presente invención es único y que no existe ningún otro anticuerpo que sea capaz de unirse al epítipo reconocido por el anticuerpo monoclonal humano de la presente invención; véase también la Figura 10. Una indicación adicional de la unicidad de los anticuerpos de la presente invención es el hecho de que, como se indica en el Ejemplo 8, los anticuerpos NI-301.59F1, NI-301.35G11 y NI-301.37F1 de la presente invención se unen a epítomos que son específicos para la conformación de TTR mal plegada, mal ensamblada y/o agregada, que como se indicó anteriormente, son de particular relevancia patológica y pueden no ser obtenibles mediante los procesos habituales para la generación de anticuerpos, tales como inmunización o cribados de bibliotecas *in vitro*.

Por lo tanto, en una realización, la presente invención también se extiende generalmente a anticuerpos anti-TTR y moléculas de unión a TTR que compiten con el anticuerpo monoclonal humano de la presente invención por la unión específica a TTR. La presente invención se dirige más específicamente a un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivados del mismo, en el que el anticuerpo se une específicamente al mismo epítipo de TTR como anticuerpo de referencia seleccionado del grupo que consiste en NI-301.59F1, NI-301.35G11, NI-301.37F1 y/o NI-301.12D3.

Además, en una realización, la presente invención también se extiende generalmente a anticuerpos anti-TTR y moléculas de unión a TTR que compiten con el anticuerpo monoclonal humano de la presente invención por la unión

específica a especies de TTR mal plegadas, mal ensambladas y/o agregadas o fragmentos de las mismas. Por lo tanto, la presente invención también se dirige más específicamente a un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivados del mismo, en el que el anticuerpo se une específicamente al mismo epítipo de especies de TTR mal plegadas, mal ensambladas o agregadas o fragmentos de las mismas como un anticuerpo de referencia seleccionado del grupo formado por NI-301.59F1, NI-301.35G11, NI-301.37F1 y/o NI-301.12D3.

La competencia entre anticuerpos se determina mediante un ensayo en el que la inmunoglobulina bajo prueba inhibe la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común, tal como TTR. Se conocen numerosos tipos de ensayos de unión competitiva, por ejemplo: radioinmunoensayo directo o indirecto (RIA) en fase sólida, inmunoensayo enzimático directo o indirecto (EIA) en fase sólida, ensayo de competición en sándwich; véase Stahl et al., *Methods in Enzymology* 9 (1983), 242-253; EIA con biotina-avidina directo en fase sólida; véase Kirkland et al., *J. Immunol.* 137 (1986), 3614-3619 y Cheung et al., *Virology* 176 (1990), 546-552; ensayo marcado directo en fase sólida, ensayo en sándwich marcado directo en fase sólida; véase Harlow y Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1988); RIA de marcaje directo en fase sólida utilizando la etiqueta ¹²⁵I; véase Morel et al., *Molec. Immunol.* 25 (1988), 7-15 y Moldenhauer et al., *Scand. J. Immunol.* 32 (1990), 77-82. Típicamente, dicho ensayo implica el uso de TTR purificada o TTR mal plegada, mal ensamblada o agregada, tal como oligómeros y/o fibrillas de la misma unida a una superficie sólida o células que portan cualquiera de estas, una inmunoglobulina de prueba sin marcar y una inmunoglobulina de referencia marcada, es decir el anticuerpo monoclonal humano de la presente invención. La inhibición competitiva se mide determinando la cantidad de marcador unido a la superficie sólida o células en presencia de la inmunoglobulina de prueba. Por lo general, la inmunoglobulina de prueba está presente en exceso. Preferiblemente, el ensayo de unión competitiva se realiza en las condiciones descritas para el ensayo ELISA en los Ejemplos adjuntos. Los anticuerpos identificados por ensayo de competición (anticuerpos competidores) incluyen anticuerpos que se unen al mismo epítipo que el anticuerpo de referencia y anticuerpos que se unen a un epítipo adyacente suficientemente próximo al epítipo unido por el anticuerpo de referencia para que se produzca un impedimento estérico. Normalmente, cuando un anticuerpo competidor está presente en exceso, inhibirá la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común en al menos un 50% o un 75%. Por lo tanto, la presente invención se dirige además a un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivados del mismo, en el que el anticuerpo inhibe competitivamente un anticuerpo de referencia seleccionado del grupo que consiste en NI-301.59F1, NI-301.35G11, NI-301.37F1, NI-305.2F5, NI-301.28B3, NI-301.119C12, NI-301.5D8, NI-301.9D5, NI-301.104F5, NI-301.21F10, NI-301.9G12, NI-301.12D3, NI-301.44E4, NI-301.18C4, NI-301.11A10, NI-301.3C9, NI-301.14D8, NI-301.9X4 y/o NI-301.14C3 de la unión a TTR.

Además, la presente invención se relaciona además con un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivados del mismo, en el que el anticuerpo inhibe competitivamente un anticuerpo de referencia seleccionado del grupo que consiste en NI-301.59F1, NI-301.35G11, NI-301.37F1, NI-305.2F5, NI-301.28B3, NI-301.119C12, NI-301.5D8, NI-301.9D5, NI-301.104F5, NI-301.21F10, NI-301.9G12, NI-301.12D3, NI-301.44E4, NI-301.18C4, NI-301.11A10, NI-301.3C9, NI-301.14D8, NI-301.9X4 y/o NI-301.14C3 de la unión a especies de TTR mal plegadas, mal ensambladas o agregadas o fragmentos de las mismas.

Una inmunoglobulina o su ADNc codificante se puede modificar adicionalmente. Por lo tanto, en una realización adicional, el método de la presente invención comprende una cualquiera de la etapa o etapas para producir un anticuerpo quimérico, anticuerpo murinizado, anticuerpo monocatenario, fragmento Fab, anticuerpo biespecífico, anticuerpo de fusión, anticuerpo marcado o un análogo de cualquiera de esos. Los métodos correspondientes son conocidos por los expertos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Harlow y Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor (1988). Cuando se obtienen derivados de dichos anticuerpos mediante la técnica de presentación en fagos, se puede usar la resonancia de plasmón de superficie como se emplea en el sistema BIAcore para aumentar la eficiencia de los anticuerpos de fagos que se unen al mismo epítipo que el de cualquiera de los anticuerpos descritos en este documento (Schier, *Human Antibodies Hybridomas* 7 (1996), 97-105; Malmberg, *J. Immunol. Methods* 183 (1995), 7-13). La producción de anticuerpos quiméricos se describe, por ejemplo, en la solicitud internacional WO 89/09622. Los métodos para la producción de anticuerpos humanizados se describen, por ejemplo, en la solicitud europea EP-A1 0 239 400 y la solicitud internacional WO 90/07861. Otras fuentes de anticuerpos a utilizar de acuerdo con la presente invención son los denominados anticuerpos xenogénicos. El principio general para la producción de anticuerpos xenogénicos tales como anticuerpos de tipo humano en ratones se describe, por ejemplo, en las solicitudes internacionales WO 91/10741, WO 94/02602, WO 96/34096 y WO 96/33735. Como se discutió anteriormente, el anticuerpo de la invención puede existir en una variedad de formas además de los anticuerpos completos; incluyendo, por ejemplo, Fv, Fab y F(ab)₂, así como en cadenas sencillas; véase por ejemplo la solicitud internacional WO 88/09344. Por lo tanto, en una realización, se proporciona el anticuerpo de la presente invención, que se selecciona del grupo que consiste en un fragmento Fv de cadena sencilla (scFv), un fragmento F(ab'), un fragmento F(ab) y un fragmento F(ab')₂.

Los anticuerpos de la presente invención o sus correspondientes cadena o cadenas de inmunoglobulina se pueden modificar adicionalmente usando técnicas convencionales conocidas en el arte, por ejemplo, usando eliminación o eliminaciones, inserción o inserciones, sustitución o sustituciones, adición o adiciones y/o recombinación o recombinaciones y/o cualquier otra modificación o modificaciones de aminoácidos conocidas en la técnica ya sea solas o en combinación. Los métodos para introducir tales modificaciones en la secuencia de ADN subyacente a la secuencia de aminoácidos de una cadena de inmunoglobulina son bien conocidos por los expertos en la técnica; véase, por

ejemplo, Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y. y Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates y Wiley Interscience, N.Y. (1994). Las modificaciones del anticuerpo de la invención incluyen derivatizaciones químicas y/o enzimáticas en uno o más aminoácidos constituyentes, incluidas modificaciones de la cadena lateral, modificaciones de la estructura principal y modificaciones del extremo terminal N y C que incluyen acetilación, hidroxilación, metilación, amidación y unión de fracciones de carbohidratos o lípidos, cofactores y similares. Asimismo, la presente invención abarca la producción de proteínas quiméricas que comprenden el anticuerpo descrito o algún fragmento del mismo en el extremo terminal amino fusionado con una molécula heteróloga tal como un ligando inmunoestimulador en el extremo terminal carboxilo; véase, por ejemplo, la solicitud internacional WO 00/30680 para los detalles técnicos correspondientes.

Dichos anticuerpos y moléculas de unión se pueden analizar para determinar su especificidad y afinidad de unión mediante ELISA e inmunohistoquímica como se describe en el presente documento, véanse, por ejemplo, los Ejemplos. Estas características de los anticuerpos y las moléculas de unión también pueden probarse mediante transferencia Western.

El ejemplo anticuerpo humano NI-301.37F1 mostró una tinción prominente de TTR mal plegada en secciones de la biopsia de piel del paciente con FAP pero no mostró tinción en el páncreas de control sano, en el que las células alfa pancreáticas muestran expresión endógena de TTR, es decir, TTR nativa (véase Ejemplo 8 y Figura 9). Los ejemplos de anticuerpos NI-301.35G11 y NI-301.37F1 de la presente invención también produjeron resultados positivos en tejido de ratón con FAP que mostraban depósitos de TTR anormales en varios tejidos, incluido el intestino; véase la Figura 8. Esta especificidad de unión hacia formas patológicas de TTR en tejido humano y animal enfatiza, además de los experimentos bioquímicos mostrados en este documento (véase la Figura 10), la posibilidad de utilizar los anticuerpos de la presente invención en el tratamiento y diagnóstico de enfermedades asociadas con la amiloidosis por TTR, que se produce preferiblemente debido a la aparición de especies de TTR mal plegadas, mal ensambladas y/o agregadas y/o fragmentos, derivados de las mismas.

Como alternativa a la obtención de inmunoglobulinas directamente a partir del cultivo de células B o células B de memoria, las células se pueden utilizar como fuente de loci de cadena pesada y cadena ligera reorganizados para expresión y/o manipulación genética posteriores. Los genes de anticuerpos reordenados se pueden transcribir de forma inversa a partir de ARNm apropiados para producir ADNc. Si se desea, la región constante de la cadena pesada puede cambiarse por la de un isotipo diferente o eliminarse por completo. Las regiones variables se pueden unir para codificar regiones Fv de cadena sencilla. Pueden unirse múltiples regiones Fv para conferir capacidad de unión a más de una combinación de cadena pesada y ligera objetivo o quimérica. Una vez que el material genético está disponible, el diseño de análogos como se describió anteriormente que conservan su capacidad para unirse al objetivo deseado es sencillo. Los expertos en la técnica conocen métodos para la clonación de regiones variables de anticuerpos y la generación de anticuerpos recombinantes son conocidos por el experto en la técnica y se describen, por ejemplo, en Gilliland et al., Tissue Antigens 47 (1996), 1-20; Doenecke et al., Leukemia 11 (1997), 1787-1792.

Una vez que se obtiene el material genético apropiado y, si se desea, se modifica para codificar un análogo, las secuencias codificantes, incluidas las que codifican, como mínimo, las regiones variables de la cadena pesada y ligera, se pueden insertar en sistemas de expresión contenidos en vectores que pueden transfectarse en células huésped recombinantes estándar. Puede usarse una variedad de tales células huésped; para un procesamiento eficaz, sin embargo, se prefieren las células de mamífero. Las líneas celulares de mamífero típicas útiles para este propósito incluyen, pero no se limitan a, células CHO, células HEK 293 o células NSO.

La producción del anticuerpo o análogo se emprende luego cultivando el hospedador recombinante modificado en condiciones de cultivo apropiadas para el crecimiento de las células huésped y la expresión de las secuencias codificantes. Luego, los anticuerpos se recuperan aislándolos del cultivo. Los sistemas de expresión se diseñan preferiblemente para incluir péptidos señal de modo que los anticuerpos resultantes se secreten al medio; sin embargo, también es posible la producción intracelular.

De acuerdo con lo anterior, la presente invención también se refiere a un polinucleótido que codifica el anticuerpo de la presente invención, en el caso del anticuerpo, preferiblemente al menos una región variable de una cadena de inmunoglobulina del anticuerpo descrito anteriormente. Normalmente, dicha región variable codificada por el polinucleótido comprende las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de la V_H y/o la V_L de la región variable de dicho anticuerpo. En una realización de la presente invención, el polinucleótido es un ADNc.

La persona experta en la técnica apreciará fácilmente que el dominio variable del anticuerpo que tiene el dominio variable descrito anteriormente puede usarse para la construcción de otros polipéptidos o anticuerpos de la especificidad y función biológica deseadas. La persona experta en la técnica sabe que la afinidad de unión se puede mejorar haciendo sustituciones de aminoácidos dentro de las CDR o dentro de los bucles hipervariables (Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196 (1987), 901-917) que se solapan parcialmente con las CDR definidas por Kabat; véase, por ejemplo, Riechmann, et al., Nature 332 (1988), 323-327. Por lo tanto, la presente invención también se refiere a anticuerpos en los que una o más de las CDR mencionadas comprenden una o más, preferiblemente no más de dos sustituciones de aminoácidos. Preferiblemente, el anticuerpo de la invención comprende en una o ambas de sus cadenas de inmunoglobulina dos o las tres CDR de las regiones variables como se establece en la Figura 1.

Las moléculas de unión, por ejemplo, anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de las mismas de la invención, como lo conocen los expertos en la técnica, pueden comprender una región constante que media una o más funciones efectoras. Por ejemplo, la unión del componente C1 del complemento a una región constante del anticuerpo puede activar el sistema del complemento. La activación del complemento es importante en la opsonización y lisis de patógenos celulares. La activación del complemento también estimula la respuesta inflamatoria y también puede estar involucrada en la hipersensibilidad autoinmune. Además, los anticuerpos se unen a receptores en varias células a través de la región Fc, con un sitio de unión al receptor Fc en la región Fc del anticuerpo que se une a un receptor Fc (FcR) en una célula. Hay una serie de receptores Fc que son específicos para diferentes clases de anticuerpos, incluidos IgG (receptores gamma), IgE (receptores épsilon), IgA (receptores alfa) e IgM (receptores mu). La unión del anticuerpo a los receptores Fc en la superficies celulares desencadenan una serie de respuestas biológicas importantes y diversas que incluyen la absorción y destrucción de partículas recubiertas de anticuerpos, la eliminación de complejos inmunes, la lisis de células objetivo recubiertas de anticuerpos por células asesinas (llamada citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos, o ADCC), liberación de mediadores inflamatorios, transferencia placentaria y control de la producción de inmunoglobulina.

En consecuencia, ciertas realizaciones de la presente invención incluyen un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo, en el que al menos una fracción de uno o más de los dominios de la región constante se ha eliminado o alterado de otra manera para proporcionar las características bioquímicas deseadas, tales como funciones efectoras reducidas, la capacidad de dimerizar de forma no covalente, una mayor capacidad para localizar en el sitio de agregación y deposición de TTR, una semivida reducida en suero o una mayor semivida en suero en comparación con un anticuerpo completo no alterado de aproximadamente la misma inmunogenicidad. Por ejemplo, ciertos anticuerpos para usar en los métodos de diagnóstico y tratamiento descritos en este documento son anticuerpos con dominio suprimido que comprenden una cadena polipeptídica similar a una cadena pesada de inmunoglobulina, pero que carecen de al menos una porción de uno o más dominios de cadena pesada. Por ejemplo, en ciertos anticuerpos, se eliminará un dominio completo de la región constante del anticuerpo modificado, por ejemplo, se eliminará todo o parte del dominio CH2. En otras realizaciones, ciertos anticuerpos para usar en los métodos de diagnóstico y tratamiento descritos en este documento tienen una región constante, por ejemplo, una región constante de cadena pesada de IgG, que se altera para eliminar la glicosilación, denominada en otras partes del presente documento como anticuerpos aglicosilados o "ágli". Dichos anticuerpos "ágli" se pueden preparar enzimáticamente así como mediante modificación del sitio o sitios de glicosilación de consenso en la región constante. Aunque no está limitado por la teoría, se cree que los anticuerpos "ágli" pueden tener un perfil de seguridad y estabilidad mejorado *in vivo*. Los métodos para producir anticuerpos aglicosilados que tienen la función efectora deseada se encuentran, por ejemplo, en la solicitud internacional WO 2005/018572.

En ciertos anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos descritos en el presente documento, la porción Fc se puede mutar para disminuir la función efectora usando técnicas conocidas en el arte. Por ejemplo, la eliminación o inactivación (a través de mutaciones puntuales u otros medios) de un dominio de región constante puede reducir la unión al receptor Fc del anticuerpo modificado circulante aumentando de ese modo la localización de TTR. En otros casos, puede ser que las modificaciones de regiones constantes consistentes con la presente invención moderen la unión del complemento y reduzcan así la semivida en suero y la asociación inespecífica de una citotoxina conjugada. Aún se pueden usar otras modificaciones de la región constante para modificar enlaces disulfuro o fracciones de oligosacáridos que permitan una localización mejorada debido a una mayor especificidad antigénica o flexibilidad del anticuerpo. El perfil fisiológico resultante, la biodisponibilidad y otros efectos bioquímicos de las modificaciones, tales como la localización de TTR, la biodistribución y la semivida en suero, pueden medirse y cuantificarse fácilmente utilizando técnicas inmunológicas bien conocidas sin experimentación excesiva.

En ciertos anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos descritos en el presente documento, la porción Fc puede mutarse o intercambiarse por secuencias de proteínas alternativas para aumentar la captación celular de anticuerpos a modo de ejemplo mejorando la endocitosis mediada por receptores de anticuerpos a través de receptores Fcγ, LRP o receptores Thy1 o mediante la 'Tecnología de Super Anticuerpos', que se dice que permite que los anticuerpos se transporten a las células vivas sin dañarlas (Expert Opin. Biol. Ther. (2005), 237-241). Por ejemplo, la generación de proteínas de fusión de la región de unión del anticuerpo y los ligandos de proteínas afines de los receptores de la superficie celular o anticuerpos bi o multispecíficos con secuencias específicas que se unen a TTR, así como a un receptor de la superficie celular, se pueden modificar usando técnicas conocidas en el arte.

En ciertos anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos descritos en el presente documento, la porción Fc puede mutarse o intercambiarse por secuencias de proteínas alternativas o el anticuerpo puede modificarse químicamente para aumentar su penetración en la barrera hematoencefálica.

Las formas modificadas de anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención se pueden preparar a partir de anticuerpos precursores o parentales completos usando técnicas bien conocidas en el arte. Los ejemplos de técnicas se discuten con más detalle en este documento. Los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención se pueden preparar o fabricar usando técnicas que son conocidas en el arte. En determinadas realizaciones, las moléculas de anticuerpo o sus fragmentos se "producen de forma recombinante", es decir, se producen utilizando tecnología de ADN recombinante.

Los ejemplos de técnicas para fabricar moléculas de anticuerpo o fragmentos de las mismas se describen con más detalle en otra parte del presente documento.

Los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención también incluyen derivados que se modifican, por ejemplo, por la unión covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo de manera que la unión covalente no evita que el anticuerpo se una específicamente a su epítipo afín. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los derivados de anticuerpos incluyen anticuerpos que han sido modificados, por ejemplo, por glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica, unión a un ligando celular u otra proteína, etc. Cualquiera de las numerosas modificaciones químicas se puede llevar a cabo mediante técnicas conocidas, que incluyen, pero no se limitan a, escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Además, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

En realizaciones preferidas particulares, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención no provocarán una respuesta inmunitaria deletérea en el animal a tratar, por ejemplo, en un ser humano. En determinadas realizaciones, las moléculas de unión, por ejemplo, anticuerpos, o sus fragmentos de unión a antígenos de la invención se derivan de un paciente, por ejemplo, un paciente humano, y se utilizan posteriormente en la misma especie de la que se derivan, por ejemplo, un humano, aliviando o minimizando la aparición de respuestas inmunes deletéreas.

La desinmunización también se puede usar para disminuir la inmunogenicidad de un anticuerpo. Como se usa en el presente documento, el término "desinmunización" incluye la alteración de un anticuerpo para modificar los epítopos de las células T; véanse, por ejemplo, las solicitudes internacionales WO 98/52976 y WO 00/34317. Por ejemplo, se analizan las secuencias de V_H y V_L del anticuerpo de partida y se "mapea" un epítipo de células T humanas de cada región V que muestra la ubicación de los epítopos en relación con las regiones determinantes de complementariedad (CDR) y otros residuos clave dentro de la secuencia. Los epítopos de células T individuales del mapa de epítopos de células T se analizan para identificar sustituciones de aminoácidos alternativas con un riesgo bajo de alterar la actividad del anticuerpo final. Se diseña una gama de secuencias de V_H y V_L alternativas que comprenden combinaciones de sustituciones de aminoácidos y estas secuencias se incorporan posteriormente en una gama de polipéptidos de unión, por ejemplo, anticuerpos específicos de TTR o fragmentos inmunoespecíficos de los mismos para su uso en los métodos de diagnóstico y tratamiento descritos en este documento que luego se prueban para su funcionamiento. Normalmente, se generan y prueban entre 12 y 24 variantes de anticuerpos. A continuación, se clonan genes completos de cadena pesada y ligera que comprenden regiones V y C humanas modificadas en vectores de expresión y los plásmidos posteriores se introducen en líneas celulares para la producción de anticuerpo completo. A continuación, los anticuerpos se comparan en ensayos bioquímicos y biológicos apropiados y se identifica la variante óptima.

Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar usando una amplia variedad de técnicas conocidas en el arte, incluido el uso de tecnologías de presentación en hibridomas, recombinantes y fagos, o una combinación de las mismas. Por ejemplo, se pueden producir anticuerpos monoclonales usando técnicas de hibridomas, incluidas las conocidas en la técnica y enseñadas, por ejemplo, en Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. (1988); Hammerling et al., En: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* Elsevier, N.Y., 563-681 (1981). El término "anticuerpo monoclonal" como se usa en este documento no se limita a anticuerpos producidos mediante tecnología de hibridoma. El término "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que se deriva de un solo clon, incluido cualquier clon eucariota, procariota o fago, y no al método mediante el cual se produce. Por tanto, el término "anticuerpo monoclonal" no se limita a los anticuerpos producidos mediante tecnología de hibridomas. En determinadas realizaciones, los anticuerpos de la presente invención se derivan de células B humanas que se han immortalizado mediante transformación con el virus de Epstein-Barr, como se describe en el presente documento.

En el proceso de hibridoma bien conocido (Kohler et al., *Nature* 256 (1975), 495) los linfocitos de vida relativamente corta, o mortales, de un mamífero, por ejemplo, células B derivadas de un sujeto humano como se describe en el presente documento, se fusionan con una línea celular tumoral inmortal (por ejemplo, una línea celular de mieloma), produciendo así células híbridas o "hibridomas" que son tanto inmortales como capaces de producir el anticuerpo codificado genéticamente de la célula B. Los híbridos resultantes se segregan en cepas genéticas individuales mediante selección, dilución y rebrote con cada cepa individual que comprende genes específicos para la formación de un solo anticuerpo. Producen anticuerpos, que son homogéneos contra un antígeno deseado y, en referencia a su parentesco genético puro, se denominan "monoclonales".

Las células de hibridoma así preparadas se siembran y crecen en un medio de cultivo adecuado que preferiblemente contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parentales no fusionadas. Los expertos en la técnica apreciarán que los reactivos, las líneas celulares y los medios para la formación, selección y crecimiento de hibridomas están disponibles comercialmente a partir de varias fuentes y los protocolos estandarizados están bien establecidos. Generalmente, el medio de cultivo en el que crecen las células de hibridoma se analiza para determinar la producción de anticuerpos monoclonales contra el antígeno deseado. La especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma se determina mediante ensayos *in vitro*

tales como inmunoprecipitación, radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) como se describe en el presente documento. Una vez identificadas las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones pueden subclonarse mediante procedimientos de dilución limitativa y cultivarse mediante métodos estándar; véase, por ejemplo, Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press (1986), 59-103. Se apreciará además que los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones pueden separarse del medio de cultivo, líquido ascítico o suero mediante procedimientos de purificación convencionales tales como, por ejemplo, proteína A, cromatografía de hidroxipatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

En otra realización, los linfocitos pueden seleccionarse mediante micromanipulación y aislarse los genes variables. Por ejemplo, las células mononucleares de sangre periférica pueden aislarse de un mamífero inmunizado o naturalmente inmune, por ejemplo, un ser humano, y cultivarse durante aproximadamente 7 días *in vitro*. Los cultivos se pueden cribar para detectar IgG específicas que cumplan con los criterios de cribado. Se pueden aislar células de pozos positivos. Las células B productoras de Ig individuales pueden aislarse mediante FACS o identificándolas en un ensayo de placa hemolítica mediado por complemento. Las células B productoras de Ig pueden micromanipularse en un tubo y los genes de V_H y V_L pueden amplificarse usando, por ejemplo, RT-PCR. Los genes de V_H y V_L pueden clonarse en un vector de expresión de anticuerpos y transfectarse en células (por ejemplo, células eucariotas o procaríotas) para su expresión.

Alternativamente, las líneas celulares productoras de anticuerpos pueden seleccionarse y cultivarse usando técnicas bien conocidas por el experto en la materia. Estas técnicas se describen en una variedad de manuales de laboratorio y publicaciones primarias. A este respecto, las técnicas adecuadas para su uso en la invención, como se describe a continuación, se describen en *Current Protocols in Immunology*, Coligan et al., Eds., Green Publishing Associates y Wiley-Interscience, John Wiley and Sons, Nueva York (1991), incluidos los suplementos.

Los fragmentos de anticuerpos que reconocen epítopos específicos pueden generarse mediante técnicas conocidas. Por ejemplo, los fragmentos Fab y $F(ab')_2$ pueden producirse de forma recombinante o mediante escisión proteolítica de moléculas de inmunoglobulina, utilizando enzimas tales como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos $F(ab')_2$). Los fragmentos $F(ab')_2$ contienen la región variable, la región constante de la cadena ligera y el dominio CH1 de la cadena pesada. Tales fragmentos son suficientes para su uso, por ejemplo, en procedimientos de inmunodiagnóstico que implican el acoplamiento de las porciones inmunoespecíficas de inmunoglobulinas para la detección de reactivos tales como radioisótopos.

Los anticuerpos de la presente invención se pueden producir mediante cualquier método conocido en la técnica para la síntesis de anticuerpos, en particular, mediante síntesis química o preferiblemente mediante técnicas de expresión recombinante como se describe en el presente documento.

En una realización, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo de la invención comprende una región constante sintética en la que uno o más dominios están parcial o totalmente eliminados ("anticuerpos con dominio eliminado"). En determinadas realizaciones, los anticuerpos modificados compatibles comprenderán constructos o variantes de dominio eliminado en los que se ha eliminado todo el dominio CH2 (constructos Δ CH2). Para otras realizaciones, un péptido de conexión corto puede sustituirse por el dominio eliminado para proporcionar flexibilidad y libertad de movimiento para la región variable. Los expertos en la técnica apreciarán que tales constructos son particularmente preferidos debido a las propiedades reguladoras del dominio CH2 sobre la tasa catabólica del anticuerpo. Los constructos de dominio eliminado pueden derivarse usando un vector que codifica un dominio constante humano de IgG₁, véanse, por ejemplo, las solicitudes internacionales WO 02/060955 y WO 02/096948A2. Este vector está modificado para eliminar el dominio CH2 y proporcionar un vector sintético que expresa una región constante de IgG₁ con el dominio eliminado.

En determinadas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la presente invención son minicuerpos. Se pueden fabricar minicuerpos usando métodos descritos en la técnica, véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos No. 5.837.821 o la solicitud internacional WO 94/09817.

En una realización, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo de la invención comprende una cadena pesada de inmunoglobulina que tiene eliminación o sustitución de unos pocos o incluso de un solo aminoácido siempre que permita la asociación entre subunidades monoméricas. Por ejemplo, la mutación de un solo aminoácido en áreas seleccionadas del dominio CH2 puede ser suficiente para reducir sustancialmente la unión de Fc y por tanto aumentar la localización de TTR. De manera similar, puede ser deseable eliminar simplemente la parte de uno o más dominios de región constante que controlan la función efectora (por ejemplo, la unión del complemento) a modular. Tales eliminaciones parciales de las regiones constantes pueden mejorar las características seleccionadas del anticuerpo (semivida en suero) mientras dejan intactas otras funciones deseables asociadas con el dominio de la región constante objetivo. Además, como se mencionó anteriormente, las regiones constantes de los anticuerpos descritos pueden ser sintéticas mediante la mutación o sustitución de uno o más aminoácidos que mejoran el perfil del constructo resultante. A este respecto, puede ser posible interrumpir la actividad proporcionada por un sitio de unión conservado (por ejemplo, unión de Fc) mientras se mantiene sustancialmente la configuración y el perfil inmunogénico del anticuerpo modificado. Otras realizaciones más comprenden la adición de uno o más aminoácidos

a la región constante para mejorar las características deseables tales como una función efectora o proporcionar más unión de citotoxina o carbohidrato. En tales realizaciones, puede ser deseable insertar o replicar secuencias específicas derivadas de dominios de región constante seleccionados.

- 5 La presente invención también proporciona anticuerpos que comprenden, consisten esencialmente en, o consisten en, variantes (incluyendo derivados) de moléculas de anticuerpos (por ejemplo, las regiones V_H y/o regiones V_L) descritas en el presente documento, cuyos anticuerpos o fragmentos de los mismos se unen inmunoespecíficamente a TTR. Pueden usarse técnicas estándar conocidas por los expertos en la técnica para introducir mutaciones en la
- 10 secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo, que incluyen, pero no se limitan a, mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR que dan como resultado sustituciones de aminoácidos. Preferiblemente, las variantes (incluidos los derivados) codifican menos de 50 sustituciones de aminoácidos, menos de 40 sustituciones de aminoácidos, menos de 30 sustituciones de aminoácidos, menos de 25 sustituciones de aminoácidos, menos de 20 sustituciones de aminoácidos, menos de 15 sustituciones de aminoácidos, menos de 10 sustituciones de aminoácidos, menos de 5 sustituciones de aminoácidos, menos de 4 sustituciones de aminoácidos, menos de 3
- 15 sustituciones de aminoácidos o menos de 2 sustituciones de aminoácidos con respecto a la región V_H de referencia, V_H -CDR1, V_H -CDR2, V_H -CDR3, región V_L , V_L -CDR1, V_L -CDR2 o V_L -CDR3. Una "sustitución conservadora de aminoácidos" es aquella en la que el residuo de aminoácido se reemplaza por un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral con una carga similar. En la técnica se han definido familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con cargas similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por
- 20 ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Alternativamente, las mutaciones se pueden introducir
- 25 aleatoriamente a lo largo de toda o parte de la secuencia codificante, tal como mediante mutagénesis de saturación, y los mutantes resultantes se pueden cribar en busca de actividad biológica para identificar mutantes que retienen la actividad (por ejemplo, la capacidad de unirse a TTR y/o especies de TTR mal plegadas, mal ensambladas o agregadas y/o fragmentos de las mismas).
- 30 Por ejemplo, es posible introducir mutaciones solo en regiones marco o solo en regiones CDR de una molécula de anticuerpo. Las mutaciones introducidas pueden ser mutaciones silenciosas o neutrales sin sentido, por ejemplo, que tengan poco o ningún efecto sobre la capacidad de un anticuerpo para unirse al antígeno; de hecho, algunas de estas mutaciones no alteran la secuencia de aminoácidos en absoluto. Estos tipos de mutaciones pueden ser útiles para optimizar el uso de codones o mejorar la producción de anticuerpos de un hibridoma. Las regiones codificantes de
- 35 codón optimizado que codifican anticuerpos de la presente invención se describen en otra parte del presente documento. Alternativamente, las mutaciones de sentido erróneo no neutrales pueden alterar la capacidad de un anticuerpo para unirse al antígeno. Es probable que la ubicación de la mayoría de las mutaciones de sentido erróneo silenciosas y neutrales esté en las regiones marco, mientras que la ubicación de la mayoría de las mutaciones de sentido erróneo no neutrales es probable que estén en CDR, aunque esto no es un requisito absoluto. Un experto en
- 40 la técnica sería capaz de diseñar y probar moléculas mutantes con propiedades deseadas tales como ninguna alteración en la actividad de unión a antígeno o alteración en la actividad de unión (por ejemplo, mejoras en la actividad de unión a antígeno o cambio en la especificidad del anticuerpo). Después de la mutagénesis, la proteína codificada puede expresarse de forma rutinaria y la actividad funcional y/o biológica de la proteína codificada (por ejemplo, capacidad para unirse inmunoespecíficamente al menos a un epítipo de TTR y/o especies de TTR mutadas, mal
- 45 plegadas, mal ensambladas o agregadas y/o fragmentos de las mismas) pueden determinarse usando técnicas descritas en el presente documento o modificando rutinariamente técnicas conocidas en el arte.

III. Polinucleótidos que codifican anticuerpos

- 50 Un polinucleótido que codifica un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo puede estar compuesto por cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser ARN o ADN no modificado o ARN o ADN modificado. Por ejemplo, un polinucleótido que codifica un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo puede estar compuesto de ADN monocatenario y bicatenario, ADN que es una mezcla de regiones monocatenarias y bicatenarias, ARN monocatenario y bicatenario y ARN que es una
- 55 mezcla de regiones monocatenarias y bicatenarias, moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que pueden ser monocatenarias o, más típicamente, bicatenarias o una mezcla de regiones monocatenarias y bicatenarias. Además, un polinucleótido que codifica un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo puede estar compuesto por regiones de cadena triple que comprenden ARN o ADN o tanto ARN como ADN. Un polinucleótido que codifica un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo también puede contener
- 60 una o más bases modificadas o cadenas principales de ADN o ARN modificadas para estabilidad o por otras razones. Las bases "modificadas" incluyen, por ejemplo, bases tritiladas y bases inusuales tales como inosina. Se pueden realizar diversas modificaciones en el ADN y el ARN; por lo tanto, "polinucleótido" abarca formas modificadas química, enzimática o metabólicamente.
- 65 Se puede crear un polinucleótido aislado que codifica una variante no natural de un polipéptido derivado de una inmunoglobulina (por ejemplo, una porción de cadena pesada o porción de cadena ligera de inmunoglobulina)

introduciendo una o más sustituciones, adiciones o eliminaciones de nucleótidos en la secuencia de nucleótidos de la inmunoglobulina de manera que se introduzcan una o más sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos en la proteína codificada. Las mutaciones pueden introducirse mediante técnicas estándar, tales como mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR. Preferiblemente, las sustituciones de aminoácidos conservadoras se realizan en uno o más residuos de aminoácidos no esenciales.

Como es bien conocido, el ARN puede aislarse de las células B originales, células de hibridoma o de otras células transformadas mediante técnicas estándar, tales como extracción y precipitación con isotiocianato de guanidinio seguido de centrifugación o cromatografía. Cuando sea deseable, el ARNm puede aislarse del ARN total mediante técnicas estándar tales como cromatografía en oligo dT celulosa. Las técnicas adecuadas son familiares en el arte. En una realización, los ADNc que codifican las cadenas ligera y pesada del anticuerpo pueden prepararse, simultáneamente o por separado, usando transcriptasa inversa y ADN polimerasa de acuerdo con métodos bien conocidos. La PCR puede iniciarse mediante cebadores de región constante de consenso o mediante cebadores más específicos basados en las secuencias de aminoácidos y ADN de cadena pesada y ligera publicadas. Como se discutió anteriormente, la PCR también se puede usar para aislar clones de ADN que codifican las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo. En este caso, las bibliotecas se pueden cribar mediante cebadores de consenso o sondas homólogas más grandes, tales como sondas de región constante humana.

El ADN, típicamente ADN plasmídico, puede aislarse de las células usando técnicas conocidas en el arte, mapearse por restricción y secuenciarse de acuerdo con técnicas estándar bien conocidas expuestas en detalle, por ejemplo, en las referencias anteriores relacionadas con técnicas de ADN recombinante. Por supuesto, el ADN puede ser sintético de acuerdo con la presente invención en cualquier momento durante el proceso de aislamiento o análisis posterior.

En este contexto, la presente invención también se refiere a un polinucleótido que codifica al menos el dominio de unión o la región variable de una cadena de inmunoglobulina del anticuerpo de la presente invención. En una realización, la presente invención proporciona un polinucleótido aislado que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un ácido nucleico que codifica una región variable de cadena pesada (V_H) de inmunoglobulina.

En otra realización, la presente invención proporciona un polinucleótido aislado que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un ácido nucleico que codifica una región variable de cadena ligera (V_L) de inmunoglobulina.

En otra realización, la presente invención proporciona un polinucleótido aislado que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un ácido nucleico que codifica una región variable de cadena pesada (V_H) de inmunoglobulina en la que las regiones H -CDR1, V_H -CDR2 y V_H -CDR3 tienen secuencias polipeptídicas que son idénticas a los grupos V_H -CDR1, V_H -CDR2 y V_H -CDR3 mostrados en la Figura 1.

En una realización preferida de la presente invención, el polinucleótido comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un ácido nucleico que tiene una secuencia de polinucleótidos de la región V_H o V_L de un anticuerpo anti-TTR y/o un anticuerpo que reconoce especies de TTR mal plegadas, mal ensambladas o agregadas y/o fragmentos de las mismas como se muestra en la Tabla II. A este respecto, el experto en la técnica apreciará fácilmente que los polinucleótidos que codifican al menos el dominio variable de la cadena ligera y/o pesada pueden codificar el dominio variable de ambas cadenas de inmunoglobulina o solo una. Por lo tanto, en una realización, el polinucleótido comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un ácido nucleico que tiene una secuencia de polinucleótidos de la región V_H y V_L de un anticuerpo anti-TTR que reconoce especies de TTR mal plegadas, mal ensambladas o agregadas y/o fragmentos de las mismas como se representa en la Tabla II.

Tabla II: Secuencias de nucleótidos de la región V_H y V_L de anticuerpos que reconocen especies de TTR mutadas, mal plegadas, mal ensambladas o agregadas y/o fragmentos de las mismas.

Anticuerpo	Secuencias de nucleótidos de cadenas pesada variable (V_H) y ligera variable (V_L) o cadenas ligeras kappa variables (V_K)
NI-301.59F1-VH	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGGTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCC CTGAGACTCTCCTGTGTAGCCTCTGGATTCACTTTTAGTAATTATTGGATGAG TTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAATATAAA TCAAGATAGTGAGAAATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCCGCATC TCCAGAGACAACTCCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGA GTTCGAGGACACGGGCGTGTATTACTGTGCGAGAGATCGCTATTGCAGTGGT GGGAGATGCTCCCGGGGTAACAACCTGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACC CTGGTCACCGTCTCCTCG <i>SEQ ID NO.: 1</i>
NI-301.59F1-VL	

Anticuerpo	Secuencias de nucleótidos de cadenas pesada variable (VH) y ligera variable (VL) o cadenas ligeras kappa variables (VK)
	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGCCACTCTGTCTCTGTCTCCAGGGGAGA GAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGAAGCAACTTAGCCTG GTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCC ACCAGGGCCACTGATATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACA GAATTCAGTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAGGATTTTGCAGTTTATT ACTGTCAGCAATATAATAACTGGCCTCCGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAA AGTGGATATCAAA <i>SEQ ID NO.: 3</i>
NI-301.35G11-VH	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGGGGGTCC CTGAGACTCTCCTGTGTAGCCTCTGGATTCAGTTTATGAGCAGCTATGCCATGA GCTGGGTCCGCCAGGTTCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCTATTA
	GTGGTAGTGGTGATACAACAAAATACACAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCA CCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGGTGTTTCTGCAAATGAGCAGCCT GAGAGCCGAGGACACGGCCCTATATTACTGTGTGAAAGATGGTAGTGGACG GATCGATCCTTTTGCTTTATGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCG <i>SEQ ID NO.: 5</i>
NI-301.35G11-VL	GAAATTGTGATGACACAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCTTGACAGC CGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCGTAGTCTCGTATACAGTGATGGAAA CATTTACTTGAATTGGTTTCAGCAGAGGCCAGGCCAATCTCCAAGGCGCTTA ATTTATAAGGTTTCTAACCAGGACTCTGGGGTCCCAGACAGATTCAGTGGCA GTGGGTGAGACACTGACTTCACACTGAGAATCAGCAGGGTGGAGGCTGAGG ATGTTGGGGTCTATTACTGCATGCAGGGTACACACTGGCCTAGGACGTTCCG CCAAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA <i>SEQ ID NO.: 7</i>
NI-301.37F1-VH	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACC CTGTCCCTCACCTGCAGTGTCTCTGGTGGCTCCATCATCAGTAGGAGTTCCTA CTGGGGCTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGGG TATCTATCATAGTGGGAACACTTACGACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGACTC ACCATGTCCGTAGACACGTCGAAGAACCAGTTCTCCCTGAATCTGAGGTCTG TGACCGCCGCAGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGGATAGTGCCGGGGG GTGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCG <i>SEQ ID NO.: 9</i>
NI-301.37F1-VL	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACA GAGTCACAATCGCTTGCCGGGCCAGTCAGAGCGTTGGCACCTATTTAAATTG GTATCAGCAGAAAAGAGGGAAAGCCCCCTAAACTCCTCATCTTTGCTGCATCC AGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACA GATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGACTTTGCAACTTACT ACTGTCAACAGAGTTACAGTTCTCCTCCAACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGT GGAGATCAAA <i>SEQ ID NO.: 11</i>
NI-301.2F5-VH	

Anticuerpo	Secuencias de nucleótidos de cadenas pesada variable (VH) y ligera variable (VL) o cadenas ligeras kappa variables (VK)
	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCGGTCTAGGAGGTCC CTGAGACTCTCCTGTGCAACCTCTGGATTACCTTCAGTAACTATGCGATGC ACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCATTATTT CATATGATGGAAACAATAAATACTACGCAGACTCCGTGAGGGGCCGATTCA CCGTCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACATTCTATCTGCAAATGAACAGCCT GAGAATTGAGGACACGGCTGTATATTTTTGTGCGAGAGGGAGCGGTAGAGC AGCTCGTCACTGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCC TCG <i>SEQ ID NO.: 13</i>
NI-301.2F5-VL	CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTCGA TCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATAACTATGT CTCCTGGTACCAACAATACCCAGGCAAAGCCCCCAAAGTCATGATTTTTGAT GTTTTTAATCGGCCTTCAGGGGTTTCTAATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGG CAACACGGCCTCCCTGACCATCTCTGGACTCCAGGCAGAGGACGAGGCTGA TTATTACTGCAGTTCATATAACAAGCAGCGTCACTCCTCACTGGGTGTTCGGC GGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA <i>SEQ ID NO.: 15</i>
NI-301.28B3 -VH	CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACC CTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCCGGTGGCTCCATCACTAGTAGTAATTTCTA CTGGGGCTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGGC TATTTATTCTAGTGGAAACACCTACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTC ACCATATCCGTAGACACGTCCAAGAAAAAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTG TGACCGCCGCTGACACGGCTGTCTATTACTGTGCGAGACACTCTTGTAGTAG TGCCAGCTGCTATCCTCCCGGTTTCTGGTTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACC CTGGTCACCGTCTCCTCG <i>SEQ ID NO.: 17</i>
NI-301.28B3 -VL	GAAATTGTGATGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGCGTCTCCAGGGGAAA GAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGACTGTTAGTTACAACTTAGCCTG GTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCCGGCTCCTCATCTATGGCGCGTCC ACCAGGGCCACTGGTATCCCAGGCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACA GAGTTCACCTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATT ACTGTCAGCAATATAATAACTGGCCTCCGTGGACGTTCCGGCAAGGGACCA AGGTGGAAATCAAA <i>SEQ ID NO.: 19</i>
NI-301.119C12- VH	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGGCCCAAGACTGGTGAAGCCTTCACAGACC CTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTGTTTACTA CTGGAGCTGGATCCGCCAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGATA TATTTCTAATACTGGGAACACCTACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTT ACCATATCGATAGACACCTCCAAGAACCAGTTCTCCCTCAACCTGCGCTCTG TGA CTGCCGCGGACACGGCCGACTATTTCTGTGCGAGAGAGTATTGTAGTGG TGGAATTGCTACTCTCGCTTCTACTACTACATGGACGTCTGGGGCAAAGGG ACCACGGTCACCGTCTCCTCG <i>SEQ ID NO.: 21</i>
NI-301.119C12- VL	

Anticuerpo	Secuencias de nucleótidos de cadenas pesada variable (VH) y ligera variable (VL) o cadenas ligeras kappa variables (VK)
	CAGTCTGTGCTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGGGGCCCCAGGGCAGAGG GTCACCATCTCCTGCACTGGGAGCAGCTCCAACATCGGGGCAGGTTATGGTG TACACTGGTACCAGCAACTTTCAGGAACACCCCCAAACTCCTCATCTATGG AGACAACAATCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCT GGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCACTGGGCTCCAGGCTGAGGATGAGGCTC ATTATTACTGCCAGTCCTATGACACCACCTTGAGTGGTTCGAGGGTGTTCGG CGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA <i>SEQ ID NO.: 23</i>
NI-301.5D8-VH	CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACGGTTGAAGCCTTCGAGAGACC CTGTCCCTCACGTGCGCTGTCTATGGTGGGTCTTTCAGTGCTTACTACTGGAA TTGGATCCGCCAGGCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGTGAAGTCAG TCATGGTGGCAGCAGCAACTACAGCCCGTCCCTCAGGGGTGCGAGTCGCCATT TCTTTAGACACGTCCAAGAGCCAGTTCTCCCTGAGGCTGAATTCTGTGACCG CCGCGGACACGGCTGTTTATTACTGTGCGAGAGGCAGCCCTGTAGTACTACC AGGTGCCAGATTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCG <i>SEQ ID NO.: 25</i>
NI-301.5D8-VL	CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTTTCCTGGACAGTCGA TCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGATGTTGGGAGTTATAACCTTGT CTCCTGGTACCAACAACACCCAGGCAAAGCCCCCAAACCTCTTGATTTATGAG GTCAATAAGCGGCCCTCAGGAGTTTCTACTCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTG GCAACACGGCCTCCCTGACGATCTCTGGGCTCCAGACTGAGGACGAGGCTG ATTATTACTGCTGCTCATATGCAGGTAGTACTAAGGTCTTCGGAATTGGGAC CAAGGTACCGTCCTA <i>SEQ ID NO.: 27</i>
NI-301.9D5-VH	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGCCTGGTGAAGCCTTCAGAGACC CTGTCCCTCACCTGCATTGTCTCTGGTGTCTCCATCAGAAGTGGTGGTTACTA CTGGAGCTGGATCCGGCAGCACCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTTGGGTT CATCTATTACACTGGGAACACCTACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGCT ACCATATCAGTAGACACCTCTAAGAACCAGTTCTCCCTGAGGCTGACCGCTG TGACTGCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGATTGTAGTGGTGG CAGCTGCCCCGAGTCCTACTTTGACTCCTGGGGTCGGGGCACCCCTGGTCACC GTCTCCTCG <i>SEQ ID NO.: 29</i>
NI-301.9D5-VL	GAAATTGTGATGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAA GAGCCACCCCTCTCCTGTAGGGCCAGTCAGAGTGTTCGCAGTTTCTTAGCCTG GTACCAACAGAAATCTGGCCAGGCTCCCCGACTCCTCATCTATGATGCATCC AAGAGGGCCACTGGCATCCAGCCAGGTTTCAGTGACAGTGGGTCTGGAACA GACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTAGAGACTGAAGACTCTGCGGTTTATT ACTGTCAGCAGCGTACCAACTGGCCTCCACACCTCACTTTTCGGCGGAGGGAC CAAGGTGGAAATCAAA <i>SEQ ID NO.: 31</i>
NI-301.104F5-VH	

Anticuerpo	Secuencias de nucleótidos de cadenas pesada variable (VH) y ligera variable (VL) o cadenas ligeras kappa variables (VK)
	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGAGAGGTCC CTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCAGGAGCTATGGCATGC ACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATAT GGTTTGATGGAAGTAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCA CCGTCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCT GAGAGCCGAGGACACGGCTGTCTACTACTGTGCAAGAGATGGTATAGCAGC CACTTATGCGGACTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCCTCG <i>SEQ ID NO.: 33</i>
NI-301.104F5-VL	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAA GAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTCGCAGCTACTTAGCCTG GTACCAACAAAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCC AACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACA GACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATT ACTGTCAGCAACGTAGCAACTGGCCGATCACCTTCGGCCAAGGGACACGAC TGGAGATTAAA <i>SEQ ID NO.: 35</i>
NI-301.21F10-VH	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCGGGGGGAGGTTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCC TTGAGACTGTCTGTGCGGTCTCTGGATTACCCCTTAGTAGTCTTAGTTCTTA TTACATGAGTTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGC CACTATAAACCCAGGTGGAAGTGAGAAGTCCTATGTGGACTCTGTGAAGGG CCGATTACCGTCTCCAGAGACAACGCCAGGAGCTCAGTATATTTGCAAATG GACAGCCTGACAGTCGAGGACACGGCTATTTATTACTGTGCGAGACCAAGA TATTGCACTAGTGGTGGTTGCTATTTTGACAACTGGGGCCAGGGAACCCCTGG TCACCGTCTCCTCG <i>SEQ ID NO.: 37</i>
NI-301.21F10-VL	CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTCGCTCAGTGTCCGGGTCTCCTGGACAGTCAG TCACCATCTCCTGCACTGCAACCAATAGTGATGTTGGCGATTATAAGTCTGT CTCCTGGTACCAACAACACCCAGGCAAAGCCCCCAAACCTCATGATTTATGAT GTCGGTAGGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGATCGCTTCTCTGGCTCCAAATCTG ACAACACGGCCTTCCTGACCATCTCTGGGCTCCAGACTGAGGATGAAGCTGA TTACTTTTGCTGTATATATGTAGGCAGGTCTTCGGTGTTTCGGCGAGGGACC AAGTTGACCGTCCTG <i>SEQ ID NO.: 39</i>
NI-301.9G12-VH	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACC CTGTCCCTCACCTGCGCTGTCTCTGGTTTCTCCATCAGCAGTGGTTACTACTG GGGCTGGATCCGGCAGCCCCCAGGGACGGGGCTGGAGTGGATTGGGAGTAT GTATCATAGTGGGAGGACCTACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACC ATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTGTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGA CCGCCGAGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGGGGCTTCGATACTAGTGG TTCCCATCGGCCCTCTCGACTGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACC GTCTCCTCG <i>SEQ ID NO.: 41</i>
NI-301.9G12-VL	

Anticuerpo	Secuencias de nucleótidos de cadenas pesada variable (VH) y ligera variable (VL) o cadenas ligeras kappa variables (VK)
	CAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGCGGCCCCAGGACAGAAG GTCACCATCTCCTGCTCTGGAAGCAGCTCCAACATTGGAATAATTATGTAT CCTGGTACCAGCAGCTCCCAGGAACAGCCCCAAACTCCTCATTTATGACAA TAATAAGCGACCCTCAGGGATTCTTGACCGAATCTCTGGCTCCAAGTCTGGC ACGTCAGCCACCCTGGGCATCACCGGACTCCAGACTGGGGACGAGGCCGAT TATTACTGCGGAACCTGGGATAGCAGCCTGAGTGCTTATGTCTTCGGAAGT GGACCAAGGTCACCGTCCTA <i>SEQ ID NO.: 43</i>
NI-301.12D3-VH	GAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCC CTGAGACTCTCCTGTGTAGCGTCTGGATTACCTTCAGGAAGTATGGCATGC ACTGGGTCCGCCGGGCCCCAGGCAGGGGGCTGGAGTGGGTAGCAGTTATAT GGTCTGATGGAAGTGATAAATACTATGCAGACTCCGTGGAGGGCCGATTCA CCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGGTGTCTTCTCCAAATGAACAGCCT GAGAGCCGACGACACGGCTGTATACTTCTGTGCGAGAGAGCCGAGCAGCAC CTGGGCTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCAACCGTCTCCTCG <i>SEQ ID NO.: 45</i>
NI-301.12D3-VL	CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTCGA TCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGATGTTGGGGGTTATAACCTTGT CTCCTGGTACCAACAGCACCCAGGCAAAGCCCCCAAACATCATGTTTATGAG GACATTAAGGGGCCCTCAGGGGTTTCTAATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTG GCAACACGGCCTCCCTGACAATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTG ATTATTTCTGCTGCTCATATGCAGGTAAGTGGCACTCTGGTATTCGGCGGAGG GACCAAGCTGACCGTCCTA <i>SEQ ID NO.: 47</i>
NI-301.44E4-VH	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCGGGGGGTCC CTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGA TCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTA GTGGCAGTGGCAGTACGACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTTCG CCATCTCCAGAGACAAATCCAAGAACACGCTGTCCCTACAAATGAACAGCC TGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCAAAAGGGGCATGGGAGA TACCCACCTACTTTGACAACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCAACCGTCTCCTC G <i>SEQ ID NO.: 54</i>
NI-301.44E4-VK	GAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAA GAGCCACCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTATTAGGAACAACCTTAGCCTG GTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCC ACCAGGGCCACTGGTATCCCAGCCAGGTTTCACTGGCACTGGGTCTGGGACA GAGTTCACTCTCATCGTCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATT ACTGTCAGCAGTATAATAACTGGCCTCCACGTGGACGTTTCGGCCAAGGGA CCAAGGTGGAAATCAAA <i>SEQ ID NO.: 56</i>
NI-301.18C4-VH	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAACCTTGGTCCAGCCGGGGGGTCC CTGAGGCTCTCCTGCGCAGCGTCGGGATTACATTCAACATTTATGCCATGA CCTGGGTCCGCCTGTCTCCAGTGAGGGGACTGGAGTGGGTCTCTACTATTAC TAGTGGTGGCGTCAGCATATATTACGCAGACTCCATAAAGGGCCGCTTACC GTCTCCAGAGACAATGCCAAGACATGGTGTCTTACAACTGGACACAACCTG ACAGTCGATGACACGGCCATATATTACTGTGGGAAGGACGGAAACTGCGAT GAGACAAGTTGTTACTTAAGGGGGATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACG GTCACCGTCTCCTCG <i>SEQ ID NO.: 61</i>

Anticuerpo	Secuencias de nucleótidos de cadenas pesada variable (VH) y ligera variable (VL) o cadenas ligeras kappa variables (VK)
NI-301.18C4-VL	CAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTACAGCGGCCCCAGGACAGAAG GTCACCATCTCCTGCTCTGGTAGCAGGTCCGACATTGGGTCTAAACTTGTTC CTGGTACCAGGTAATCCCAGGAAGAGCCCCCGGCTCGTCATTTTTGACACT TATAAGCGGCCCTCAGGGGTACCTGCCCGCTTCTCTGCCTCCAAGTCTGGCA CGTCAGCCACCCTGGACATCGCCGGGCTCCAGCCTGGGGACGAGGCCGAAT ATTTCTGCGGATCATGGGGTAACAGTGAGAATTTTATTATGTCTTCGGATCT GGGACCCGGGTACCGTCCTG <i>SEQ ID NO.: 63</i>
NI-301.11A10-VH	CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACC CTGTCCCTCACCTGCACTGTGTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTAGAAGTTACT ACTGGGGCTGGATGCGCCAGCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGA GTATTTATTATAGTGGGAGCACCTCTACAATCCGTCCCTCAAGAGTCGAGT CACCATGTCAATAGTCACGTCGAGGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTTCT GTGACCGCCGCGGACACGGCCGTGTATTATTGTACCCGAATGGGGGAGGGG GGGCGGGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTACCGTCTCCTCG <i>SEQ ID NO.: 65</i>
NI-301.11A10-VK	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACA GAGTCACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAGAGTATTAGTAGTTGGTTGGCCTG GTATCAGCAGAAACCAGGGAAGGCCCTAAGGTCCTGATCTATGATGCCTC CAGTTTGGAAAGAGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGGTCTGGGAC AGAATTCACCTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTCTGCAACTTAT TACTGCCAACACTATAATGGTTATTCAAGGACGTTCCGCCGCGGGACCAAG GTGGAAATCAAA <i>SEQ ID NO.: 67</i>
NI-301.3C9 VH	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGTCTTCGCAGACC CTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGCCTCCTTCACCAGGGGTGATTTCTA CTGGAGTTGGATCCGCCAGGTCCCAGGGAAGGGCCTGGAATGGATTGGTTA CATATATTCACCTGGGGACGTCTACTACAATCCGTCTCTCAAGAGTCGAGCA AACATCTCGGTTCGACACGCCCAAGAAGCAGTTCTTCCTGAAATTGACCTCTT TGACTGCCGCAGACACGGCCGTCTATTTTGTGCCAGGGAAGGACAATATTG TAGCGGTGGTAGTTGCTACCCTGAATACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACC GTCTCCTCG <i>SEQ ID NO.: 69</i>
NI-301.3C9 VL	TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCCGTGTCCCCAGGACAGACAG CCACCATCACCTGCTCTGGAGATAATTTGGGACATAAATTTACTTGCTGGTA TCAGCAGAAGCCAGGCCAGTCCCCTGTCTGGTCATCTATCAAGATCACAAG CGGCCCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCCGGCTCCAACCTCTGGGGACACAG CCACTCTGACCATCAGCGGGACCCAGGCTATGGATGAGGCTGAGTATTACTG TCAGGCGTGGGCCTTCCCCTATGTGGTCTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACC GTCCTA <i>SEQ ID NO.: 71</i>
NI-301.14D8 VH	GAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGGGGACGCTTGGTCCAGCCGGGGGGGTCC GTGAGACTCTCCTGTATAGCCTCTGGATTTCCTTTAGGAATTATTGGATGA GTTGGGTCCGCCAGCCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATAA AGGAAGATGGCAGTGACAGATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGCTTCA CCATCTTTAGAGACAACGCCAAGAATTTTCTGAGTCTACAAATGAATCGCCT GAGAGCCGAGGACACGGCGGTATACTTCTGTGCGAGAATTGTAGGGGTAAT CCCGTCCGCTGACCCATACTACCTTGACTCCTGGGGCCAGGGAACCTGGTC ACCGTCTCCTCG <i>SEQ ID NO.: 73</i>
NI-301.14D8 VL	

Anticuerpo	Secuencias de nucleótidos de cadenas pesada variable (VH) y ligera variable (VL) o cadenas ligeras kappa variables (VK)
	CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTTTGCTGGACAGTCGG TCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCCTTAACATTGGGACTTACAACCTTAT CTCCTGGTACCAACAACACCCAGGCAGAGCCCCCAGACTCATCATTTTTGAG GGCAATAGGCGGCCCCCGGGATTTCTAATCGCTTCTCTGCCTCCAAGTCTG GCAACACGGCCTCCTTGACAGTCTCTGGGCTGCTGGCTGGCGACGAGGCTGA TTATTACTGTTGCTCATTTGCAGGAAGAGTCTCTTTGGTGTITGGCGGAGGG ACCAAGTTGACCGTCCTA <i>SEQ ID NO.: 75</i>
NI-301.9X4 VH	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAACCTTCGGAGACC CTGTCCCTCACCTGCAGTGTCTCTGCTGGCTCCATCAGTAGTCACTACTGGA ACTGGATCCGGCAGCCCCAGGGAAGGGACTGGAATGGATTGGGTCTATCT ATCACAGTGGGAGCACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCA TATCAGTAGACACGTCCAAGAACCACGTCTCCCTGAGGTTGACGTCTGTGAC CGCCGCAGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGACTACTACTACTACATG GACGTCTGGGGCAAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCG <i>SEQ ID NO.: 77</i>
NI-301.9X4 VL	TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCACTGTCCCCAGGACAGACGG CCAGGATCACCTGCTCTGGAGATGCGTTGCCAGACAAGTATGCTTATTGGTA CCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCTATGTTGGTTATATATAAGGACAGTGA GAGGCCCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAGTTTGGGGACAACA GTCATGCTGACCATCAGTGGAGTCCAGGCAGAGGACGAGGCTGACTATTAC TGTAATCAGCAGACAGCAGTGGTACTTATTGGGTGTTTCGGCGGGGGGACC AAGCTGACCGTCCTA <i>SEQ ID NO.: 79</i>
NI-301.14C3 VH	GAGGTGCAGCTGGTGGAGACTGGAGGAGGCTTGATCCAGCCTGGGGGGTCC CTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGGTTACCGTCAGTAGCCACTACATGA GCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAGTGGGTCTCAATTATTT ATAGCGGTGGTGGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCA TCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAG AGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAAGATCTACAGGTCGGGTAA TACTGGTTATTCTTACGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCC TCG <i>SEQ ID NO.: 81</i>
NI-301.14C3 VL	TCCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCAGTGTCCGTGTCCCCAGGGCAGACAG CCAGCATCACCTGCTCTGGAGATAAATTGGGGAGTAAATATGCTTGCTGGTA TCAGCAGAAGCCAGGCCAGTCCCCTGTACTGGTCATCTATGAAGATAAGAA GCGGCCCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCAACCTCTGGGAACACA GCCACTCTGACCATCAGCGGGACCCAGGCTATGGATGAGGCTGACTATTCT GTCAGGCGTGGGACAGCAGCACTTCTCATGTGGTATTCGGCGGAGGGACCA GGCTGACCGTCCTA <i>SEQ ID NO.: 83</i>

Debido a la estrategia de clonación, la secuencia de aminoácidos en los extremos N y C de la cadena pesada y las cadenas ligeras puede contener alteraciones inducidas por cebadores en FR1 y FR4, que sin embargo no afectan sustancialmente a la actividad biológica del anticuerpo. Para proporcionar un anticuerpo humano de consenso, las secuencias de nucleótidos y aminoácidos del clon original pueden alinearse y ajustarse de acuerdo con las secuencias de la región variable de la línea germinal humana pertinentes en la base de datos; véase, por ejemplo, Vbase2, como se describió anteriormente. La secuencia de aminoácidos de los anticuerpos humanos se indica en **negrita** cuando se considera que los aminoácidos del extremo terminal N y C se desvían potencialmente de la secuencia de la línea germinal de consenso debido al cebador de PCR y, por lo tanto, han sido reemplazados por la corrección de mutación inducida por cebador (PIMC), véase la Tabla III. En consecuencia, en una realización de la presente invención, el polinucleótido comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un ácido nucleico que tiene una secuencia polinucleotídica de la VH como se muestra en la Tabla III y la región VL correspondiente de un anticuerpo anti-TTR como se muestra en Tabla II.

Tabla III: Secuencias de nucleótidos de la región V_H y V_L de anticuerpos que reconocen especies de TTR mutadas, mal plegadas, mal ensambladas o agregadas y/o fragmentos de las mismas que muestran reemplazo por PIMC (negrita).

Regiones alternativas de anticuerpos con PIMC	Secuencias de nucleótidos de cadenas pesadas variables (V _H)
NI-301.37F1-PIMC-V _H	CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACC CTGTCCCTCACCTGCAGTGTCTCTGGTGGCTCCATCATCAGTAGGAGTTCCTA CTGGGGCTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGGG TATCTATCATAGTGGGAACACTTACGACAACCCGTCCTCAAGAGTCGACTC ACCATGTCCGTAGACACGTGGAAGAACCAGTTCTCCCTGAATCTGAGGTCTG TGACCGCCGCAGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGGATAGTGCCGGGGG GTGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCG <i>SEQ ID NO.: 52</i>

5 La presente invención también incluye fragmentos de los polinucleótidos de la invención, como se describe en otra parte. Además, la invención también contempla polinucleótidos que codifican polinucleótidos de fusión, fragmentos Fab y otros derivados, como se describe en el presente documento.

10 Los polinucleótidos se pueden producir o fabricar mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, si se conoce la secuencia de nucleótidos del anticuerpo, se puede ensamblar un polinucleótido que codifica el anticuerpo a partir de oligonucleótidos sintetizados químicamente, por ejemplo, como se describe en Kutmeier et al., BioTechniques 17 (1994), 242, que, brevemente, implica la síntesis de oligonucleótidos superpuestos que contienen porciones de la secuencia que codifica el anticuerpo, hibridación y ligado de esos oligonucleótidos, y luego amplificación de los oligonucleótidos ligados por PCR.

15 Alternativamente, se puede generar un polinucleótido que codifica un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo a partir de ácido nucleico de una fuente adecuada. Si un clon que contiene un ácido nucleico que codifica un anticuerpo en particular no está disponible, pero se conoce la secuencia de la molécula del anticuerpo, se puede sintetizar u obtener químicamente un ácido nucleico que codifica el anticuerpo de una fuente adecuada (por ejemplo, una biblioteca de ADNc de anticuerpos, o una biblioteca de ADNc generada a partir de, o ácido nucleico, preferiblemente ARN poliA⁺, aislado de cualquier tejido o células que expresen el anticuerpo específico de TTR, tal como las células de hibridoma seleccionadas para expresar un anticuerpo) mediante amplificación por PCR usando cebadores sintéticos hibridables con los extremos 3' y 5' de la secuencia o mediante clonación usando una sonda de oligonucleótidos específica para la secuencia genética particular para identificar, por ejemplo, un clon de ADNc de una biblioteca de ADNc que codifica el anticuerpo. Los ácidos nucleicos amplificados generados por PCR pueden luego clonarse en vectores de clonación replicables usando cualquier método bien conocido en la técnica. Por consiguiente, en una realización de la presente invención, el ADNc que codifica un anticuerpo, cadena de inmunoglobulina o fragmento del mismo se usa para la producción de un anticuerpo anti-TTR.

30 Una vez que se determina la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos correspondiente del anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo, su secuencia de nucleótidos puede manipularse usando métodos bien conocidos en la técnica para la manipulación de secuencias de nucleótidos, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante, mutagénesis dirigida al sitio, PCR, etc. (véase, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1990) y Ausubel et al., Eds., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1998)), para generar anticuerpos que tienen una secuencia de aminoácidos diferente, por ejemplo para crear sustituciones, eliminaciones y/o inserciones de aminoácidos.

40 IV. Expresión de polipéptidos de anticuerpos

Después de la manipulación del material genético aislado para proporcionar anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención, los polinucleótidos que codifican los anticuerpos se insertan típicamente en un vector de expresión para su introducción en las células huésped que pueden usarse para producir la cantidad deseada de anticuerpo. En el presente documento se describe la expresión recombinante de un anticuerpo, o fragmento, derivado o análogo del mismo, por ejemplo, una cadena pesada o ligera de un anticuerpo que se une a una molécula objetivo. Una vez que se ha obtenido un polinucleótido que codifica una molécula de anticuerpo o una cadena pesada o ligera de un anticuerpo, o una porción del mismo (que contiene preferiblemente el dominio variable de la cadena pesada o ligera), de la invención, el vector para la producción de la molécula de anticuerpo puede ser producido mediante tecnología de ADN recombinante usando técnicas bien conocidas en el arte. Por lo tanto, en la presente memoria se describen métodos para preparar una proteína mediante la expresión de un polinucleótido que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo. Pueden usarse métodos que

son bien conocidos por los expertos en la técnica para construir vectores de expresión que contienen secuencias codificantes de anticuerpos y señales apropiadas de control transcripcional y traduccional. Estos métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*. La invención, por tanto, proporciona vectores replicables que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de anticuerpo de la invención, o una cadena pesada o ligera de la misma, o un dominio variable de cadena pesada o ligera, operativamente unido a un promotor. Dichos vectores pueden incluir la secuencia de nucleótidos que codifica la región constante de la molécula de anticuerpo (véanse, por ejemplo, las solicitudes internacionales WO 86/05807 y WO 89/01036; y la patente de los Estados Unidos No. 5.122.464) y el dominio variable del anticuerpo puede clonarse en tal vector para la expresión de toda la cadena pesada o ligera.

El término "vector" o "vector de expresión" se usa en el presente documento para referirse a vectores usados de acuerdo con la presente invención como vehículo para introducir y expresar un gen deseado en una célula huésped. Como saben los expertos en la técnica, tales vectores pueden seleccionarse fácilmente del grupo que consiste en plásmidos, fagos, virus y retrovirus. En general, los vectores compatibles con la presente invención comprenderán un marcador de selección, sitios de restricción apropiados para facilitar la clonación del gen deseado y la capacidad de entrar y/o replicarse en células eucariotas o procariotas. Para los propósitos de esta invención, se pueden emplear numerosos sistemas de vectores de expresión. Por ejemplo, una clase de vector utiliza elementos de ADN que se derivan de virus animales tales como virus del papiloma bovino, virus de polioma, adenovirus, virus vaccinia, baculovirus, retrovirus (RSV, MMTV o MOMLV) o virus SV40. Otros implican el uso de sistemas policistronicos con sitios internos de unión a ribosomas. Además, las células que han integrado el ADN en sus cromosomas pueden seleccionarse introduciendo uno o más marcadores que permitan la selección de células huésped transfectadas. El marcador puede proporcionar prototrofia a un huésped auxotrófico, resistencia a biocidas (por ejemplo, antibióticos) o resistencia a metales pesados como el cobre. El gen marcador seleccionable puede unirse directamente a las secuencias de ADN a expresar o introducirse en la misma célula mediante cotransformación. También pueden ser necesarios elementos adicionales para la síntesis óptima de ARNm. Estos elementos pueden incluir secuencias señal, señales de empalme, así como promotores, potenciadores y señales de terminación de la transcripción.

En realizaciones particularmente preferidas, los genes de la región variable clonados se insertan en un vector de expresión junto con los genes de la región constante de la cadena pesada y ligera (preferiblemente humanos) como se discutió anteriormente. Este vector contiene el promotor/potenciador del citomegalovirus, el promotor principal de la beta globina de ratón, el origen de replicación de SV40, la secuencia de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina, exón 1 y exón 2 de neomicina fosfotransferasa, el gen de la dihidrofolato reductasa y la secuencia líder. Se ha encontrado que este vector da como resultado un nivel muy alto de expresión de anticuerpos tras la incorporación de genes de región variable y constante, transfección en células CHO, seguida de selección en medio que contiene G418 y amplificación con metotrexato. Por supuesto, en la presente invención puede usarse cualquier vector de expresión que sea capaz de provocar expresión en células eucariotas. Los ejemplos de vectores adecuados incluyen, pero no se limitan a, los plásmidos pcADN3, pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEF1/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His, pVAX1, y pZeoSV2 (disponibles a través de Invitrogen, San Diego, CA) y plásmido pCI (disponible a través de Promega, Madison, WI). En general, el cribado de un gran número de células transformadas en busca de aquellas que expresan niveles adecuadamente altos si las cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulina, es una experimentación de rutina que se puede realizar, por ejemplo, mediante sistemas robóticos. Los sistemas de vectores también se enseñan en las patentes de los Estados Unidos Nos. 5.736.137 y 5.658.570. Este sistema proporciona altos niveles de expresión, por ejemplo, > 30 pg/célula/día. Otros ejemplos de sistemas de vectores se describen, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos No. 6.413.777.

En otras realizaciones preferidas, los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención pueden expresarse usando constructos policistronicos tales como los descritos en la publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos No. 2003-0157641 A1. En estos sistemas de expresión, se pueden producir múltiples productos génicos de interés tales como cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos a partir de un único constructo policistronico. Estos sistemas usan ventajosamente un sitio de entrada al ribosoma interno (IRES) para proporcionar niveles relativamente altos de anticuerpos. Las secuencias IRES compatibles se describen en la patente de los Estados Unidos No. 6.193.980. Los expertos en la técnica apreciarán que tales sistemas de expresión se pueden usar para producir eficazmente la gama completa de anticuerpos descritos en la presente solicitud. Por lo tanto, en una realización, la presente invención proporciona un vector que comprende el polinucleótido que codifica al menos el dominio de unión o la región variable de una cadena de inmunoglobulina del anticuerpo, opcionalmente en combinación con un polinucleótido que codifica la región variable de la otra cadena de inmunoglobulina de dicha molécula de unión.

Más en general, una vez que se ha preparado el vector o la secuencia de ADN que codifica una subunidad monomérica del anticuerpo, el vector de expresión puede introducirse en una célula huésped apropiada. La introducción del plásmido en la célula huésped puede realizarse mediante diversas técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica. Estos incluyen, pero no se limitan a, transfección que incluye lipotransfección usando, por ejemplo, Eugene® o lipofectamina, fusión de protoplastos, precipitación con fosfato de calcio, fusión celular con ADN envuelto, microinyección e infección con virus intacto. Normalmente, la introducción del plásmido en el huésped se realiza mediante el método estándar de coprecipitación con fosfato de calcio. Las células huésped que albergan el constructo de expresión se cultivan en condiciones apropiadas para la producción de las cadenas ligeras y pesadas, y se analizan

para la síntesis de proteínas de cadena pesada y/o ligera. Los ejemplos de técnicas de ensayo incluyen el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA) o análisis de clasificación de células activado por fluorescencia (FACS), inmunohistoquímica y similares.

El vector de expresión se transfiere a una célula huésped mediante técnicas convencionales y las células transfectadas se cultivan luego mediante técnicas convencionales para producir un anticuerpo para su uso en los métodos descritos en el presente documento. Por lo tanto, la invención incluye células huésped que comprenden un polinucleótido que codifica un anticuerpo de la invención, o una cadena pesada o ligera del mismo, o al menos el dominio de unión o región variable de una inmunoglobulina del mismo, que preferiblemente son operables unidos a un promotor heterólogo. Además o alternativamente, la invención también incluye células huésped que comprenden un vector, como se definió anteriormente, que comprende un polinucleótido que codifica al menos el dominio de unión o la región variable de una cadena de inmunoglobulina del anticuerpo, opcionalmente en combinación con un polinucleótido que codifica la región variable de la otra cadena de inmunoglobulina de dicha molécula de unión. En realizaciones preferidas para la expresión de anticuerpos de doble cadena, un único vector o vectores que codifican tanto la cadena pesada como la ligera pueden coexpresarse en la célula huésped para la expresión de la molécula de inmunoglobulina completa, como se detalla a continuación.

La célula huésped puede cotransfectarse con dos vectores de expresión de la invención, el primer vector que codifica un polipéptido derivado de cadena pesada y el segundo vector que codifica un polipéptido derivado de cadena ligera. Los dos vectores pueden contener marcadores seleccionables idénticos que permiten una expresión igual de polipéptidos de cadena pesada y ligera. Alternativamente, puede usarse un solo vector que codifique polipéptidos de cadena pesada y ligera. En tales situaciones, la cadena ligera se coloca ventajosamente antes de la cadena pesada para evitar un exceso de cadena pesada libre tóxica; véase Proudfoot, Nature 322 (1986), 52; Kohler, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 77 (1980), 2197. Las secuencias de codificación de las cadenas pesada y ligera pueden comprender ADNc o ADN genómico.

Como se usa en este documento, "células huésped" se refiere a células que albergan vectores construidos usando técnicas de ADN recombinante y que codifican al menos un gen heterólogo. En las descripciones de los procesos para el aislamiento de anticuerpos de huéspedes recombinantes, los términos "célula" y "cultivo celular" se utilizan indistintamente para indicar la fuente del anticuerpo a menos que se especifique claramente lo contrario. En otras palabras, la recuperación del polipéptido de las "células" puede significar tanto a partir de células completas centrifugadas como a partir del cultivo celular que contiene tanto el medio como las células suspendidas.

Se puede utilizar una variedad de sistemas del vector de expresión del huésped para expresar moléculas de anticuerpo para su uso en los métodos descritos en el presente documento. Tales sistemas de expresión del huésped representan vehículos mediante los cuales las secuencias codificantes de interés pueden producirse y posteriormente purificarse, pero también representan células que pueden, cuando se transforman o transfectan con las secuencias codificantes de nucleótidos apropiadas, expresar una molécula de anticuerpo de la invención *in situ*. Estos incluyen, pero no se limitan a, microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*) transformadas con vectores de expresión de ADN de bacteriófago recombinante, ADN de plásmido o ADN de cósmido que contienen secuencias de codificación de anticuerpos; levadura (por ejemplo, *Saccharomyces*, *Pichia*) transformada con vectores de expresión de levadura recombinantes que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; sistemas de células de insectos infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, baculovirus) que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; sistemas de células vegetales infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión de plásmidos recombinantes (por ejemplo, plásmido Ti) que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; o sistemas de células de mamífero (por ejemplo, células COS, CHO, NSO, BLK, 293, 3T3) que albergan constructos de expresión recombinantes que contienen promotores derivados del genoma de células de mamífero (por ejemplo, promotor de metalotioneína) o de virus de mamífero (por ejemplo, el promotor tardío de adenovirus; el promotor 7.5K del virus vaccinia). Preferiblemente, se usan células bacterianas tales como *E. coli*, y más preferiblemente, células eucariotas, especialmente para la expresión de la molécula de anticuerpo recombinante completa, para la expresión de una molécula de anticuerpo recombinante. Por ejemplo, las células de mamífero tales como las células de ovario de hámster chino (CHO), junto con un vector tal como el elemento promotor del gen temprano intermedio principal del citomegalovirus humano es un sistema de expresión eficaz para anticuerpos; véase, por ejemplo, Foecking et al., Gene 45 (1986), 101; Cockett et al., Bio/Technology 8 (1990), 2.

La línea de células huésped utilizada para la expresión de proteínas es a menudo de origen mamífero; a los expertos en la técnica se les atribuye la capacidad de determinar preferentemente líneas de células huésped particulares que son las más adecuadas para que el producto génico deseado se exprese en ellas. Los ejemplos de líneas de células huésped incluyen, pero no se limitan a, CHO (ovario de hámster chino), DG44 y DUXB11 (líneas de ovario de hámster chino, DHFR menos), HELA (carcinoma cervical humano), CVI (línea de riñón de mono), COS (un derivado de CVI con antígeno T de SV40), VERY, BHK (riñón de hámster bebé), MDCK, WI38, R1610 (fibroblasto de hámster chino), BALBC/3T3 (fibroblasto de ratón), HAK (línea de riñón de hámster), SP2/O (mieloma de ratón), P3x63-Ag3.653 (mieloma de ratón), BFA-1c1BPT (células endoteliales bovinas), RAJI (linfocito humano) y 293 (riñón humano). Se prefieren particularmente las células CHO y 293. Las líneas de células huésped están disponibles típicamente en servicios comerciales, la American Tissue Culture Collection o en la literatura publicada.

Además, se puede elegir una cepa de célula huésped que modula la expresión de las secuencias insertadas, o modifica y procesa el producto génico de la forma específica deseada. Tales modificaciones (por ejemplo, glicosilación) y procesamiento (por ejemplo, escisión) de productos proteicos pueden ser importantes para la función de la proteína. Las diferentes células huésped tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento y modificación postraduccionales de proteínas y productos génicos. Se pueden elegir líneas celulares o sistemas hospedadores apropiados para asegurar la modificación y el procesamiento correctos de la proteína foránea expresada. Con este fin, pueden usarse células huésped eucariotas que poseen la maquinaria celular para el procesamiento adecuado del transcrito primario, glicosilación y fosforilación del producto génico.

Para la producción de alto rendimiento a largo plazo de proteínas recombinantes, se prefiere la expresión estable. Por ejemplo, pueden diseñarse líneas celulares que expresan de manera estable la molécula de anticuerpo. En lugar de usar vectores de expresión que contienen orígenes virales de replicación, las células huésped se pueden transformar con ADN controlado por elementos de control de expresión apropiados (por ejemplo, promotor, potenciador, secuencias, terminadores de transcripción, sitios de poliadenilación, etc.) y un marcador seleccionable. Después de la introducción del ADN foráneo, se puede permitir que las células modificadas crezcan durante 1-2 días en un medio enriquecido y luego se cambian a un medio selectivo. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite que las células integren de manera estable el plásmido en sus cromosomas y crezcan para formar focos que, a su vez, pueden clonarse y expandirse en líneas celulares. Este método puede usarse ventajosamente para modificar líneas celulares que expresen de manera estable la molécula de anticuerpo.

Pueden usarse varios sistemas de selección, que incluyen pero no se limitan a la timidina quinasa del virus del herpes simple (Wigler et al., Cell 11 (1977), 223), genes de hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (Szybalska y Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48 (1992), 202), y de adenina fosforibosiltransferasa (Lowy et al., Cell 22 (1980), 817) pueden emplearse en células tk, hgp^rt o apr^r, respectivamente. Además, la resistencia a los antimetabolitos se puede utilizar como base para la selección de los siguientes genes: dhfr, que confiere resistencia al metotrexato (Wigler et al., Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980), 357; O'Hare et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (1981), 1527); gpt, que confiere resistencia al ácido micofenólico (Mulligan y Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (1981), 2072); neo, que confiere resistencia al aminoglucósido G-418, Goldspiel et al., Clinical Pharmacy 12 (1993), 488-505; Wu y Wu, Biotherapy 3 (1991), 87-95; Tolstoshev, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32 (1993), 573-596; Mulligan, Science 260 (1993), 926-932; y Morgan y Anderson, Ann. Rev. Biochem. 62 (1993), 191-217; TIB TECH 11 (1993), 155-215; e hyg^r, que confiere resistencia a la higromicina (Santerre et al., Gene 30 (1984), 147). Los métodos comúnmente conocidos en la técnica de la tecnología de ADN recombinante que se pueden usar se describen en Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990); y en los Capítulos 12 y 13, Dracopoli et al. (eds), Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY (1994); Colberre-Garapin et al., J. Mol. Biol. 150: 1 (1981).

Los niveles de expresión de una molécula de anticuerpo pueden aumentarse mediante amplificación del vector, para una revisión; véase Bebbington y Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Academic Press, Nueva York, vol. 3. (1987). Cuando un marcador en el sistema de vector que expresa el anticuerpo es amplificable, el aumento del nivel de inhibidor presente en el cultivo de la célula huésped aumentará el número de copias del gen marcador. Dado que la región amplificada está asociada con el gen del anticuerpo, la producción del anticuerpo también aumentará; véase Crouse et al., Mol. Cell Biol. 3 (1983), 257.

La producción *in vitro* permite la ampliación para producir grandes cantidades de los polipéptidos deseados. Las técnicas para el cultivo de células de mamíferos en condiciones de cultivo de tejidos se conocen en la técnica e incluyen cultivo en suspensión homogéneo, por ejemplo, en un reactor de transporte aéreo o en un reactor de agitación continua, o cultivo celular inmovilizado o atrapado, por ejemplo, en fibras huecas, microcápsulas, sobre micropelotas de agarosa o cartuchos cerámicos. Si es necesario y/o deseado, las soluciones de polipéptidos se pueden purificar por los métodos habituales de cromatografía, por ejemplo, filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía sobre DEAE-celulosa o cromatografía de (inmuno) afinidad, por ejemplo, después de la biosíntesis preferencial de un polipéptido sintético de la región bisagra o antes o después de la etapa de cromatografía HIC descrita en el presente documento.

Los genes que codifican anticuerpos, o fragmentos de unión a antígenos, variantes o derivados de los mismos de la invención también pueden expresarse en células de no mamíferos tales como bacterias o insectos o células de levadura o de plantas. Las bacterias que absorben fácilmente ácidos nucleicos incluyen miembros de las Enterobacterias, tales como cepas de *E. coli* o *Salmonella*; bacilos, tales como *B. subtilis*; *Pneumococcus*; *Streptococcus* y *Haemophilus influenzae*. Se apreciará además que, cuando se expresan en bacterias, los polipéptidos heterólogos típicamente pasan a formar parte de cuerpos de inclusión. Los polipéptidos heterólogos deben aislarse, purificarse y luego ensamblarse en moléculas funcionales. Cuando se deseen formas tetravalentes de anticuerpos, las subunidades se autoensamblarán en anticuerpos tetravalentes; véase, por ejemplo, la solicitud internacional WO 02/096948.

En sistemas bacterianos, se pueden seleccionar ventajosamente varios vectores de expresión dependiendo del uso previsto para la molécula de anticuerpo que se expresa. Por ejemplo, cuando se va a producir una gran cantidad de

dicha proteína, para la generación de composiciones farmacéuticas de una molécula de anticuerpo, pueden ser deseables vectores que dirijan la expresión de altos niveles de productos de proteína de fusión que se purifiquen fácilmente. Dichos vectores incluyen, pero no se limitan, al vector de expresión de *E. coli* pUR278 (Ruther et al., EMBO J. 2 (1983), 1791), en el que la secuencia de codificación del anticuerpo puede ligarse individualmente en el vector en el marco con la región codificante lacZ para que se produzca una proteína de fusión; vectores pIN (Inouye e Inouye, Nucleic Acids Res. 13 (1985), 3101-3109; Van Heeke y Schuster, J. Biol. Chem. 24 (1989), 5503-5509); y similares. Los vectores pGEX también se pueden usar para expresar polipéptidos foráneos como proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST). En general, tales proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse fácilmente a partir de células lisadas mediante adsorción y unión a una matriz de perlas de glutatión-agarosa seguido de elución en presencia de glutatión libre. Los vectores pGEX están diseñados para incluir sitios de escisión de proteasa de factor Xa o trombina, de modo que el producto del gen objetivo clonado pueda liberarse de la fracción GST.

Además de los procariontes, también se pueden usar microbios eucariotes. *Saccharomyces cerevisiae*, o la levadura de panadería común, es el más comúnmente utilizado entre los microorganismos eucariotes, aunque hay muchas otras cepas comúnmente disponibles, por ejemplo, *Pichia pastoris*. Para la expresión en *Saccharomyces*, el plásmido YRp7, por ejemplo, (Stinchcomb et al., Nature 282 (1979), 39; Kingsman et al., Gene 7 (1979), 141; Tschemper et al., Gene 10 (1980), 157) se usa comúnmente. Este plásmido ya contiene el gen TRP1 que proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo ATCC No. 44076 o PEP4-1 (Jones, Genetics 85 (1977), 12). La presencia de la lesión de trp1 como característica del genoma de la célula huésped de levadura proporciona entonces un entorno eficaz para detectar la transformación por crecimiento en ausencia de triptófano.

En un sistema de insectos, el virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) se usa típicamente como vector para expresar genes foráneos. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia de codificación del anticuerpo puede clonarse individualmente en regiones no esenciales (por ejemplo, el gen de la polihedrina) del virus y colocarse bajo el control de un promotor de AcNPV (por ejemplo, el promotor de polihedrina).

Una vez que una molécula de anticuerpo de la invención se ha expresado de manera recombinante, los anticuerpos completos, sus dímeros, cadenas ligeras y pesadas individuales u otras formas de inmunoglobulina de la presente invención, pueden purificarse de acuerdo con procedimientos estándar de la técnica, incluyendo por ejemplo, mediante cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, particularmente por afinidad por el antígeno específico después de la proteína A, y cromatografía en columna de exclusión por tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial, por ejemplo precipitación con sulfato de amonio, o por cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas; véase, por ejemplo, Scopes, Protein Purification, Springer Verlag, N.Y. (1982). Alternativamente, un método preferido para aumentar la afinidad de los anticuerpos de la invención se describe en la publicación de patente de los Estados Unidos No. 2002-0123057 A1. Por lo tanto, en una realización, la presente invención también proporciona un método para preparar un anticuerpo anti-TTR o un anticuerpo que reconoce especies de TTR mutadas, mal plegadas, mal ensambladas o agregadas y/o fragmentos de las mismas o cadena o cadenas de inmunoglobulina de las mismas, comprendiendo dicho método:

- (a) cultivar la célula huésped como se definió aquí anteriormente, célula que comprende un polinucleótido o un vector como se definió aquí anteriormente; y
- (b) aislar dicho anticuerpo o cadena o cadenas de inmunoglobulina del mismo del cultivo.

Además, en una realización, la presente invención también se refiere a un anticuerpo o cadena o cadenas de inmunoglobulina del mismo codificado por un polinucleótido como se definió aquí anteriormente u obtenible mediante el método para preparar un anticuerpo anti-TTR.

V. Proteínas de fusión y conjugados

En determinadas formas de realización, el polipéptido del anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos o una o más fracciones que normalmente no están asociadas con un anticuerpo. A continuación se describen ejemplos de modificaciones con más detalle. Por ejemplo, un fragmento de anticuerpo Fv de cadena sencilla de la invención puede comprender una secuencia enlazadora flexible o puede modificarse para añadir una fracción funcional (por ejemplo, PEG, un fármaco, una toxina o un marcador tal como un marcador fluorescente, radiactivo, enzima, magnético nuclear, metal pesado y similares).

Un polipéptido de anticuerpo de la invención puede comprender, consistir esencialmente en o consistir en una proteína de fusión. Las proteínas de fusión son moléculas quiméricas que comprenden, por ejemplo, un dominio de unión a TTR de inmunoglobulina con al menos un sitio de unión objetivo y al menos una porción heteróloga, es decir, una porción con la que no está unida naturalmente en la naturaleza. Las secuencias de aminoácidos pueden existir normalmente en proteínas separadas que se juntan en el polipéptido de fusión o pueden existir normalmente en la misma proteína pero se colocan en una nueva disposición en el polipéptido de fusión. Las proteínas de fusión se pueden crear, por ejemplo, mediante síntesis química, o creando y traduciendo un polinucleótido en el que las regiones peptídicas están codificadas en la relación deseada.

El término "heterólogo" tal como se aplica a un polinucleótido o polipéptido, significa que el polinucleótido o polipéptido se deriva de una entidad distinta de la del resto de la entidad con la que se está comparando. Por ejemplo, como se usa en este documento, un "polipéptido heterólogo" que se fusionará con un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno, variante o análogo del mismo se deriva de un polipéptido no de inmunoglobulina de la misma especie, o un polipéptido de inmunoglobulina o no de inmunoglobulina de una especie diferente. Como se discute con más detalle en otra parte de este documento, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención pueden fusionarse de manera recombinante con un polipéptido heterólogo en el extremo terminal N o C o conjugarse químicamente (incluyendo conjugaciones covalentes y no covalentes) con polipéptidos u otras composiciones. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden fusionar o conjugar de forma recombinante con moléculas útiles como marcadores en ensayos de detección y moléculas efectoras tales como polipéptidos heterólogos, fármacos, radionúclidos o toxinas; véanse, por ejemplo, las solicitudes internacionales WO 92/08495; WO 91/14438; WO 89/12624; la patente de los Estados Unidos No. 5.314.995; y la solicitud de patente europea EP 0 396 387.

Los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención pueden estar compuestos de aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados, es decir, isómeros peptídicos, y pueden contener aminoácidos distintos de los 20 aminoácidos codificados por genes. Los anticuerpos pueden modificarse mediante procesos naturales, tales como procesamiento postraduccional, o mediante técnicas de modificación química que son bien conocidas en la técnica. Tales modificaciones están bien descritas en textos básicos y en monografías más detalladas, así como en una voluminosa literatura de investigación. Pueden producirse modificaciones en cualquier parte del anticuerpo, incluida la estructura del péptido, las cadenas laterales de aminoácidos y los extremos amino o carboxilo, o en fracciones tales como carbohidratos. Se apreciará que el mismo tipo de modificación puede estar presente en el mismo grado o en grados variables en varios sitios de un anticuerpo dado. Además, un anticuerpo dado puede contener muchos tipos de modificaciones. Los anticuerpos pueden estar ramificados, por ejemplo, como resultado de la ubiquitinación, y pueden ser cíclicos, con o sin ramificación. Los anticuerpos cíclicos, ramificados y cíclicos ramificados pueden resultar de procesos naturales postraduccionales o pueden obtenerse mediante métodos de síntesis. Las modificaciones incluyen acetilación, acilación, ribosilación de ADP, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de una fracción hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o derivado de lípido, unión covalente de fosfatidilinositol, entrecruzamiento, ciclación, formación de enlaces disulfuro, desmetilación, formación de entrecruzamientos covalentes, formación de cisteína, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, glicosilación, formación de anclaje GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, pegilación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfatación, adición de aminoácidos mediada por transferencia de ARN a proteínas tales como arginilación y ubiquitinación; véase, por ejemplo, *Proteins - Structure And Molecular Properties*, T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, Nueva York 2ª Ed., (1993); *Posttranslational Covalent Modification Of Proteins*, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, Nueva York, (1983) 1-12; Seifter et al., *Meth. Enzymol.* 182 (1990), 626-646; Rattan et al., *Ann. NY Acad. Sci.* 663 (1992), 48- 62).

La presente invención también proporciona proteínas de fusión que comprenden un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y un polipéptido heterólogo. La proteína de fusión comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de al menos una región V_H de un anticuerpo de la invención y la secuencia de aminoácidos de al menos una región V_L de un anticuerpo de la invención o fragmentos, derivados o variantes del mismo, y un secuencia polipeptídica heteróloga. Preferiblemente, las regiones V_H y V_L de la proteína de fusión corresponden a un anticuerpo de fuente única (o fragmento scFv o Fab) que se une específicamente a TTR. En otra realización más, una proteína de fusión para uso en los métodos de diagnóstico y tratamiento descritos en este documento comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de una, dos, tres o más de las CDR de V_H de un anticuerpo y la secuencia de aminoácidos de cualquier una, dos, tres o más de las CDR de V_L de un anticuerpo, o fragmentos o variantes del mismo, y una secuencia polipeptídica heteróloga. Preferiblemente, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más de la o las CDR de V_H - o la o las CDR de V_L corresponden a un anticuerpo de fuente única (o fragmento scFv o Fab) de la invención. Las moléculas de ácido nucleico que codifican estas proteínas de fusión también están incluidas en la invención.

Los ejemplos de proteínas de fusión reportados en la literatura incluyen fusiones del receptor de células T (Gascoigne et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987), 2936-2940; CD4 (Capon et al., *Nature* 337 (1989), 525-531; Traunecker et al., *Nature* 339 (1989), 68-70; Zettmeissl et al., *ADN Cell Biol. USA* 9 (1990), 347-353; y Byrn et al., *Nature* 344 (1990), 667-670); selectina L (receptor homing) (Watson et al., *J. Cell. Biol.* 110 (1990), 2221-2229; y Watson et al., *Nature* 349 (1991), 164 -167); CD44 (Aruffo et al., *Cell* 61 (1990), 1303-1313); CD28 y B7 (Linsley et al., *J. Exp. Med.* 173 (1991), 721-730); CTLA-4 (Lisley et al., *J. Exp. Med.* 174 (1991), 561-569); CD22 (Stamenkovic et al., *Cell* 66 (1991), 1133-1144); receptor de TNF (Ashkenazi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 (1991), 10535-10539; Lesslauer et al., *Eur. J. Immunol.* 27 (1991), 2883-2886; y Peppel et al., *J. Exp. Med.* 174 (1991), 1483-1489 (1991); y receptor a de IgE (Ridgway y Gorman, *J. Cell. Biol.* 115 (1991), Resumen No. 1448).

Como se discute en otra parte de este documento, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención se pueden fusionar con polipéptidos heterólogos para aumentar la semivida *in vivo* de los polipéptidos o para su uso en inmunoensayos usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una realización, PEG se puede conjugar con los anticuerpos de la invención para aumentar su semivida *in vivo*; véase,

por ejemplo, Leong et al., Cytokine 16 (2001), 106-119; Adv. in Drug Deliv. Rev. 54 (2002), 531; o Weir et al., Biochem. Soc. Transactions 30 (2002), 512.

Además, los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención se pueden fusionar con secuencias marcadoras, tales como un péptido, para facilitar su purificación o detección. En realizaciones preferidas, la secuencia de aminoácidos marcadora es un péptido de hexahistidina (HIS), tal como la etiqueta proporcionada en un vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311), entre otros, muchos de los cuales están disponibles comercialmente. Como se describe en Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989), 821-824, por ejemplo, la hexahistidina proporciona una purificación conveniente de la proteína de fusión. Otras etiquetas peptídicas útiles para la purificación incluyen, pero no se limitan a, la etiqueta "HA", que corresponde a un epítipo derivado de la proteína hemaglutinina de la influenza (Wilson et al., Cell 37 (1984), 767), GST, c-myc y la etiqueta "flag"; véase, por ejemplo, Bill Brizzard, BioTechniques 44 (2008) 693-695 para una revisión de las técnicas de marcado de epítopos, y la Tabla 1 en la página 694 enumera las etiquetas de epítipo más comunes utilizables en la presente invención.

Las proteínas de fusión se pueden preparar usando métodos que son bien conocidos en la técnica; véanse, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos Nos. 5.116.964 y 5.225.538. El sitio preciso en el que se realiza la fusión puede seleccionarse empíricamente para optimizar las características de secreción o unión de la proteína de fusión. A continuación, el ADN que codifica la proteína de fusión se transfecta en una célula huésped para su expresión, que se realiza como se describió aquí anteriormente.

Los anticuerpos de la presente invención se pueden usar en forma no conjugada o se pueden conjugar con al menos una de una variedad de moléculas, por ejemplo, para mejorar las propiedades terapéuticas de la molécula, para facilitar la detección del objetivo, o para obtener imágenes o terapia del paciente. Los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígenos, variantes o derivados de los mismos de la invención pueden marcarse o conjugarse antes o después de la purificación, cuando se realiza la purificación. En particular, los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención pueden conjugarse con agentes terapéuticos, profármacos, péptidos, proteínas, enzimas, virus, lípidos, modificadores de la respuesta biológica, agentes farmacéuticos o PEG.

Los conjugados que son inmunotoxinas que incluyen anticuerpos convencionales se han descrito ampliamente en la técnica. Las toxinas pueden acoplarse a los anticuerpos mediante técnicas de acoplamiento convencionales o pueden producirse inmunotoxinas que contienen porciones de toxina proteica como proteínas de fusión. Los anticuerpos de la presente invención pueden usarse de manera correspondiente para obtener tales inmunotoxinas. Son ilustrativas de tales inmunotoxinas las descritas por Byers, Seminars Cell. Biol. 2 (1991), 59-70 y por Fanger, Immunol. Today 12 (1991), 51-54.

Los expertos en la técnica apreciarán que los conjugados también se pueden ensamblar usando una variedad de técnicas dependiendo del agente seleccionado a conjugar. Por ejemplo, se preparan conjugados con biotina, por ejemplo, haciendo reaccionar un polipéptido de unión a TTR con un éster activado de biotina tal como el éster de biotina N-hidroxisuccinimida. De manera similar, se pueden preparar conjugados con un marcador fluorescente en presencia de un agente de acoplamiento, por ejemplo, los enumerados en el presente documento, o mediante reacción con un isotiocianato, preferiblemente isotiocianato de fluoresceína. Los conjugados de los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígenos, variantes o derivados de los mismos de la invención se preparan de manera análoga.

La presente invención abarca además anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la invención conjugados con un agente de diagnóstico o terapéutico. Los anticuerpos se pueden usar para diagnóstico para, por ejemplo, demostrar la presencia de una amiloidosis por TTR para indicar el riesgo de contraer una enfermedad o trastorno asociado con TTR mal plegada, mal ensamblada o agregada, para controlar el desarrollo o progresión de dicha enfermedad, es decir, una enfermedad que muestre la ocurrencia de, o relacionado con, TTR mal plegada-agregada plegada, mal ensamblada o como parte de un procedimiento de prueba clínica para, por ejemplo, determinar la eficacia de un tratamiento dado y/o régimen de prevención. Por lo tanto, en una realización, la presente invención se refiere a un anticuerpo, que está marcado de forma detectable. Además, en una realización, la presente invención se refiere a un anticuerpo que está unido a un fármaco. La detección puede facilitarse acoplando el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo a una sustancia detectable. Las sustancias o marcadores detectables pueden ser en general una enzima; un metal pesado, preferiblemente oro; un tinte, preferiblemente un tinte fluorescente o luminiscente; o una etiqueta radiactiva. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen varias enzimas, grupos protésicos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, materiales radiactivos, metales emisores de positrones que utilizan diversas tomografías por emisión de positrones y iones metálicos paramagnéticos no radiactivos; véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos No. 4.741.900 para iones metálicos que pueden conjugarse con anticuerpos para su uso como diagnóstico de acuerdo con la presente invención. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa; ejemplos de complejos de grupos protésicos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, fluoresceína de diclorotriazinilamina, cloruro de dansilo o ficeitritina; un ejemplo de material luminiscente incluye luminol; ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina y aequorina; y ejemplos de material radiactivo adecuado incluyen ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹¹¹In o ⁹⁹Tc. Por lo

tanto, en una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo marcado de forma detectable, en el que el marcador detectable se selecciona del grupo que consiste en una enzima, un radioisótopo, un fluoróforo y un metal pesado.

Un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo también puede marcarse de forma detectable acoplándolo a un compuesto quimioluminiscente. La presencia del anticuerpo marcado con quimioluminiscencia se determina luego detectando la presencia de luminiscencia que surge durante el curso de una reacción química. Ejemplos de compuestos de marcaje quimioluminiscentes particularmente útiles son luminol, isoluminol, éster de acridinio Theromatic, imidazol, sal de acridinio y éster de oxalato.

Una de las formas en que un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo puede marcarse de forma detectable es uniendo el mismo a una enzima y utilizando el producto enlazado en un inmunoensayo enzimático (EIA) (Voller, A., "The Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay (ELISA)" Publicación trimestral de Microbiological Associates, Walkersville, Maryland, Diagnostic Horizons 2 (1978), 1-7; Voller et al., J. Clin. Pathol. 31 (1978), 507-520; Butler, Meth. Enzymol. 73 (1981), 482-523; Maggio, (ed.), Enzyme Immunoassay, CRC Press, Boca Raton, Fla., (1980); Ishikawa, et al., (Eds.), Enzyme Immunoassay, Kagu Shoin, Tokio (1981). La enzima, que está unida al anticuerpo, reaccionará con un sustrato apropiado, preferiblemente un sustrato cromogénico, de tal manera que produzca una fracción química que pueda detectarse, por ejemplo, por medios espectrofotométricos, fluorimétricos o visuales. Las enzimas que pueden usarse para marcar de manera detectable el anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, malato deshidrogenasa, nucleasa estafilocócica, delta-5-esteroide isomerasa, alcohol de levadura deshidrogenasa, alfa-glicerofosfato, deshidrogenasa, triosa fosfato isomerasa, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, asparaginasa, glucosa oxidasa, beta-galactosidasa, ribonucleasa, ureasa, catalasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glucoamilasa y acetilcolinesterasa. Además, la detección se puede realizar mediante métodos colorimétricos que emplean un sustrato cromogénico para la enzima. La detección también se puede lograr mediante la comparación visual del grado de reacción enzimática de un sustrato en comparación con patrones preparados de manera similar.

La detección también se puede lograr usando cualquiera de una variedad de otros inmunoensayos. Por ejemplo, marcando radiativamente el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo, es posible detectar el anticuerpo mediante el uso de un radioinmunoensayo (RIA) (véase, por ejemplo, Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, (marzo de 1986)). El isótopo radiactivo se puede detectar mediante medios que incluyen, pero no se limitan a, un contador gamma, un contador de centelleo o autorradiografía.

Un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo también puede marcarse de forma detectable usando metales que emiten fluorescencia tales como ¹⁵²Eu, u otros de la serie de lantánidos. Estos metales se pueden unir al anticuerpo utilizando grupos quelantes de metales como el ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) o el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

Las técnicas para conjugar varias fracciones a un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo son bien conocidas, véase, por ejemplo, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al., (eds.), páginas 243-56 (Alan R. Liss, Inc. (1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", en Controlled Drug Delivery (2a Ed.), Robinson et al., (eds.), Marcel Dekker, Inc., (1987) 623-53; Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al., (eds.), (1985) 475-506; "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al., (eds.), Academic Press (1985) 303-16, y Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev. 62 (1982), 119-158.

Como se mencionó, en ciertas realizaciones, se puede conjugar una fracción que mejora la estabilidad o eficacia de una molécula de unión, por ejemplo, un polipéptido de unión, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento inmuno-específico del mismo. Por ejemplo, en una realización, PEG se puede conjugar con las moléculas de unión de la invención para aumentar su semivida *in vivo*. Leong et al., Cytokine 16 (2001), 106; Adv. in Drug Deliv. Rev. 54 (2002), 531; o Weir et al., Biochem. Soc. Transactions 30 (2002), 512.

VI. Composiciones y métodos de uso

La presente invención se refiere a composiciones que comprenden la molécula de unión a TTR mencionada anteriormente, por ejemplo, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención o derivado o variante del mismo, o el polinucleótido, vector, célula o péptido de la invención como se definió aquí anteriormente. En una realización, la composición de la presente invención es una composición farmacéutica y además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable. Además, la composición farmacéutica de la presente invención puede comprender agentes adicionales tales como interleucinas o interferones dependiendo del uso pretendido de la composición farmacéutica. Para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno que muestra la aparición de, o relacionado con, TTR mutada, mal plegada, mal ensamblada o agregada, tal como amiloidosis por TTR, el agente

adicional puede seleccionarse del grupo que consiste en pequeñas moléculas orgánicas, anticuerpos anti-TTR y combinaciones de los mismos. Por lo tanto, la presente invención se refiere al uso de la molécula de unión a TTR, por ejemplo, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, el polinucleótido, el vector o la célula de la presente invención para la preparación de una composición farmacéutica o de diagnóstico para el tratamiento profiláctico y terapéutico de una enfermedad o trastorno asociado con la amiloidosis por TTR, el seguimiento de la progresión de una enfermedad o trastorno asociado con la amiloidosis por TTR o una respuesta a un tratamiento de amiloidosis por TTR en un sujeto o para determinar el riesgo de un sujeto de desarrollar una enfermedad o trastorno asociado con amiloidosis por TTR.

La presente solicitud describe un método para tratar una enfermedad o trastorno caracterizado por acumulación y/o depósito anormal de TTR y/o TTR mal plegada, mal ensamblada, agregada, mutada en sistemas y órganos afectados tales como sistema nervioso periférico, sistema nervioso autónomo, sistema nervioso central, sistema gastrointestinal, sistema vascular especialmente leptomeninges, sistema linfático especialmente los ganglios linfáticos, sistema musculoesquelético especialmente tendones y ligamentos, el corazón, ojos, riñones, pulmones, piel, lengua, glándula tiroidea y vejiga cuyo método comprende la administración a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de las moléculas, anticuerpos, polinucleótidos, vectores, células o péptidos de unión a TTR descritos anteriormente de la presente invención.

Una ventaja particular del enfoque terapéutico de la presente invención radica en el hecho de que los anticuerpos recombinantes de la presente invención se derivan de células B o células B de memoria de sujetos humanos sanos sin signos o síntomas de una enfermedad, por ejemplo que portan una mutación asintomática y/o mutaciones, que muestran la aparición o están relacionadas con TTR agregada y, por lo tanto, son, con cierta probabilidad, capaces de prevenir una enfermedad clínicamente manifiesta relacionada con TTR mal plegada, mal ensamblada, mutada y/o agregada, o de disminuir el riesgo de aparición de la enfermedad o trastorno clínicamente manifiesto, o de retrasar la aparición o progresión de la enfermedad o trastorno clínicamente manifiesto. Típicamente, los anticuerpos de la presente invención también han pasado con éxito por la maduración somática, es decir, la optimización con respecto a la selectividad y la eficacia en la unión de alta afinidad a la molécula de TTR objetivo mediante la variación somática de las regiones variables del anticuerpo.

El conocimiento de que tales células *in vivo*, por ejemplo en un ser humano, no se han activado por medio de proteínas fisiológicas o estructuras celulares relacionadas o de otro tipo en el sentido de una reacción autoinmune o alérgica también es de gran importancia médica, ya que esto significa una probabilidad considerablemente mayor de vivir con éxito las fases de prueba clínica. Por así decirlo, la eficacia, aceptabilidad y tolerabilidad ya se han demostrado antes del desarrollo preclínico y clínico del anticuerpo profiláctico o terapéutico en al menos un sujeto humano. Por lo tanto, se puede esperar que los anticuerpos anti-TTR humanos de la presente invención, tanto su eficacia específica de la estructura objetivo como agente terapéutico como su menor probabilidad de efectos secundarios, aumenten significativamente su probabilidad clínica de éxito.

La presente invención también proporciona un paquete o kit farmacéutico y de diagnóstico, respectivamente, que comprende uno o más recipientes llenos con uno o más de los ingredientes descritos anteriormente, por ejemplo, anticuerpo anti-TTR, fragmento de unión, derivado o variante del mismo, polinucleótido, vector, célula y/o péptido de la presente invención. Asociado con dicho contenedor o contenedores puede haber un aviso en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o biológicos, cuyo aviso refleja la aprobación de la agencia de fabricación, uso o venta para administración humana. Además, o alternativamente, el kit comprende reactivos y/o instrucciones para su uso en ensayos de diagnóstico apropiados. La composición, por ejemplo, el kit de la presente invención es, por supuesto, particularmente adecuado para la evaluación de riesgos, el diagnóstico, la prevención y el tratamiento de una enfermedad o trastorno que se acompaña de la presencia de TTR mutada, mal plegada, mal ensamblada y/o agregada, y en particular aplicable para el tratamiento de trastornos generalmente caracterizados por amiloidosis por TTR que comprenden enfermedades y/o trastornos como polineuropatía amiloide familiar (FAP), miocardiopatía amiloide familiar (FAC), amiloidosis sistémica senil (SSA), amiloidosis familiar sistémica, amiloidosis leptomeningea/del sistema nervioso central (CNS) incluida la enfermedad de Alzheimer, amiloidosis ocular relacionada con TTR, amiloidosis renal relacionada con TTR, hipertiroidismo relacionada con TTR, amiloidosis de ligamentos relacionada con TTR, incluido el síndrome del túnel carpiano, desgarros del manguito rotador y estenosis espinal lumbar y preeclampsia.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden formular de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica; véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (2000) de la Universidad de Ciencias de Filadelfia, ISBN 0-683-306472. Los ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones de aceite/agua, varios tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, etc. Las composiciones que comprenden dichos vehículos pueden formularse por métodos convencionales bien conocidos. Estas composiciones farmacéuticas se pueden administrar al sujeto en una dosis adecuada. La administración de las composiciones adecuadas puede realizarse de diferentes formas, por ejemplo, mediante administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, intranasal, tópica o intradérmica o administración espinal o cerebral. Las formulaciones en aerosol, tales como las formulaciones en aerosol nasal, incluyen soluciones acuosas purificadas u otras soluciones del agente activo con agentes conservantes y agentes isotónicos. Preferiblemente, tales formulaciones se ajustan a

un pH y un estado isotónico compatibles con las membranas mucosas nasales. Las formulaciones para administración rectal o vaginal se pueden presentar como un supositorio con un vehículo adecuado.

El régimen de dosificación lo determinará el médico tratante y los factores clínicos. Como es bien conocido en la técnica médica, las dosis para cualquier paciente dependen de muchos factores, incluido el tamaño del paciente, el área de superficie corporal, la edad, el compuesto particular que se administrará, el sexo, la hora y la vía de administración, la salud general y otros medicamentos administrados al mismo tiempo. Una dosis típica puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 0.001 a 1000 µg (o de ácido nucleico para la expresión o para la inhibición de la expresión en este intervalo); sin embargo, se prevén dosis por debajo o por encima de este ejemplo de intervalo, especialmente teniendo en cuenta los factores antes mencionados. Generalmente, la dosificación puede variar, por ejemplo, de aproximadamente 0.0001 a 100 mg/kg, y más habitualmente de 0.01 a 5 mg/kg (por ejemplo, 0.02 mg/kg, 0.25 mg/kg, 0.5 mg/kg, 0.75 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, etc.), del peso corporal del huésped. Por ejemplo, las dosis pueden ser de 1 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal o dentro del intervalo de 1 a 10 mg/kg, preferiblemente al menos 1 mg/kg. También se pretende que las dosis intermedias en los intervalos anteriores estén dentro del alcance de la invención. A los sujetos se les pueden administrar tales dosis diariamente, en días alternativos, semanalmente o de acuerdo con cualquier otro programa determinado por análisis empírico. Un ejemplo de tratamiento implica la administración en múltiples dosis durante un período prolongado, por ejemplo, de al menos seis meses. Los ejemplos regímenes de tratamiento adicionales implican la administración una vez cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada 3 a 6 meses. Los ejemplos de esquemas de dosificación incluyen 1-10 mg/kg o 15 mg/kg en días consecutivos, 30 mg/kg en días alternos o 60 mg/kg semanalmente. En algunos métodos, se administran simultáneamente dos o más anticuerpos monoclonales con diferentes especificidades de unión, en cuyo caso la dosis de cada anticuerpo administrado cae dentro de los intervalos indicados. El progreso se puede controlar mediante evaluaciones periódicas. Las preparaciones para administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas estériles. Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales como el aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables tales como el oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, soluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, incluida solución salina y medios tamponados. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, solución de Ringer con lactato o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen reponedores de fluidos y nutrientes, reponedores de electrolitos (como los basados en la dextrosa de Ringer) y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes y similares. Además, la composición farmacéutica de la invención puede comprender agentes adicionales tales como dopamina o fármacos psicofarmacológicos, dependiendo del uso pretendido de la composición farmacéutica.

Además, en una realización preferida de la presente invención, la composición farmacéutica puede formularse como una vacuna, por ejemplo, si la composición farmacéutica de la invención comprende un anticuerpo de TTR o un fragmento de unión, derivado o variante del mismo para inmunización pasiva. Como se menciona en la sección de antecedentes, las especies de TTR mal plegadas, mal ensambladas, mutadas y/o agregadas y/o fragmentos o derivados de las mismas son un desencadenante principal de la amiloidosis por TTR. En consecuencia, es prudente esperar que la inmunización pasiva con anticuerpos anti-TTR humanos y moléculas de unión a TTR equivalentes de la presente invención ayude a evitar varios efectos adversos de los conceptos de terapia de inmunización activa y conduzca a una agregación reducida de TTR. Por lo tanto, los presentes anticuerpos anti-TTR y sus equivalentes de la presente invención serán particularmente útiles como vacuna para la prevención o mejora de enfermedades o trastornos que muestren la presencia de, o sean causados por, TTR agregada, tal como polineuropatía amiloide familiar (FAP), miocardiopatía amiloide familiar (FAC), amiloidosis sistémica senil (SSA), amiloidosis familiar sistémica, amiloidosis leptomeníngea/del sistema nervioso central (CNS), incluida la enfermedad de Alzheimer, amiloidosis ocular relacionada con TTR, amiloidosis renal relacionada con TTR, hipertiroidismo relacionada con TTR, amiloidosis de ligamentos relacionada con TTR que incluye síndrome del túnel carpiano, desgarros del manguito rotador y estenosis espinal lumbar y preeclampsia, por ejemplo.

En una realización, puede ser beneficioso utilizar Fab recombinante (rFab) y fragmentos de cadena sencilla (scFv) del anticuerpo de la presente invención, que podrían penetrar más fácilmente una membrana celular. Por ejemplo, Robert et al., Protein Eng. Des. Sel. (2008); S1741-0134, publicado en línea más adelante, describe el uso de Fab recombinante quimérico (rFab) y fragmentos de cadena sencilla (scFv) del anticuerpo monoclonal WO-2 que reconoce un epítipo en la región del extremo terminal N de Abeta. Los fragmentos modificados fueron capaces de (i) prevenir la fibrilación amiloide, (ii) disgregar fibrillas de Abeta1-42 preformadas y (iii) inhibir la neurotoxicidad mediada por oligómeros Abeta1-42 *in vitro* tan eficazmente como la molécula de IgG completa. Las ventajas percibidas de utilizar pequeños formatos de anticuerpos modificados con Fab y scFv que carecen de la función efectora incluyen un paso más eficiente a través de la barrera hematoencefálica y minimizar el riesgo de desencadenar reacciones secundarias inflamatorias. Además, a pesar de que scFv y los anticuerpos de dominio único retienen la especificidad de unión de los anticuerpos de longitud completa, pueden expresarse como genes únicos e intracelularmente en células de mamíferos como intracuerpos, con el potencial de alteración del plegamiento, interacciones, modificaciones o localización subcelular de sus objetivos; véase para revisión, por ejemplo, Miller y Messer, Molecular Therapy 12 (2005), 394-401.

En un enfoque diferente, Muller et al., Expert Opin. Biol. Ther. (2005), 237-241, describen una plataforma tecnológica,

denominada 'Tecnología de Super Anticuerpo', que se dice que permite que los anticuerpos se transporten a las células vivas sin dañarlas. Estos anticuerpos que penetran en las células abren nuevas ventanas diagnósticas y terapéuticas. El término 'TransMab' se ha acuñado para estos anticuerpos.

En una realización adicional, puede ser deseable la administración conjunta o la administración secuencial de otros anticuerpos útiles para tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la aparición de TTR mutada, mal plegada, mal ensamblada y/o agregada. En una realización, el anticuerpo adicional está incluido en la composición farmacéutica de la presente invención. Los ejemplos de anticuerpos que pueden usarse para tratar a un sujeto incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos dirigidos a CD33, SGLT2, IL-6 e IL-1.

En una realización adicional, puede ser deseable la administración conjunta o la administración secuencial de otros agentes útiles para tratar una enfermedad o trastorno relacionado con TTR mal plegada, mal ensamblada, mutada y/o agregada. En una realización, el agente adicional está incluido en la composición farmacéutica de la presente invención. Ejemplos de agentes que pueden usarse para tratar a un sujeto incluyen, pero no se limitan a: agentes que estabilizan el tetrámero de TTR, tales como Tafamidis Meglumin, diflusinal, doxiciclina con ácido ursodesoxicólico; agentes antiinflamatorios tales como diflusinal, corticosteroides, ácido 2-(2,6-dicloranilino)fenilacético (diclofenaco), ácido iso-butil-propanoico-fenólico (ibuprofeno); diuréticos, galato de epigallocatequina, clorhidrato de melfalán, dexametasona, bortezomib, bortezomib-melfalán, bortezomib-dexametasona, melfalán-dexametasona, bortezomib-melfalán-dexametasona; antidepresivos, fármacos antipsicóticos, neurolépticos, antidementiva (por ejemplo, la memantina antagonista del receptor de NMDA), inhibidores de la acetilcolinesterasa (por ejemplo, donepezilo, HCl, rivastigmina, galantamina), antagonistas del glutamato y otros medicamentos nootrópicos para la presión arterial (por ejemplo, dihidralazina, metildopa), citostáticos, glucocorticoides, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE); agentes antiinflamatorios o cualquier combinación de los mismos. Los ejemplos de agentes que pueden usarse para tratar o prevenir el rechazo de órganos después de un trasplante clínico de órganos incluyen, pero no se limitan a, los agentes del grupo que conducen a un debilitamiento del sistema inmunológico, es decir, que comprenden inmunosupresores tales como inhibidores de calcineurina tales como ciclosporina y Tacrolimus, inhibidores de la proliferación como los inhibidores de mTOR que comprenden Everolimus y Sirolimus (rapamicina), así como antimetabolitos tales como Azatioprina, Micofenolato de Mofetilo/MMF y ácido micofenólico, y corticosteroides tales como cortisona y cortisol, así como sustancias sintéticas tales como Prednisona o Prednisolona. Además, se pueden usar anticuerpos tales como anticuerpos monoclonales anti-receptor de IL2 (por ejemplo, Basiliximab, Daclizumab) así como anticuerpos monoclonales anti-CD3 (por ejemplo, Muromonab-CD3) y composiciones policlonales tales como globulina anti-timocitos (ATG); y agonistas del receptor del péptido 1 similar al glucagón (GLP-1) (véase, por ejemplo, Noguchi et al., Acta Med. Okayama, 60 (2006), y la solicitud internacional WO 2012/088157). Además, agentes adicionales podrían comprender agentes para la profilaxis y/o tratamiento de infecciones y otros efectos secundarios después de un trasplante de órganos que comprenden valganciclovir, inmunoglobulina de citomegalia, ganciclovir, anfotericina B, pirimetamina, ranitidina, ramipril, furosemida, benzbromaron. Por lo tanto, en una realización se proporciona una composición que comprende además un agente adicional útil para tratar la amiloidosis por TTR y/o para tratar o prevenir el rechazo de órganos después, por ejemplo, trasplante clínico de hígado. En la técnica se describen ejemplos de otros agentes que pueden usarse concomitantemente con una composición farmacéutica de la presente invención; véase, por ejemplo las solicitudes internacionales WO 2009005672, WO 2010128092, WO 2012088157 o la solicitud europea EP 11 158 212.8.

Una dosis o cantidad terapéuticamente eficaz se refiere a la cantidad del ingrediente activo suficiente para mejorar los síntomas o la afección. La eficacia terapéutica y la toxicidad de tales compuestos se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, ED₅₀ (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población) y LD₅₀ (la dosis letal para el 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos terapéuticos y tóxicos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación LD₅₀/ED₅₀.

De lo anterior, es evidente que la presente invención abarca cualquier uso de una molécula de unión a TTR y/o fragmentos de la misma que comprenden las CDR del anticuerpo descrito anteriormente, en particular para el diagnóstico y/o tratamiento de una enfermedad o trastorno relacionados con especies de TTR mutadas, mal plegadas, mal ensambladas o agregadas y/o fragmentos de las mismas como se mencionó anteriormente, tales como amiloidosis por TTR. Preferiblemente, dicha molécula de unión es un anticuerpo de la presente invención o una cadena de inmunoglobulina del mismo. Por lo tanto, la presente invención proporciona un anticuerpo como se define en el presente documento más arriba y más adelante, el polinucleótido, el vector o la célula como se define en el presente documento o una composición farmacéutica o de diagnóstico que comprende cualquiera de los mismos para uso en tratamiento profiláctico, tratamiento terapéutico y/o monitorización de la progresión o una respuesta al tratamiento de una enfermedad o trastorno relacionado con TTR, preferiblemente en el que el trastorno se selecciona del grupo que comprende polineuropatía amiloide familiar (FAP), miocardiopatía amiloide familiar (FAC), amiloidosis sistémica senil (SSA), amiloidosis familiar sistémica, amiloidosis leptomeníngea/del sistema nervioso central (CNS) que incluye enfermedad de Alzheimer, amiloidosis ocular relacionada con TTR, amiloidosis renal relacionada con TTR, hipertiroidismo relacionada con TTR, amiloidosis de ligamentos relacionada con TTR, incluido el síndrome del túnel carpiano, desgarros del manguito rotador y estenosis espinal lumbar y preeclampsia. El grupo anterior de enfermedades o trastornos se denominará grupo de trastornos asociados con amiloidosis por TTR.

En otra realización, la presente invención se refiere a una composición de diagnóstico que comprende cualquiera de

las moléculas de unión a TTR descritas anteriormente, anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno, polinucleótidos, vectores, células y/o péptidos de la invención y medios opcionalmente adecuados para detección tales como reactivos usados convencionalmente en métodos de diagnóstico de base inmunológica o ácido nucleico. Los anticuerpos de la invención son, por ejemplo, adecuados para su uso en inmunoensayos en los que se pueden utilizar en fase líquida o unidos a un vehículo en fase sólida. Ejemplos de inmunoensayos que pueden utilizar el anticuerpo de la invención son inmunoensayos competitivos y no competitivos en formato directo o indirecto. Ejemplos de tales inmunoensayos son el radioinmunoensayo (RIA), el ensayo tipo sándwich (inmunométrico), citometría de flujo y el ensayo de transferencia Western. Los antígenos y anticuerpos de la invención pueden unirse a muchos vehículos diferentes y usarse para aislar células unidas específicamente a ellos. Los ejemplos de vehículos bien conocidos incluyen vidrio, poliestireno, cloruro de polivinilo, polipropileno, polietileno, policarbonato, dextrano, nailon, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poliácridamidas, agarosas y magnetita. La naturaleza del vehículo puede ser soluble o insoluble para los propósitos de la invención. Hay muchas etiquetas y métodos de etiquetado diferentes conocidos por los expertos en la técnica. Los ejemplos de los tipos de etiquetas que pueden usarse en la presente invención incluyen enzimas, radioisótopos, metales coloidales, compuestos fluorescentes, compuestos quimioluminiscentes y compuestos bioluminiscentes; véanse también las realizaciones discutidas anteriormente.

Mediante una realización adicional, las moléculas de unión a TTR, en particular los anticuerpos de la presente invención, también pueden usarse en un método para el diagnóstico de una enfermedad o trastorno en un individuo obteniendo una muestra de fluido corporal del individuo analizado que puede ser una muestra de sangre, una muestra de plasma, una muestra de suero, una muestra de linfa o cualquier otra muestra de fluido corporal, tal como una muestra de saliva o de orina y poner en contacto la muestra de fluido corporal con un anticuerpo de la presente invención en condiciones que permitan la formación de complejos anticuerpo-antígeno. El nivel de tales complejos se determina luego mediante métodos conocidos en la técnica, un nivel significativamente más alto que el formado en una muestra de control que indica la enfermedad o trastorno en el individuo probado. De la misma manera, también se puede usar el antígeno específico unido por los anticuerpos de la invención. Por lo tanto, la presente invención se refiere a un inmunoensayo *in vitro* que comprende la molécula de unión, por ejemplo, el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno de la invención.

En una realización adicional de la presente invención, las moléculas de unión a TTR, en particular los anticuerpos de la presente invención, también pueden usarse en un método para el diagnóstico de una enfermedad o trastorno en un individuo obteniendo una biopsia del individuo examinado que puede ser de piel, glándula salival, raíces de cabello, corazón, colon, nervios, biopsias de grasa subcutánea o una biopsia de cualquier órgano afectado.

En este contexto, la presente invención también se refiere a medios diseñados específicamente para este propósito. Por ejemplo, puede usarse una matriz basada en anticuerpos, que está cargada, por ejemplo, con anticuerpos o moléculas de unión a antígeno equivalentes de la presente invención que reconocen específicamente a TTR. El diseño de inmunoensayos de microarreglos se resume en Kusnezow et al., Mol. Cell Proteomics 5 (2006), 1681-1696. Por consiguiente, la presente invención también se refiere a micromatrices cargadas con moléculas de unión a TTR identificadas de acuerdo con la presente invención.

En una realización, la presente invención se refiere a un método para diagnosticar una enfermedad o trastorno relacionado con especies de TTR mutadas, mal plegadas, mal ensambladas y/o agregadas y/o fragmentos de las mismas en un sujeto, comprendiendo el método determinar la presencia de TTR y/o TTR mal plegada, mal ensamblada o agregada en una muestra del sujeto que se va a diagnosticar con al menos un anticuerpo de la presente invención o un fragmento de unión a TTR del mismo, en el que la presencia de TTR patológicamente mutada, mal plegada, mal ensamblada o agregada es indicativa de amiloidosis por TTR y un aumento del nivel de la TTR patológicamente mal plegada, mal ensamblada o agregada en comparación con el nivel de la TTR fisiológica es indicativa de la progresión de la amiloidosis por TTR en dicho sujeto.

El sujeto a diagnosticar puede ser asintomático o preclínico para la enfermedad. Preferiblemente, el sujeto de control tiene una enfermedad asociada con TTR mal plegada, mal ensamblada o agregada, por ejemplo, polineuropatía amiloide familiar (FAP), miocardiopatía amiloide familiar (FAC) o amiloidosis sistémica senil (SSA), en la que una similitud entre el nivel de TTR patológicamente mal plegada, mal ensamblada o agregada y el estándar de referencia indica que el sujeto que se va a diagnosticar tiene una amiloidosis por TTR o está en riesgo de desarrollar amiloidosis por TTR. Alternativamente, o además como un segundo control, el sujeto de control no tiene una amiloidosis por TTR, en la que una diferencia entre el nivel de TTR fisiológica y/o de TTR mal plegada, mal ensamblada o agregada y el estándar de referencia indica que el sujeto a ser diagnosticado tiene una amiloidosis por TTR o tiene riesgo de desarrollar una amiloidosis por TTR. Preferiblemente, el sujeto a diagnosticar y el sujeto o sujetos de control tienen la misma edad. La muestra a analizar puede ser cualquier fluido corporal que se sospeche que contiene TTR patológicamente mal plegada, mal ensamblada o agregada, por ejemplo sangre, plasma sanguíneo, suero sanguíneo, orina, fluido peritoneal, saliva o fluido cefalorraquídeo (CSF).

El nivel de TTR fisiológica y/o de TTR patológicamente mal plegada, mal ensamblada o agregada puede evaluarse mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica que comprenda, por ejemplo, analizar TTR mediante una o más técnicas elegidas de transferencia Western, inmunoprecipitación, ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), electroforesis en gel

bidimensional, espectroscopia de masas (MS), desorción/ionización láser asistida por una matriz-tiempo de vuelo-MS (MALDI-TOF), desorción/ionización láser mejorada en la superficie-tiempo de vuelo (SELDI-TOF), cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC), cromatografía líquida multidimensional (LC) seguida de espectrometría de masas en tándem (MS/MS), y densitometría láser. Preferiblemente, dicha formación de imágenes *in vivo* de TTR comprende gammagrafía, tomografía por emisión de positrones (PET), tomografía por emisión de fotón único (SPECT), formación de imágenes ópticas en el infrarrojo cercano (NIR) o formación de imágenes por resonancia magnética (MRI).

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere al diagnóstico de amiloidosis por TTR, controlando el tratamiento de esta enfermedad y determinando la utilidad diagnóstica o terapéutica de un fármaco anti-TTR en un tejido libre de biopsia, es decir, un método no invasivo.

Normalmente, la concentración de agregados de TTR y/o TTR mal plegada que pueden detectarse en un fluido corporal, por ejemplo, plasma sanguíneo, es muy baja y, por lo tanto, el diagnóstico de amiloidosis por TTR es oneroso y requiere mucho tiempo. En particular, el diagnóstico de las enfermedades por amiloidosis por TTR es un proceso difícil y prolongado, ya que diversas enfermedades presentan signos y síntomas muy similares, de modo que el diagnóstico formal de polineuropatía amiloide familiar (FAP), miocardiopatía amiloide familiar (FAC) y amiloidosis sistémica senil (SSA) normalmente requiere la recogida de biopsias de tejido y la identificación de depósitos de amiloide de TTR mediante complejas técnicas de tinción histológica. Como las biopsias de tejido son muy pequeñas y los depósitos de amiloide de TTR están dispersos, la determinación histológica de la amiloidosis por TTR se asocia típicamente con una alta frecuencia de resultados falsos negativos y retrasos para los pacientes.

Sin embargo, de acuerdo con la presente invención se pudo demostrar sorprendentemente que después de una sola administración de un anticuerpo anti-TTR objetivo, fue posible una medición de TTR agregadas y/o mal plegadas unidas a anticuerpos anti-TTR en sangre; véase el Ejemplo 13 y la Figura 14. Por lo tanto, gracias a la propiedad probablemente única del anticuerpo anti-TTR de la presente invención para eliminar TTR de los depósitos de TTR amiloidogénico y el transporte sangre, se ha desarrollado un método novedoso para diagnosticar trastornos asociados con TTR mal plegada, mutada y/o agregada en un paciente o sujeto, cuyo método tiene el potencial de reemplazar la biopsia de tejido y el análisis histológico en el proceso de diagnóstico de las enfermedades amiloides por TTR. El método se basa en el uso de un anticuerpo específico para la conformación patológica de la proteína TTR, que se inyecta al paciente y se usa para sondear la presencia de proteína TTR mal plegada y/o agregada en cualquier parte del cuerpo del paciente. Después de un breve retraso, por ejemplo 2 días, después de la inyección del anticuerpo en un paciente, se extrae una muestra de sangre y se usa para detectar si el anticuerpo ha capturado y desprendido partículas de TTR mal plegadas y/o agregadas de los depósitos de TTR. La principal ventaja de este método en comparación con la histología tiene que ver con la inyección del anticuerpo anti-TTR directamente en los pacientes, en los que la circulación sanguínea permite su circulación a través de todos los tejidos y órganos, y la detección de depósitos de proteína TTR mal plegada y/o agregada independientemente de su localización.

Por lo tanto, en un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método para diagnosticar una enfermedad asociada con amiloidosis por TTR que comprende analizar el nivel de TTR mal plegada y/o agregada en una muestra de un sujeto después de la administración de un anticuerpo anti-TTR al sujeto, en el que la presencia o el nivel elevado de TTR mal plegada y/o agregada en la muestra del sujeto en comparación con el control, tal como una muestra obtenida del sujeto antes de la administración del anticuerpo anti-TTR, indica una enfermedad asociada con amiloidosis por TTR. Además, como se muestra en el Ejemplo 13, el método novedoso también es útil para caracterizar fármacos anti-TTR y el curso del tratamiento de la amiloidosis por TTR, respectivamente, el método novedoso de la presente invención también está destinado a controlar el tratamiento de la enfermedad con un anticuerpo anti-TTR o determinar la utilidad diagnóstica o terapéutica de un anticuerpo anti-TTR. En este contexto, la persona experta en la técnica reconocerá que el método de la presente invención no se limita a la investigación de la utilidad y eficacia terapéutica de los anticuerpos anti-TTR, sino que también es aplicable a otros tipos de fármacos anti-TTR que son capaces de degradación de los depósitos de amiloide de TTR. Por ejemplo, un anticuerpo anti-TTR de la presente invención puede administrarse junto con otro fármaco anti-TTR y el nivel de TTR mal plegada y/o agregada en la muestra del sujeto que ha sido tratado se compara con un control obtenido del sujeto antes de la administración tanto del anticuerpo anti-TTR como del fármaco anti-TTR pero solo después del tratamiento con anticuerpo anti-TTR.

En una realización preferida de la presente invención, en particular cuando se usan animales no humanos para probar anticuerpos recombinantes de origen humano como se ilustra en el Ejemplo 13 y otros anticuerpos anti-TTR previstos para uso en humanos en general, el nivel de TTR mal plegada y/o agregada en la muestra se analiza determinando un complejo formado entre el anticuerpo anti-TTR y la TTR mal plegada y/o agregada, por ejemplo mediante inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-IgG humano o antiidiotípico. Alternativamente, se puede usar un segundo anticuerpo anti-TTR que reconozca TTR en un epítipo sustancialmente diferente del epítipo del anticuerpo anti-TTR candidato a fármaco para unirse al complejo formado por el anticuerpo anti-TTR candidato a fármaco y TTR y así detectar su presencia, por ejemplo, mediante ELISA o inmunoprecipitación.

Con respecto al aspecto de diagnóstico en particular para un sujeto y paciente humano, la presencia y el nivel elevado de TTR mal plegada y/o agregada y complejo de la misma con el anticuerpo anti-TTR, respectivamente, indica la presencia de depósitos amiloides de TTR en el cuerpo humano, por ejemplo en el corazón, el sistema nervioso

periférico (PNS), los ojos, los músculos, el tracto gastrointestinal, los riñones, el sistema vascular y el sistema nervioso central (CNS) de un paciente o sujeto. Por lo tanto, el método de la presente invención permite la identificación y determinación de una enfermedad asociada con la amiloidosis por TTR en el cuerpo del sujeto por un lado y la eliminación de los depósitos de TTR del cuerpo del paciente por el otro, indicando así también el progreso terapéutico de un tratamiento dado y la eficacia de un fármaco específico para amiloidosis por TTR, tal como un anticuerpo anti-TTR.

Por lo tanto, como se demostró en el Ejemplo 13, el anticuerpo anti-TTR de la presente invención es capaz de unirse a TTR mal plegada y/o agregada con suficiente afinidad para alterar la estabilidad de los depósitos de TTR patológicos tales como capturar y eliminar la TTR mal plegada y/o agregada de los depósitos en un fluido corporal, en particular sangre.

El anticuerpo anti-TTR que se va a usar de acuerdo con el método de la presente invención puede ser cualquier anticuerpo TTR que sea específico para la conformación patológica de TTR, es decir, TTR mal plegada, mutada y/o agregado. Sin embargo, en una realización preferida, el anticuerpo anti-TTR utilizado en el método sin tejido es un anticuerpo anti-TTR o una molécula de unión a TTR de la presente invención descrita en el presente documento e ilustrada en los Ejemplos.

En este contexto, el anticuerpo anti-TTR puede modificarse y, por ejemplo, unirse a un marcador detectable como se describe para cualquiera de las otras realizaciones anteriormente en este documento. Además, los inmunoensayos tales como transferencia Western, inmunotransferencia de mancha, ELISA (sándwich) y similares conocidos en la técnica y descritos para otros métodos de diagnóstico y usos basados en el anticuerpo anti-TTR y el péptido de la presente invención pueden adaptarse al nuevo ensayo de amiloide de TTR de la presente invención.

Como se muestra en el Ejemplo 13 y la Figura 14 usando el ensayo de amiloide de TTR, podría demostrarse que los anticuerpos anti-TTR de la presente invención son capaces de capturar y separar TTR mal plegada y/o agregada de los depósitos de amiloide de TTR y el correspondiente inmunocomplejo puede medirse en una muestra de fluido corporal, en particular sangre del paciente o sujeto; véase el Ejemplo 13 y la Figura 14. Por consiguiente, en una realización de la presente invención, el anticuerpo anti-TTR puede unirse a TTR mal plegada y/o agregada con suficiente afinidad para alterar la salida neta de la TTR mal plegada y/o agregada de por ejemplo, el corazón, el sistema nervioso periférico (PNS), ojos, músculos, tracto gastrointestinal, riñones, sistema vascular y sistema nervioso central (CNS).

La muestra de fluido corporal, preferiblemente sangre o CSF del sujeto, en la que está presente TTR capturada y desprendida mal plegada y/o agregada unida al anticuerpo anti-TTR, se obtiene en un intervalo de tiempo especificado después de la administración. Este intervalo de tiempo especificado después de la administración suele ser inferior a una semana. En una realización preferida, este intervalo de tiempo después de la administración del anticuerpo anti-TTR es menor o igual a 48 horas.

Como se mencionó anteriormente, el método sin tejido descrito anteriormente también se puede utilizar para determinar el éxito del tratamiento, es decir, mediante la medición de capturas de especies de TTR mal plegadas y/o agregadas por anticuerpos anti-TTR antes y después del tratamiento. Por lo tanto, en una realización más o adicional, el método sin tejido de la presente invención puede comprender además la comparación entre el nivel de TTR mal plegada y/o agregada en la muestra de un fluido corporal con una muestra obtenida del sujeto antes de la administración de un anticuerpo anti-TTR. Por consiguiente, en una realización, el método de la presente invención se usa para determinar la eficacia de un tratamiento de amiloidosis por TTR o para controlar la progresión de una enfermedad o afección asociada con la TTR patológica en un paciente o sujeto.

Como se mencionó, las muestras de sujetos utilizadas en los métodos descritos anteriormente se pueden obtener antes o después de la administración de un anticuerpo anti-TTR. Sin embargo, también se pueden obtener muestras de instalaciones médicas o médicos en ejercicio, así como de otras instituciones de las que se pueden obtener muestras clínicas de un sujeto. Las instalaciones, médicos, etc., no solo pueden realizar la administración de un anticuerpo anti-TTR al sujeto y la recolección de muestras apropiadas para su uso en el método anterior, sino también controlar y/o el tratamiento del paciente, es decir, variando la cantidad, el tiempo, la frecuencia de administración del anticuerpo, interrumpir una terapia, reemplazar o combinar el anticuerpo anti-TTR por al menos otro anticuerpo anti-TTR o agente terapéutico. El nivel de TTR puede evaluarse mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica. Los métodos adecuados se describen a continuación y en la solicitud internacional WO 2013/066818.

En un aspecto de la presente invención, se proporciona para su uso un anticuerpo de la presente invención o un fragmento de unión a TTR del mismo, el polinucleótido, el vector o la célula como se definió anteriormente o una composición farmacéutica o de diagnóstico que comprende cualquiera de los mismos en un tratamiento profiláctico, tratamiento terapéutico y/o seguimiento de la progresión o respuesta al tratamiento de una enfermedad o trastorno relacionado con TTR. Por lo tanto, en general, la presente invención también se refiere a un método para diagnosticar o controlar la progresión de una enfermedad o trastorno relacionado con TTR (tal como amiloidosis por TTR) en un sujeto, comprendiendo el método determinar la presencia de TTR en una muestra del sujeto a ser diagnosticado con al menos un anticuerpo de la presente invención o una molécula de unión a TTR que tiene sustancialmente las mismas

especificidades de unión que cualquiera de los mismos, en el que la presencia de especies de TTR mutadas, mal plegadas, mal ensambladas o agregadas o fragmentos de las mismas es indicativa de la enfermedad o trastorno. En una realización, se proporciona dicho método de diagnóstico o seguimiento de la progresión de la amiloidosis por TTR en un sujeto, comprendiendo el método determinar la presencia de TTR mutada, mal plegada, mal ensamblada o agregada y/o fragmentos de la misma en una muestra del sujeto que se va a diagnosticar con al menos un anticuerpo de la presente invención o una molécula de unión a TTR que tiene sustancialmente las mismas especificidades de unión que cualquiera de las mismas, en el que la presencia de TTR mutada, mal plegada, mal ensamblada o agregada y/o fragmento de la misma es indicativa de amiloidosis por TTR presintomática, prodrómica o clínica, un aumento del nivel de oligómeros, agregados o fibrillas de TTR en comparación con el nivel de TTR fisiológica o en comparación con una muestra de referencia derivada de un sujeto de control sano o una muestra de control del mismo sujeto es indicativo de progresión de la amiloidosis por TTR presintomática, prodrómica o establecida. Cualquier persona experta en la técnica apreciará que, en una realización, dicho método se usa también para el diagnóstico o seguimiento de la progresión de cualquier otra enfermedad o trastorno del grupo de trastornos relacionados con la TTR como se definió anteriormente.

Como se indicó anteriormente, los anticuerpos de la presente invención, fragmentos de los mismos y moléculas de la misma especificidad de unión que los anticuerpos y fragmentos de los mismos pueden usarse no solo *in vitro* sino también *in vivo*, en los que además del diagnóstico, también pueden perseguirse aplicaciones terapéuticas. Por lo tanto, en una realización, la presente invención también se refiere a una molécula de unión a TTR que comprende al menos una CDR de un anticuerpo de la presente invención para la preparación de una composición para la detección/formación de imágenes *in vivo* o el direccionamiento de un agente terapéutico y/o diagnóstico a TTR en el cuerpo humano o animal. Los agentes terapéuticos y/o de diagnóstico potenciales pueden elegirse de las enumeraciones no exhaustivas de los agentes terapéuticos útiles en el tratamiento de la amiloidosis por TTR y los marcadores potenciales como se indicó anteriormente. Con respecto a la formación de imágenes *in vivo*, en una realización preferida, la presente invención proporciona dicha molécula de unión a TTR que comprende al menos una CDR de un anticuerpo de la presente invención, en la que dicha formación de imágenes *in vivo* comprende gammagrafía, tomografía por emisión de positrones (PET), tomografía de emisión de fotón único (SPECT), imágenes ópticas de infrarrojo cercano (NIR) o imágenes de resonancia magnética (MRI). En una realización adicional, la presente invención también proporciona dicha molécula de unión a TTR que comprende al menos una CDR de un anticuerpo de la presente invención, o dicha molécula para la preparación de una composición para los métodos de obtención de imágenes *in vivo* especificados anteriormente, para el uso en el método de diagnóstico o seguimiento de la progresión de una enfermedad o trastorno relacionado con TTR en un sujeto, como se define en el presente documento anteriormente.

VII. Péptidos con epítomos de TTR específicos de agregación

La presente solicitud también describe péptidos que tienen un epítipo de TTR específicamente reconocido por cualquier anticuerpo de la presente invención. Preferiblemente, dicho péptido comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos como se indica en la SEQ ID NO: 49, la SEQ ID NO: 50, o en la SEQ ID NO: 51 como el epítipo lineal único reconocido por el anticuerpo o una secuencia modificada del mismo en la que uno o más aminoácidos están sustituidos, eliminados y/o agregados, en la que el péptido es reconocido por cualquier anticuerpo de la presente invención, preferiblemente por el anticuerpo NI-301.59F1, NI-301.35G11, NI-301.37F1 o NI-301.12D3.

Dicho péptido se puede utilizar para diagnosticar o controlar una enfermedad o trastorno relacionado con especies de TTR mal plegadas, mal ensambladas o agregadas y/o fragmentos de las mismas en un sujeto, tal como amiloidosis por TTR que comprende una etapa de determinación de la presencia de un anticuerpo que se une a un péptido en una muestra biológica de dicho sujeto, y se usa para el diagnóstico de dicha enfermedad en dicho sujeto midiendo los niveles de anticuerpos que reconocen el péptido de la presente invención descrito anteriormente y comparando las mediciones con los niveles que se encuentran en sujetos sanos de edad y sexo comparables. En una realización, se describe un método para diagnosticar la amiloidosis por TTR indicativa de FAP y/o FAC presintomática o clínica en un sujeto, que comprende una etapa de determinación de la presencia de un anticuerpo que se une a un péptido como se definió anteriormente en una muestra biológica de dicho sujeto. De acuerdo con este método, un nivel elevado de anticuerpos medidos específicos para dicho péptido de la presente invención es indicativo para diagnosticar en dicho sujeto FAP y/o FAC presintomático o clínico o para diagnosticar en dicho sujeto cualquier otra enfermedad o trastorno del grupo de trastornos relacionados con TTR como se definió aquí anteriormente. Además, dado que el péptido contiene un epítipo de un anticuerpo terapéuticamente eficaz derivado de un ser humano, dicho péptido puede, por supuesto, usarse como un antígeno, es decir, un inmunógeno para provocar una respuesta inmune en un sujeto y estimular la producción de un anticuerpo de la presente invención *in vivo*. El péptido puede formularse en una matriz, un kit y una composición tal como una vacuna, respectivamente, como se describió anteriormente. En este contexto, la presente invención también se refiere a un kit útil en el diagnóstico o seguimiento de la progresión de la amiloidosis por TTR, comprendiendo dicho kit al menos un anticuerpo de la presente invención o un fragmento de unión a TTR del mismo, el polinucleótido, el vector y/o la célula como se define respectivamente aquí anteriormente, opcionalmente con reactivos y/o instrucciones de uso.

Estas y otras realizaciones se describen y engloban en la descripción y ejemplos de la presente invención. Puede obtenerse literatura adicional relativa a cualquiera de los materiales, métodos, usos y compuestos a emplear de

acuerdo con la presente invención de bibliotecas públicas y bases de datos, usando por ejemplo dispositivos electrónicos. Por ejemplo, se puede utilizar la base de datos pública "Medline", alojada por el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) y/o la Biblioteca Nacional de Medicina de los Institutos Nacionales de Salud (NLM.NIH). Otras bases de datos y direcciones web, como las del Instituto Europeo de Bioinformática (EBI), que forma parte del Laboratorio Europeo de Biología Molecular (EMBL), son conocidas por el experto en la técnica y también pueden obtenerse utilizando motores de búsqueda en Internet. En Berks, TIBTECH 12 (1994), 352-364 se ofrece una descripción general de la información sobre patentes en biotecnología y un estudio de las fuentes relevantes de información sobre patentes útiles para la búsqueda retrospectiva y para el conocimiento actual.

La descripción anterior describe en general la presente invención. A menos que se indique lo contrario, a un término como se usa en este documento se le da la definición proporcionada en el Diccionario Oxford de Bioquímica y Biología Molecular, Oxford University Press, 1997, revisado en 2000 y reimpresso en 2003, ISBN 0 19 850673 2. Se citan varios documentos a lo largo del texto de esta especificación; sin embargo, no se admite que cualquier documento citado sea de hecho técnica anterior en cuanto a la presente invención. Puede obtenerse una comprensión más completa haciendo referencia a los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en el presente documento únicamente con fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: Aislamiento e identificación de anticuerpos anti-TTR

Se identificaron anticuerpos de origen humano dirigidos a TTR y/o especies de TTR mutadas, mal plegadas, mal ensambladas y/o agregadas y/o fragmentos de las mismas utilizando el método descrito en la solicitud internacional WO 2008/081008, con modificaciones. En particular, la proteína TTR humana de tipo silvestre obtenida por purificación a partir de plasma humano y las proteínas TTR de tipo silvestre y mutantes obtenidas por expresión recombinante se usaron en conformaciones tanto nativas como mal plegadas-agregadas para la identificación de anticuerpos dirigidos a TTR. Las conformaciones mal plegadas-agregadas se produjeron *in vitro* en condiciones ácidas, usando un procedimiento similar al descrito en Colon W. et al., Biochemistry, 31 (1992), 8654-8660, con modificaciones menores.

Ejemplo 2: Determinación de la secuencia de anticuerpos

Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de los anticuerpos anti-TTR identificados anteriormente se determinaron sobre la base de sus secuencias de ARNm, véase la Figura 1. En resumen, se recolectaron células B vivas de cultivos de células B de memoria no inmortalizadas seleccionadas. Posteriormente, los ARNm de las células que producen anticuerpos anti-TTR seleccionados se extrajeron y convirtieron en ADNc, y las secuencias que codifican las regiones variables del anticuerpo se amplificaron mediante PCR, se clonaron en vectores plasmídicos y se secuenciaron. En resumen, se utilizó una combinación de cebadores que representan todas las familias de secuencias del repertorio de la línea germinal de inmunoglobulina humana para las amplificaciones de péptidos líderes, segmentos V y segmentos J. La primera ronda de amplificación se realizó usando cebadores específicos del péptido líder en el extremo 5' y cebadores específicos de la región constante en el extremo 3' (Smith et al., Nat Protoc. 4 (2009), 372-384). Para las cadenas pesadas y las cadenas ligeras kappa, la segunda ronda de amplificación se realizó utilizando cebadores específicos del segmento V en el extremo 5' y cebadores específicos del segmento J en el extremo 3'. Para las cadenas ligeras lambda, la segunda ronda de amplificación se realizó utilizando cebadores específicos del segmento V en el extremo 5' y un cebador específico de la región C en el extremo 3' (Marks et al., Mol. Biol. 222 (1991), 581-597; de Haard et al., J. Biol. Chem. 26 (1999), 18218-18230).

La identificación del clon de anticuerpo con la especificidad deseada se realizó mediante un nuevo cribado en ELISA tras la expresión recombinante de anticuerpos completos. La expresión recombinante de anticuerpos IgG1 humanos completos se logró tras la inserción de las secuencias variables de cadena pesada y ligera "en el marco de lectura correcto" en vectores de expresión que complementan la secuencia de la región variable con una secuencia que codifica un péptido líder en el extremo 5' y en el extremo 3' con una secuencia que codifica el dominio o dominios constantes apropiados. Con ese fin, los cebadores contenían sitios de restricción diseñados para facilitar la clonación de las secuencias variables de cadena pesada y ligera en vectores de expresión de anticuerpos. Las inmunoglobulinas de cadena pesada se expresaron insertando el producto de RT-PCR de cadena pesada de inmunoglobulina en el marco en un vector de expresión de cadena pesada que porta un péptido señal y los dominios constantes de inmunoglobulina gamma 1 humana o de ratón. Las inmunoglobulinas de cadena ligera kappa se expresaron insertando producto de RT-PCR de cadena ligera kappa en el marco en un vector de expresión de cadena ligera que proporciona un péptido señal y el dominio constante de la inmunoglobulina de cadena ligera kappa humana. Las inmunoglobulinas de cadena ligera lambda se expresaron insertando el producto de RT-PCR de cadena ligera lambda en el marco en un vector de expresión de cadena ligera lambda que proporciona un péptido señal y el dominio constante de inmunoglobulina de cadena ligera lambda humana o de ratón.

Se obtuvieron anticuerpos monoclonales recombinantes funcionales tras la cotransfección en células HEK 293 o CHO (o cualquier otra línea celular receptora apropiada de origen humano o de ratón) de un vector de expresión de cadena pesada de Ig y un vector de expresión de cadena ligera de Ig kappa o lambda. El anticuerpo monoclonal humano recombinante se purificó posteriormente a partir del medio acondicionado usando una purificación en columna de

proteína A estándar. El anticuerpo monoclonal humano recombinante se puede producir en cantidades ilimitadas utilizando células transfectadas de forma transitoria o estable. Las líneas celulares que producen anticuerpos monoclonales humanos recombinantes pueden establecerse utilizando los vectores de expresión de Ig directamente o clonando de nuevo las regiones variables de Ig en diferentes vectores de expresión. También se pueden generar derivados tales como F(ab), F(ab)₂ y scFv a partir de estas regiones variables de Ig.

Las regiones determinantes de complementariedad y del marco se determinaron por comparación con las secuencias de anticuerpos de referencia disponibles en bases de datos tales como Abysis (<http://www.bioinf.org.uk/abysis/>), y se anotaron utilizando el esquema de numeración de Kabat (<http://www.bioinf.org.uk/abs/>). Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de los anticuerpos objetivo NI-301.59F1, NI-301.35G11, NI-301.37F1, NI-301.2F5, NI-301.28B3, NI-301.119C12, NI-301.5D8, NI-301.9 D5, NI-301.104F5, NI-301.21F10, NI-301.9G12, NI-301.12D3, NI-301.37F1-PIMC, NI-301.44E4, NI-301.18C4, NI-301.11A10, NI-301.3C9, NI -301.14D8, NI-301.9X4 y NI-301.14C3 que incluyen la indicación del marco (FR) y las regiones determinantes de complementariedad (CDR) se muestran en la Figura 1A-1T.

A continuación, la alta afinidad de los anticuerpos objetivo para las conformaciones de TTR mal plegadas-agregadas y la falta sustancial de unión a las conformaciones de TTR de tipo silvestre nativas, que demuestran por lo tanto una fuerte selectividad para la TTR mutante, mal plegada, mal ensamblada y/o agregada se ilustra a modo de ejemplo para los anticuerpos NI-301.59.F1, NI-301.35G11 y NI-301.37F1. Sin embargo, los experimentos preliminares para otros anticuerpos en cuestión sugieren sustancialmente la misma unión preferencial a TTR mutante, mal plegada, mal ensamblada y/o agregada sobre especies de TTR fisiológicas como los anticuerpos NI-301.59.F1, NI-301.35G11, y NI-301.37F1.

Ejemplo 3: Afinidad de unión de anticuerpos anti-TTR utilizando ELISA directo y determinación de EC₅₀

La capacidad del anticuerpo para unirse a TTR y/o formas mal plegadas, mal ensambladas y/o agregadas de TTR se evaluó por medio de ensayos de ELISA directo a concentraciones variables de anticuerpos. Esto permite determinar para cada anticuerpo su concentración media máxima efectiva (EC₅₀) en este ensayo, que es un proxy comúnmente utilizado para la afinidad de unión del anticuerpo, véase la Figura 2. En resumen, se recubrieron placas de ELISA (de alta unión, poliestireno transparente, área media, fondo plano) con TTR humana de tipo silvestre mal plegada-agregada, V30M-TTR recombinante mal plegada-agregada (ambas preparadas como se describe en el Ejemplo 1) y albúmina de suero bovino (BSA) a una concentración de 10 µg/mL en solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante 1 hora a 37 °C, y posteriormente se bloquearon con una solución de BSA al 2% y Tween-20 al 0,1% en PBS (PBS-T) durante 1 hora a temperatura ambiente (TA). Los anticuerpos contra TTR se diluyeron en PBS a 11 concentraciones diferentes que variaban de 4 a 400 nM y se incubaron en las placas de ELISA durante la noche a 4 °C. Después de 3 lavados con PBS-T, las placas de ELISA se incubaron con un anticuerpo secundario específico de IgG humano acoplado a HRP durante 1 hora a TA (dilución 1/4000). Después de 3 lavados con PBS-T, las reacciones de ELISA se desarrollaron con TMB durante exactamente 10 min a TA y se cuantificaron midiendo la densidad óptica a 450 nm (OD450nm).

Los ejemplos de anticuerpos NI-301.59F1, NI-301.35G11 y NI-301.37F1 exhibieron una fuerte unión a TTR de tipo silvestre y mutante mal plegada-agregada, pero no a la BSA de control, véase la Figura 2 A-C. Posteriormente, se determinaron las EC₅₀ del anticuerpo ajustando los datos con una regresión no lineal utilizando el método de mínimos cuadrados para estimar la afinidad de unión del anticuerpo en estas condiciones.

Los ejemplos de anticuerpos NI-301.59F1, NI.35G11 y NI-301.37F1 exhibieron una alta afinidad por la TTR humana de tipo silvestre mal plegada-agregada correspondiente a las EC₅₀ de 3.0 nM, 3.9 nM y 0.35 nM, respectivamente. Los ejemplos de anticuerpos también mostraron una alta afinidad por la V30M-TTR el mutante recombinante mal plegada-agregada, correspondiente a la EC₅₀ de 15.5 nM, 5.0 nM y 0.15 nM, respectivamente.

Ejemplo 4: Selectividad de unión de anticuerpos anti-TTR utilizando inmunotransferencia de manchas

Para evaluar la selectividad de unión de los anticuerpos de TTR y/o fragmentos de los mismos por conformaciones de TTR nativas o mal plegadas, mal ensambladas y/o agregadas, la proteína TTR humana de tipo silvestre en conformaciones nativa o mal plegada-agregada y proteína V30M-TTR recombinante en conformaciones mal plegadas-agregadas se diluyeron en PBS a 4 concentraciones diferentes, y se depositaron mediante filtración al vacío sobre una membrana de nitrocelulosa. La membrana se secó brevemente (10 min) y se bloqueó con leche al 3% en PBS-T durante 1 hora a TA, y posteriormente se incubó con anticuerpos anti-TTR durante la noche a 4 °C. Después de 3 lavados con PBS-T durante 5 min a TA, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario apropiado (acoplado a HRP; dilución 1/10000) durante 1 hora a TA. Después de 3 lavados con PBS-T, se reveló la membrana con luminol y se cuantificó la intensidad de la señal midiendo la luminiscencia.

El ejemplo de anticuerpo anti-TTR comercial unido a conformaciones de TTR nativas así como mal plegadas-agregadas con afinidad similar, demostraron por lo tanto, su ausencia de selectividad de unión por conformaciones de TTR nativas o mal plegadas, mal ensambladas y/o agregadas, véase Figura 3A. Por el contrario, los ejemplos de anticuerpos NI-301.59.F1, NI-301.35G11 y NI-301.37F1 se unieron con alta afinidad a las conformaciones de TTR mal

plegadas y agregadas solamente, y no mostraron unión a las conformaciones de TTR nativas, demostrando así una fuerte selectividad por TTR mal plegadas, mal ensambladas y/o agregadas (Figura 3 B2, C2, D2). Por consiguiente, los anticuerpos NI-301.35G11 y NI-301.37F1 también mostraron una fuerte unión a la proteína V30M-TTR recombinante mal plegada-agregada, como se muestra en la Figura 3 C3 y D3.

Para caracterizar aún más la selectividad de unión del anticuerpo, se procesaron de forma similar varias preparaciones de TTR que incluían conformaciones de tipo silvestre y mutante, nativas y mal plegadas-agregadas, y una colección de 12 muestras de plasma humano para el análisis mediante inmunotransferencia de manchas, usando anticuerpos anti-TTR quiméricos murinos y acoplados a HRP, anticuerpo secundario anti-IgG2a de ratón para detección (Figura 6).

El anticuerpo comercial exhibió una fuerte unión a todas las preparaciones de TTR, incluidas las preparaciones de TTR de tipo silvestre y mutante, nativa y mal plegada-agregada, y fue capaz de detectar TTR en todas las muestras de plasma humano. Esto demuestra además la ausencia de selectividad para conformaciones nativas o agregadas, véase Figura 6A. Por el contrario, el ejemplo de anticuerpo quimérico de ratón NI-301.mur35G11 exhibió una unión muy fuerte a la muestra de TTR de tipo silvestre mal plegada-agregada (Figura 6 C1), y también una fuerte unión a la proteína V30M-TTR mutante (Figura 6 C4) y a la proteína Y78F-TTR mutante (Figura 6 C6). Sin embargo, el anticuerpo NI-301.mur35G11 no se unió a TTR en las muestras de plasma humano. Esto demuestra además la fuerte selectividad de NI-301.mur35G11 para la proteína TTR mutada, mal plegada, mal ensamblada y/o agregada.

Ejemplo 5: Especificidad de unión y selectividad de anticuerpos anti-TTR utilizando transferencia Western

Se evaluó la especificidad de unión y la selectividad de los anticuerpos anti-TTR mediante transferencia Western, véase la Figura 4. En resumen, la proteína TTR humana de tipo silvestre (300 ng) en conformaciones nativas o mal plegadas-agregadas, y el extracto de hígado de ratón de tipo silvestre (10 µg de proteína total) se cargaron en un gel SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa usando un sistema de transferencia semiseco. Posteriormente, la membrana se bloqueó con BSA al 2% en PBS-T durante 1 hora a TA, y se incubó durante la noche a 4 °C con anticuerpos anti-TTR diluidos en tampón de bloqueo. Después de 4 lavados con PBS-T durante 5 min a TA, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario apropiado (acoplado a HRP; dilución 1/10000 en tampón de bloqueo) durante 1 hora a TA. Después de 3 lavados con PBS-T y uno final en PBS, se reveló la membrana con luminol y se cuantificó la intensidad de la señal midiendo la luminiscencia. Poco antes de su uso, la muestra de TTR mal plegada-agregada se sometió a entrecruzamiento con glutaraldehído (1%, 5 min, 37 °C) para evitar la disociación de los agregados de TTR durante el proceso de preparación para SDS-PAGE. Por el contrario, la muestra de TTR nativa no se entrecruza antes de su uso, de modo que el homotetrámero de TTR (que es la conformación de TTR nativa en condiciones fisiológicas) se disoció casi por completo en monómeros y dímeros.

El anticuerpo anti-TTR comercial mostró una unión muy fuerte a los monómeros y dímeros de TTR de la muestra de TTR humana nativa (Figura 4 A1), y una unión igualmente fuerte a la muestra de TTR mal plegada-agregada entrecruzada (Figura 4 A2), lo que demuestra la ausencia de selectividad para conformaciones de TTR nativas o mal plegadas, mal ensambladas y/o agregadas. Por el contrario, los ejemplos de anticuerpos anti-TTR NI-301.59F1, NI-301.35G11 y NI-301.37F1 mostraron una unión muy fuerte a la muestra de TTR mal plegada-agregada entrecruzada (Figura 4 B2, C2, D2) pero no unión en absoluto a los monómeros y dímeros de TTR de la muestra de TTR humana nativa (Figura 4 B1, C1, D1), demostrando así una fuerte selectividad por las conformaciones de TTR mal plegadas, mal ensambladas y/o agregadas sobre las conformaciones de TTR nativas.

Además de eso, los anticuerpos anti-TTR comerciales y de ejemplo tenían niveles muy bajos de unión a las proteínas contenidas en el extracto de hígado de ratón (Figura 4 A3, B3, C3, D3). En vista de la gran cantidad de proteínas hepáticas utilizadas para el experimento y las altas concentraciones de anticuerpos con respecto a su afinidad de unión, esto indica que los ejemplos anticuerpos tienen una especificidad notable por TTR y no se unen significativamente a otras proteínas. Además, parece que los ejemplos de anticuerpos no se unen a la proteína TTR de ratón contenida en niveles elevados en el extracto de hígado de ratón, lo que indica que los ejemplos de anticuerpos muestran especificidad por la proteína TTR humana mal plegada. Sin embargo, el epítipo del anticuerpo NI-301.37F1 está presente en la proteína TTR de rata y ratón. Por consiguiente, la secuencia de aminoácidos primaria del epítipo puede no ser necesariamente decisiva para la detección de TTR mal plegada, sino la conformación.

Para caracterizar adicionalmente la capacidad de unión del anticuerpo, o su ausencia de la misma, a la proteína TTR nativa, se evaluó la capacidad de los ejemplos de anticuerpos para unirse a la proteína TTR contenida en muestras de plasma humano utilizando la misma técnica de transferencia Western que se describió aquí anteriormente. (Figura 5). La única diferencia técnica consistió en recortar la parte superior del gel a aproximadamente 25-30 kDa y usar solo la parte inferior del gel para transferir las proteínas a la membrana de nitrocelulosa. Esto es para eliminar las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos humanos presentes en alta concentración en las muestras de plasma, que potencialmente podrían interferir con el análisis.

Por el contrario, con el anticuerpo comercial usado como referencia, los ejemplos de anticuerpos NI-301.35G11 y NI-301.37F1 no detectaron en absoluto la proteína TTR humana contenida en muestras de plasma humano, lo que indica selectividad de unión por una conformación TTR que no está presente en las muestras analizadas bajo estas

condiciones.

Ejemplo 6: Selectividad de unión de anticuerpos anti-TTR en solución utilizando inmunoprecipitación

Para verificar adicionalmente la selectividad de unión de los anticuerpos anti-TTR de la presente invención, se usaron proteína TTR recombinante y humana de tipo silvestre en conformaciones nativas y mal plegada-agregada, y una muestra de plasma humano a 3 diluciones diferentes en PBS para inmunoprecipitación (IP) de TTR. En resumen, se incubaron perlas magnéticas recubiertas de proteína A con anticuerpos anti-TTR diluidos en tampón de unión del fabricante durante 30 min a TA. El complejo anticuerpo/proteína A se recuperó y se incubó durante la noche a 4 °C con preparaciones de TTR y muestras de plasma humano. Después de los lavados, el complejo de anticuerpo/proteína A se resuspendió en tampón de carga SDS, se calentó durante 5 min a 90 °C y se procesó para el análisis de transferencia Western.

Como se muestra en la Figura 7, los ejemplos de anticuerpos de TTR NI-301.35G11 y NI-301.37F1, no mostraron por el contrario unión del anticuerpo TTR comercial Dako A0002, a las muestras de plasma (Figura 7 A7-9, B7-9, C7-9), así como tampoco unión a las muestras de TTR recombinante y nativa de tipo silvestre (Figura 7 B3, C3, B5, C5). Sin embargo, se evaluó una unión fuerte en la muestra, en la que estaban presentes formas mal plegadas-agregadas de TTR (Figura 7 B4, C4, B6, C6).

Estos resultados indican que los ejemplos de anticuerpos NI-301.35G11 y NI-301.37F1 son capaces de unir conformaciones de TTR mal plegadas, mal ensambladas y/o agregadas en solución, y muestran una notable selectividad para estas conformaciones.

Ejemplo 7: Unión a agregados patológicos de TTR en tejido de ratón con FAP

Se evaluaron ejemplos de anticuerpos anti-TTR por inmunohistoquímica (IHC) para determinar su capacidad para unirse a la proteína TTR patológica y no patológica tal como está presente en los tejidos de ratones transgénicos que expresan exclusivamente la proteína V30M-TTR humana y no la proteína TTR de ratón (en lo sucesivo denominados ratones FAP). Estos anticuerpos también se evaluaron para determinar la unión no específica en tejidos de ratones TTR inactivada (TTR-KO) que no expresan ninguna proteína TTR, y las líneas de ratón transgénicas e inactivadas correspondientes fueron inicialmente generadas y descritas por el profesor Suichiro Maeda (Kohno K. et al., American Journal of Pathology 140 (4) (1997), 1497-1508). En resumen, se realizó inmunohistoquímica en tejidos de ratón incluidos en parafina cortados en secciones de 3-5 µm de espesor. Las secciones se desparafinaron y rehidrataron inicialmente, y se trataron con H₂O₂ al 3% en metanol durante 20 min a TA. Se aplicó tampón de bloqueo (PBS + suero al 5% (caballo/cabra) + BSA al 4%) durante 1 hora a TA y se reemplazó con anticuerpo anti-TTR diluido en PBS para incubación durante la noche a 4 °C. Después de 3 lavados en PBS, las secciones se incubaron sucesivamente con los anticuerpos secundarios biotinilados apropiados (anti IgG humana, dilución anti IgG de conejo 1/125 en PBS, incubación 1 hora a TA) y el sistema de detección de avidina-HRP (dilución 1/125 en PBS, incubación 1 hora a TA). La reacción se desarrolló con diaminobencidina durante exactamente 15 min a TA. Las secciones de tejido se tiñeron por contraste con hemalun durante 1 min a TA, se deshidrataron en series de etanol ascendente y se cubrieron con cubreobjetos.

Como se muestra en la Figura 8, un anticuerpo de TTR comercial Dako A0002 generó una fuerte tinción en secciones de hígado e intestino de ratones FAP y no produjo ninguna tinción en las correspondientes secciones de TTR KO (Figura 8 1A, 1B). El ejemplo de anticuerpo de TTR NI-301.35G11 generó una tinción de patrón e intensidad similares en secciones de hígado e intestino de ratones FAP (Figura 8 2A). Por el contrario, el ejemplo de anticuerpo NI-301.37F1 generó una fuerte tinción solo en la sección del intestino pero no en la sección del hígado del ratón FAP (Figura 8 3A). Esto indica que el anticuerpo NI-301.37F1 se une solo a los agregados de TTR patológicos (es decir, no fisiológicos) que se acumulan con el tiempo en el tracto gastrointestinal de los ratones FAP, y no a TTR en la conformación nativa sintetizada por el hígado.

Además de eso, ambos ejemplos de anticuerpos NI-301.35G11 y NI-301.37F1 no generaron ninguna tinción en secciones de tejido de hígado e intestino de ratones TTR-KO (Figura 8 2B, 3B). En vista de las altas concentraciones de anticuerpos utilizadas en este experimento con respecto a la afinidad de unión del anticuerpo, esta ausencia de tinción en las secciones de TTR-KO indica una alta especificidad de unión para la proteína TTR.

Ejemplo 8: Selectividad de unión para depósitos de TTR mal plegadas, mal ensambladas y/o agregadas en tejido humano

Los anticuerpos de la presente invención también se evaluaron por su capacidad para unirse a depósitos de TTR patológicos en tejido humano. Se procesaron secciones de una biopsia de piel de un paciente con FAP y secciones de tejido de páncreas de un individuo sano por inmunohistoquímica usando el mismo procedimiento que se describe en el Ejemplo 7, anterior. Se seleccionó la biopsia de piel para este experimento ya que contiene una cantidad importante de depósitos de amiloide de TTR patológicos. Por el contrario, en este experimento se utilizó tejido de páncreas porque las células alfa pancreáticas expresan TTR en un nivel elevado.

Como se muestra en la Figura 9, el anticuerpo comercial Dako A0002 reveló una tinción igualmente fuerte de depósitos

de TTR patológicos en la piel y TTR nativa en células alfa pancreáticas (Figura 9 1A). De manera similar, el ejemplo de anticuerpo quimérico de ratón NI-301.mur35G11 produjo una tinción igualmente fuerte tanto en depósitos de TTR patológicos en la piel como de TTR nativa en células alfa pancreáticas (Figura 9 1B). Por el contrario, el anticuerpo NI-301.37F1 tiñó solamente el depósito de TTR patológico en la piel y no la TTR nativa en las células alfa pancreáticas (Figura 9 3A). Este resultado demuestra que NI-301.37F1 es altamente selectivo por IHC para depósitos de TTR patológicos, que incluyen conformaciones de TTR mutadas, mal plegadas, mal ensambladas y/o agregadas.

La afección de control de "solo anticuerpo secundario" presentada en los paneles 1B, 2B y 3B de la Figura 9 revela la tinción del tejido que se produce en ausencia del anticuerpo primario. La ausencia (2B) o el nivel muy bajo (1B, 3B) de tinción indica que la tinción observada en los paneles 1A, 2A y 3A es de hecho específica para los correspondientes anticuerpos primarios.

Ejemplo 9: Evaluación del epítipo de unión de los anticuerpos de TTR

Para determinar el epítipo de unión de los ejemplos de anticuerpos NI-301.59F1, NI301.35G11 y NI-301.37F1, se analizó la secuencia completa de aminoácidos de TTR usando un panel de 29 péptidos secuenciales de 15 aminoácidos de longitud y 11 aminoácidos de superposición, unida covalentemente a una membrana. También se representaron en la membrana péptidos adicionales que incluían mutaciones seleccionadas. La membrana se bloqueó en tampón de bloqueo Roti durante la noche a 4 °C, se incubó primero con el anticuerpo anti-TTR diluido en tampón de bloqueo durante 2 horas a TA, luego con un anticuerpo anti IgG humano acoplado a HRP durante 45 min a TA (dilución 1/20000 en TBS). La reacción se desarrolló con luminol y se obtuvieron imágenes por luminiscencia.

El anticuerpo NI-301.59F1 reconoce las manchas 15, 16 y 44 que corresponden a la secuencia 61-EEEFVEGIY-69 (SEQ ID NO: 49) en TTR humana de tipo silvestre completa, véase la Figura 10A. El anticuerpo NI-301.35G11 reconoce las manchas 13, 14, 42 y 44 que corresponden a la secuencia 53-GELHGLTTEEE-63 (SEQ ID NO: 50) en TTR humana de tipo silvestre completa, véase Figura 10 B. Sin embargo, el anticuerpo NI-301.35G11 no reconoce la mancha 43, lo que indica que este anticuerpo no puede unirse a la secuencia 53-GELHGPTTEEE-63 correspondiente a la variante L55P-TTR. El anticuerpo NI-301.37F1 reconoce las manchas 9, 10, 11, 38 y 40 que corresponden a la secuencia 41-WEPFA-45 (SEQ ID NO: 51) en TTR humana de tipo silvestre completa, véase Figura 10C. Sin embargo, el anticuerpo NI-301.37F1 no reconoce la mancha 43, lo que indica que este anticuerpo no puede unirse a la secuencia 41-WGPFA-45 correspondiente a la variante E42G-TTR.

Para refinar la determinación del epítipo de unión de los ejemplos de anticuerpos NI-301.59F1, NI301.35G11 y NI-301.37F1, se analizó la secuencia completa de aminoácidos de TTR usando un panel de 151 péptidos secuenciales de 15 aminoácidos de longitud y 14 superposiciones de aminoácidos, unidos covalentemente a una membrana. Para cada péptido, el aminoácido en la posición 10 fue reemplazado por una alanina para los aminoácidos no alanina, mientras que las alaninas fueron reemplazadas por glicina o prolina. La membrana se bloqueó en tampón de bloqueo Roti durante la noche a 4 °C, se incubó primero con el anticuerpo anti-TTR diluido en tampón de bloqueo durante 2 horas a TA, luego con un anticuerpo anti IgG humano acoplado a HRP durante 45 min a TA (dilución 1/20000). La reacción se desarrolló con luminol y se obtuvieron imágenes por luminiscencia.

El anticuerpo NI-301.59F1 reconoce solo las manchas 77 y 83, lo que indica que E61 y V65 no son necesarios para la unión de 59F1 mientras que E62, E63, F64, E66, G67, 168 y Y69 son necesarios para la unión de anticuerpos. La contribución exacta de K70 es cuestión de interpretación: la fuerte unión del anticuerpo al péptido 44 que se muestra en la Figura 10A indica claramente que la ausencia de K70 en la posición del extremo terminal C no evita la unión del anticuerpo; en el experimento posterior mostrado en la Figura 10E, sin embargo, la sustitución de K70A en la posición 10 del péptido evitó la unión del anticuerpo. Estos resultados aparentemente opuestos sugieren que NI-301.59F1 se une a una conformación específica de la secuencia de aminoácidos 62-EEFXEGIY-69 (SEQ ID NO: 58), en la que X puede ser cualquier aminoácido.

El anticuerpo NI-301.35G11 reconoce las manchas 68, 71, 72, 73, 74 y 75, lo que indica que no se requiere G53 para la unión de 35G11 mientras que se requieren E54, L55, G57 y L58 para la unión de anticuerpos. El patrón de unión de 35G11 también indica que se requiere la presencia de E61 o E62 para la unión de anticuerpos. La contribución exacta de T59 y T60 no pudo determinarse en este experimento, pero se plantea la hipótesis de que se requiere la presencia de una de las dos tirosinas para la unión del anticuerpo. Tomados en conjunto, el perfil de unión de NI-301.35G11 en la exploración de alanina indica que este anticuerpo reconoce la secuencia 54 ELXGLTXE 61 (SEQ ID NO: 59), en la que X puede abarcar todos los aminoácidos conocidos, véase la Figura 10F.

El anticuerpo NI-301.37F1 se une a las manchas 50, 52, 55, 56 y 58-62 en la membrana de exploración de alanina, y no a las manchas 51, 53, 54 y 57. Esto indica que W41, P43, F44 y A45 se requieren para la unión del anticuerpo. Combinados con la observación anterior de que la mutación E42G interrumpe la unión del anticuerpo (Figura 10C), estos resultados indican que NI-301.37F1 se une a la secuencia 41-WEPFA-45 (SEQ ID NO: 60), véase la Figura 10G.

Ejemplo 10: Determinación de las características de unión del anticuerpo por resonancia de plasmón de superficie Las características de unión del anticuerpo a diversas preparaciones de TTR solubles se determinaron mediante resonancia de plasmón de superficie (SPR), usando una máquina Biorad Proteon XPR36, véase la Tabla V.

El análisis de SPR se realizó en un BioRad ProteOn XPR36 equipado con un chip sensor GLM. Un anticuerpo antihumano dirigido contra el dominio Fc gamma se acopló covalentemente a la superficie de detección y se saturó con el anticuerpo bajo investigación. La proteína TTR de tipo silvestre y mutante en conformaciones nativas y mal plegadas se diluyó en tampón HBS-T a concentraciones que variaban de 3.2 a 316 nM. Se analizó la asociación anticuerpo-antígeno durante 180 s y la disociación durante 600 s. Se utilizó un modelo de unión de Langmuir (asociación simple 1:1) para ajustar los datos y derivar las constantes de asociación (k_a) y disociación (k_d), y la afinidad (KD).

Se revistió covalentemente un anticuerpo anti-IgG-Fc γ humano sobre las superficies de detección y se usó para capturar los anticuerpos específicos de TTR humana. Los anticuerpos se probaron con 4 preparaciones de TTR diferentes, incluida la TTR de tipo silvestre nativa y mal plegada-agregada, y mutantes de TTR nativa V30M y L55P, todas preparadas a concentraciones de 3.2 a 316 nM en tampón HBS-T (Hepes 10 mM, 150 mM NaCl, EDTA 3 mM, Tween 20 al 0.05%, pH 7.4). Se preparó TTR de tipo silvestre mal plegada-agregada por desnaturalización ácida a 65 °C durante 80 min en tampón de acetato (acetato HCl 50 mM, KCl 100 mM, EDTA 1 mM, pH 3.0), con posterior intercambio de tampón con HBS-T. 59F1, 35G11 y 37F1 exhibieron características de unión y disociación lineales que se ajustaron mejor con el modelo de Langmuir.

Los resultados muestran que estos tres anticuerpos se unen con alta afinidad a las variantes V30M-TTR y L55P-TTR en solución, así como a la preparación de TTR de tipo silvestre mal plegada-agregada. Por el contrario, estos ejemplos de anticuerpos no se unen a TTR de tipo silvestre nativa en solución.

Por consiguiente, los resultados muestran que NI-301.37F1 se une con alta afinidad a la proteína TTR humana de tipo silvestre mal plegada en solución, con una KD de 1.2 nM, pero no a la misma proteína en su conformación nativa. Se midió una afinidad de unión similar (KD = 1.4 nM) para la proteína TTR-L55P mutante.

Tabla V: Determinación de las características de unión del anticuerpo por resonancia de plasmón de superficie.

Anticuerpo NI-301.	Antígeno	Ajuste de Langmuir (modelo de interacción 1:1)		
		k_a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_d (s ⁻¹)	KD
59F1	TTR nativa	n.a	n.a	> 316 nM
	TTR mal plegada-agregada	9.7×10^4	3.4×10^{-4}	3.5 nM
	TTR-V30M nativa	1.3×10^4	2.2×10^{-4}	16 nM
	TTR-L55P nativa	5.1×10^4	1.5×10^{-4}	3.1 nM
35G11	TTR-TS nativa	n.a	n.a	> 316 nM
	TTR mal plegada-agregada	2.3×10^4	2.7×10^{-4}	12 nM
	TTR-V30M nativa	7.4×10^3	2.4×10^{-4}	33 nM
	TTR-L55P nativa	n.a.	n.a.	> 100 nM
37F1	TTR-TS nativa	n.a	n.a	> 316 nM
	TTR mal plegada-agregada	2.1×10^4	2.6×10^{-5}	1.2 nM
	TTR-V30M nativa	1.1×10^4	1.9×10^{-4}	17 nM
	TTR-L55P nativa	3.3×10^4	4.6×10^{-5}	1.4 nM

Ejemplo 11: Inmunización pasiva de ratones transgénicos para TTR humano Val30Met, que presenta depósito de TTR tisular, con anticuerpo anti-TTR recombinante quimérico humano-ratón que da como resultado la eliminación del depósito.

La inmunización pasiva se realizó de manera similar a la descrita en la solicitud internacional WO 2010/030203, en particular el Ejemplo 3, así como de las referencias Kohno et al., Am. J. Pathol. (1997), 1497-1508 y Sousa et al., Am. J. Pathol. (2002), 1935-48, citados allí.

En resumen, el anticuerpo monoclonal se administró por vía intraperitoneal semanalmente durante 12 semanas a una dosis de 3 mg/kg a ratones FAP de 7 y 17 meses de edad, que eran transgénicos para el alelo Val30Met-TTR humano y desactivado para el gen TTR murino (Kohno et al., (1997), citado anteriormente). En los cinco días siguientes a la última dosis, se sacrificaron los animales y se recolectaron varios tejidos y se fijaron en una solución de

paraformaldehído y se embebieron en parafina. Se cortaron secciones de 3-5 μm y se procesaron para inmunohistoquímica usando el anticuerpo anti-TTR comercial descrito anteriormente. Se utilizó un procedimiento de inmunofluorescencia estándar, que era muy similar al indicado en el ejemplo 7 con la única diferencia de que se utilizó un anticuerpo secundario fluorescente para la detección. La superficie del tejido invadido con depósito de TTR se cuantificó y expresó como porcentaje del área total del tejido. El análisis estadístico del efecto del tratamiento se realizó con una prueba t de dos colas no pareada.

Esta línea de ratones transgénicos reproduce el mecanismo patológico clave común a las enfermedades amiloides de TTR que consiste en el desensamblaje del tetrámero de TTR y el plegamiento incorrecto de los monómeros de TTR en una conformación amiloidogénica tóxica e insoluble. Al igual que los pacientes con FAP, estos ratones transgénicos presentan típicamente deposición de TTR dependiente de la edad. La evaluación de la eficacia del tratamiento se investigó en dos grupos de ratones transgénicos que tenían 7 meses y 17 meses al inicio del tratamiento; edades en las que la deposición de TTR es importante e invade muchos tejidos gastrointestinales. Sorprendentemente, la inmunización pasiva con el ejemplo de anticuerpo NI-301.37F1 se asoció con una reducción estadísticamente significativa en la superficie del tejido invadido con la deposición de TTR cuando el tratamiento se inició a los 7 meses de edad, véase la Figura 12A. El tratamiento tuvo un efecto similar en ratones viejos, lo que condujo a una reducción casi significativa en la deposición de TTR, véase la Figura 12B.

Ejemplo 12: Los anticuerpos anti-TTR recombinantes de origen humano se unen a depósitos patológicos de TTR *in vivo*

Para determinar si los anticuerpos anti-TTR recombinantes de origen humano son capaces de unirse a depósitos patológicos de TTR *in vivo*, se inyectaron ratones FAP adultos de 7 meses de edad con el anticuerpo NI-301.37F1 a razón de 30 mg/kg ip o con PBS para comparación. Después de 48 horas, estos ratones se sometieron a perfusión transcardiaca y los tejidos se procesaron para análisis histológico. Los depósitos patológicos de TTR se detectaron usando un anticuerpo anti-TTR policlonal de conejo en combinación con un anticuerpo anti-IgG de conejo marcado con fluorescencia, mientras que la localización del anticuerpo NI-301.37F1 inyectado se detectó con un anticuerpo anti-IgG humano marcado con fluorescencia. En particular, la inmunoprecipitación se realizó como sigue.

La inmunoprecipitación de NI-301.37F1 y anticuerpos de control de isotipo de muestras de plasma de ratón se realizó durante 2 horas a 4°C, usando perlas magnéticas acopladas a proteína A/G (Pierce # 88803) cargadas con anticuerpo anti-IgG humano (Jackson ImmunoResearch # 709-005-098). Después de 3 lavados con PBS-T, las muestras se eluyeron de perlas magnéticas con un tampón de glicina 0.2 M (pH 2.5), se neutralizaron con Tris HCl 1 M (pH 8.0), se mezclaron con tampón de carga de LDS (Life Technologies # NP0007) y se calentaron 10 min a 90 °C. A continuación, las muestras se cargaron en un gel bis-tris al 4-12% (Life Technologies # WG1403A) y se corrieron durante 40 min a 200 V en tampón de ejecución MOPS. Después de la transferencia de la proteína a una membrana de nitrocelulosa, la proteína TTR se detectó usando el anticuerpo de TTR independiente de la conformación (Dako # A0002, 150 ng/mL) o el anticuerpo NI-301.37F1 (20 nM), en combinación con proteína A acoplada a HRP (Life Technologies # 10-1023, dilución 1/10000) e imágenes luminiscentes.

El acoplamiento del objetivo *in vivo* como se describe en la Figura 13 se realizó en ratones FAP adultos (7 meses de edad) que recibieron una única inyección de anticuerpo NI-301.37F1 a razón de 30 mg/kg ip o PBS. Cuarenta y ocho horas después, los ratones fueron perfundidos con PBS y los órganos fueron recolectados y procesados para análisis histológico. Los depósitos patológicos de TTR se detectaron mediante inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo anti-TTR policlonal de conejo comercial (Dako # A0002, 4.8 $\mu\text{g/mL}$) en combinación con un anticuerpo anticonejo conjugado con Cy5 (Jackson ImmunoResearch # 711-175-152, dilución 1/200). La presencia (o ausencia) de NI-301.37F1 se detectó simultáneamente usando un anticuerpo antihumano conjugado con Cy3 (Jackson ImmunoResearch # 709-165-149, dilución 1/200). Se utilizaron los mismos parámetros de escaneo para obtener imágenes de tejidos inyectados con NI-301.37F1 y con PBS, y las imágenes recibieron los mismos ajustes de visualización.

Como se muestra en la Figura 13, la tinción dependiente de NI-301.37F1 estaba altamente colocalizada con tinción de TTR en ratones inyectados con NI-301.37F1, pero estaba completamente ausente en ratones inyectados con PBS, como se esperaba. Este resultado indica que el anticuerpo anti-TTR NI-301.37F1 se une a depósitos patológicos de TTR *in vivo*.

Ejemplo 13: La detección de depósitos de proteína TTR mal plegada *in vivo* no requiere biopsias de tejido

Este procedimiento de diagnóstico que reemplaza la biopsia de tejido y el análisis histológico en el proceso de diagnóstico de enfermedades amiloides por TTR asociadas con TTR agregada, mutada y/o mal plegada se ejemplifica a continuación y se ilustra en la Figura 14. En particular, el experimento se realizó con ratones FAP de 7 meses, como se describió anteriormente; véase el Ejemplo 11, anterior. Estos ratones reproducen el mecanismo fisiopatológico central de FAP y, al igual que los pacientes, presentan depósito de TTR dependiente de la edad en varios tejidos. Dos ratones FAP recibieron una única inyección intraperitoneal del anticuerpo monoclonal anti-TTR recombinante de origen humano NI-301.37F1 a una dosis de 3 mg/kg. Antes de la inyección de anticuerpos (t = 0) y dos días después de la inyección (t = 48 h), se recogieron pequeñas muestras de sangre y se preparó plasma para su análisis. Las muestras

de plasma se sometieron a inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-IgG humano (para recuperar el anticuerpo anti-TTR humano inyectado), con $t = 0$ se usaron muestras como controles negativos. A continuación, las muestras de inmunoprecipitación se procesaron mediante transferencia Western para detectar si el anticuerpo anti-TTR inyectado en ratones había capturado alguna proteína TTR mal plegada durante las 48 horas en las que circuló *in vivo*. Se realizaron transferencias Western usando tanto anticuerpos anti-TTR específicos de la conformación como independientes de la conformación. Se realizó un experimento de control con un anticuerpo de control de isotipo (que no puede unirse a la proteína TTR) como control negativo. Un control adicional consistió en incubar muestras de plasma de ratones FAP no tratados con el anticuerpo NI-301.37F1 *in vitro*, y procesarlas como se describió anteriormente.

Los resultados presentados en la Figura 14 indican que el anticuerpo NI-301.37F1 capturó alguna proteína TTR mal plegada durante el período de incubación de 48 horas *in vivo*. Esto se observó específicamente para el anticuerpo NI-301.37F1 y no para el anticuerpo de control de isotipo. Además, la proteína TTR mal plegada capturada por el anticuerpo NI-301.37F1 no estaba presente en las muestras de plasma recogidas de ratones no tratados. En conjunto, estos resultados indican que el anticuerpo NI-301.37F1 fue capaz de eliminar la proteína TTR mal plegada de los depósitos de TTR insolubles *in vivo*, cuya presencia podría detectarse sin necesidad de biopsias de tejido. Un ajuste técnico para utilizar esta prueba de diagnóstico en humanos consistiría en marcar el anticuerpo anti-TTR permitiendo su recuperación de la muestra de plasma humano, por ejemplo, con una etiqueta de biotina o histidina o estreptavidina. Alternativamente, el anticuerpo anti-TTR no modificado podría recuperarse de una muestra de plasma humano por medio de un anticuerpo anti-idiotípico.

Tabla IV: Mutaciones en el gen TTR

Nombre (Variante de proteína que incluye el péptido señal de 20 aa)	Variante de Secuencia (ARNm)	Cambio de Codón	Ubicación	Fenotipo Reportado	Grupo Étnico	Referencias
Gly6Ser (p.Gly26Ser)	c.76G>A	GGT>AGT	Exón 2	no amiloidogénico	Caucásico	Jacobson (1994) Hum Mutat 3, 254
Cys10Arg (p.Cys30Arg)	c.88T>C	TGT>CGT	Exón 2	AN, E, H, PN	Americano (Húngaro)	Uernichi (1992) J Med Genet 29, 888
Leu 12Pro (p.Leu32Pro)	c.95T>C	CTG>CCG	Exón 2	PN, AN, H, LM, L	Británico	Brett (1999) Brain 122, 183
p.Met13Ile (p.Met33Ile)	c.99G>C	ATG>ATC	Exón 2	no amiloidogénico	Alemán	Altland (1999) The 4th International Symposium on FAP and Other TTR Related Disorders.
Asp18Asn (p.Asp38Asn)	c.112G>A	GAT>AAT	Exón 2	H	Americano	Connors (2003) Amyloid 10, 160
Asp18Gly (p.Asp38Gly)	c.113A>G	GAT>GGT	Exón 2	LM	Húngaro	Vidal (1996) Am J Patho 1148, 361
Asp18Glu (p.Asp 38Glu)	c.114T>A o G	GAT> GAA/G	Exón 2	PN	Sudamericano	Connors (2004) Amyloid 11, 61
Val20Ile (p.Val40Ile)	c.118G>A	GTC>ATC	Exón 2	CTS, H	Alemán, Americano	Jenne (1996) Proc Natl Acad Sci U S A 93, 6302
Ser23Asn (p.Ser43Asn)	c.128G>A	AGT >AAT	Exón 2	E, H, PN	Portugués, Americano	Connors (1999) Amyloid 6, 114
Pro24Ser (p. Pro44Ser)	c.130C>T	CCT >TCT	Exón 2	CTS, H, PN	Americano	Uernichi (1995) J Med Genet 32, 279
Ala25Ser (p.Ala45Ser)	c.133G>T	GCC>TCC	Exón 2	H, PN	Americano	Yazatic (2002) Muscle Nerve 25, 244
Ala25Thr (p.Ala45Thr)	c.133G>A	GCC>ACC	Exón 2	CNS, PN	Japonés	Sekijima (2003) Lab Invest 83, 409
Val28Met (p.Val48Met)	c.142G>A	GTG>ATG	Exón 2	PN	Portugués	Carvalho (2000) Muscle Nerve 23, 1016
Val30Leu (p.Val50Leu)	c.148G>C	GTG>CTG	Exón 2	AN, H, K, PN	Japonés, Americano	Murakami (1992) Biochem Biophys Res Commun 187, 397
Val30Met (p.Val50Met)	c.148G>A	GTG>ATG	Exón 2	AN, E, LM, PN	Americano, Chino, Japonés, Europeo	Saraiva (1984) J Clin Invest 74, 104
Val30Ala (p.Val50Ala)	c.149T>C	GTG>GCG	Exón 2	AN, H	Americano (Alemán)	Jones (1992) Clin Genet 41, 70
Val30Gly (p.Val50Gly)	c.149T>G	GTG>GGG	Exón 2	CNS, E, LM	Americano	Peterson (1997) Ann Neurol 41, 307
Val32Ala (p.Val52Ala)	c.155T>C	GTG>GCG	Exón 2	AN, H, PN	Chino	Pica (2005) Muscle Nerve 32, 223
Val32Gly (p.Val52Gly)	c.155T>G	GTG>GGG	Exón 2	AN, PN	Francés	Plante-Bordeneuve (2003) J Med Genet 40, e120

Nombre (Variante de proteína que incluye el péptido señal de 20 aa)	Variante de Secuencia (ARNm)	Cambio de Codón	Ubicación	Fenotipo Reportado	Grupo Étnico	Referencias
Phe33Ile (p.Phe53Ile)	c.157T>A	TTC>ATC	Exón 2	E, PN	Judío	Jacobson (1988) Biochem Biophys Res Commun 153(1):198
Phe33Leu (p.Phe53Leu)	c.157T>C	TTC>CTC	Exón 2	PN	Americano	Li (1991) Neurology 41, 893
Phe33Val (p.Phe53Val)	c.157T>G	TTC>GTC	Exón 2	PN	Chino, Británico	Tachibana (1999) Amyloid 6(4):282
Phe33Cys (p.Phe53Cys)	c.158T>G	TTC>TGC	Exón 2	CTS, E, K, A, H	Americano	Connors (2003) Amyloid 10, 160
Arg34Gly (p.Arg54Gly)	c.160A>G	AGA>GGA	Exón 2	E	Kosovar	Levy J, Hawkins PN, Rowczenio D, Godfrey T, Stawell R, Zamir E. The Ocular Immunology Clinic, Royal Victorian Eye and Ear Hospital, Melbourne, Australia.
Arg34Thr (p.Arg54Thr)	c.161G>C	AGA > ACA	Exón 2	H, PN	Italiano	Patrosso (1998) Am J Med Genet 77, 13 5
Lys35Asn (p.Lys55Asn)	c.165G>C o T	AAG>AAC/T	Exón 2	AN, PN	Francés	Reilly (1995) Brain 118, 849
Ala36Pro (p.Ala56Pro)	c.166G>C	GCT>C CT	Exón 2	CTS, E, PN	Griego, Italiano, Judío, Americano	Jones (1991) Am J Hum Genet 48, 979
Asp38Ala (p.Asp58Ala)	c.173A>C c.173A>T	GAT>GCT	Exón 2	AN, H, PN	Japonés	Yazaki (2000), Biochem Biophys Res Commun, 274(3):702
Asp38Val (p.Asp58Val)		GAT>GTT	Exón 2	H, PN	Guyanés	Lachmann (2002) N Engl J Med 346, 1786
Asp39Val (p.Asn59Val)	c.176A>T	GAC>GTC	Exón 2	H	Alemán	Eriksson (2009) Am J Surg Pathol 33 (1):58
Trp41Leu (p.Trp61Leu)	c.182G>T	TGG>TTG	Exón 2	E	Americano (Ruso)	Yazaki (2002) Amyloid 9, 263
Glu42Gly (p.Glu62Gly)	c.185A>G	GAG>GGG	Exón 2	AN, H, PN	Japonés, Ruso, Americano	Ueno (1990) Biochem Biophys Res Commun 169, 1117
Glu42Asp (p.Glu62Asp)	c.186G>C o T	GAG>GAC/T	Exón 2	H AN,	Francés	Dupuy (1998) Amyloid 5, 285
Phe44Tyr (p.Phe64Tyr)	c.191T>A	TTT>TAT	Exón 2	PN	Francés	Plante-Bordeneuve (2003) J Med Genet 40, e120
Phe44Ser (p.Phe64Ser)	c.191T>C	TTT>TCT	Exón 2	AN, H, PN	Americano	Klein (1998) Neurology 51, 1462
Ala45Ser (p.Ala65Ser)	c.193G>T	GCC>TCC	Exón 2	H	Sueco	Janunger (2000) Amyloid 7, 137
Ala45Thr (p.Ala65Thr)	c.193G>A	GCC >ACC	Exón 2	H	Irlandés, Italiano, Americano	Saraiva (1992) Am J Hum Genet 50, 1027

Nombre (Variante de proteína que incluye el péptido señal de 20 aa)	Variante de Secuencia (ARNm)	Cambio de Codón	Ubicación	Fenotipo Reportado	Grupo Étnico	Referencias
Ala45Asp (p.Ala65Asp)	c.194C>A	GCC>GAC	Exón 2	H, PN	Irlandés, Americano	Saraiva (1995) Hum Mutat 5, 191
Gly47Arg (p.Gly67Arg)	c.199G>C	GGG>CGG	Exón 2	AN, PN	Japonés	Murakami (1992) Biochem Biophys Res Commun 182, 520
Gly47Arg(p.Gly67Arg)	c.199G>A	GGG>AGG	Exón 2	H, PN	Italiano	Ferlini (2000) Clin Genet 57, 284
Gly47Ala (p.Gly67Ala)	c.200G>C	GGG>GCG	Exón 2	AN, H, PN	Alemán, Italiano, Francés	Ferlini (1994) Hum Mutat 4, 61
Gly47Glu (p.Gly67Glu)	c.200G>A	GGG>GAG	Exón 2	H, K, PN	Alemán, Italiano	Pelo (2002) Amyloid 9, 35
Gly47Val (p.Gly67Val)	c.200G>T	GGG>GTG	Exón 2	AN, CTS, H, PN	Esrihanqués	Booth (1993) Amyloid, 456
Thr49Ala (p.Thr69Ala)	c.205A>G	ACC>GCC	Exón 3	CTS, H, PN	Italiano, Francés	Almeida (1992) Hum Mutat 1, 211
Thr49Pro (p.Thr69Pro)	c.205A>C	ACC>CCC	Exón 3	H, LM	Americano	Nakagawa (2008) J Neurol , 272(1-2):186, Connors (2003) Amyloid 10, 160;
Thr49Ile (p.Thr69Ile)	c.206C>T	ACC>ATC	Exón 3	H, PN	Japonés	Nakamura (1999) Hum Hered 49, 186
Thr49Ser (p.Thr69Ser)	C.206C>G	ACC>AGC	Exón 3	PN	Indio	Rowczenio (2010) XII International Symposium on Amyloidosis
Ser50Ile (p.Ser70Ile)	c.209G>T	AGT>ATT	Exón 3	AN, H, PN	Japonés, Español	Saeki (1992) FEBS Lett 308, 35
Ser50Arg (p.Ser70Arg)	c.210T>G	AGT>AGG	Exón 3	AN, H, PN	Italiano, Francés, Japonés	Ueno (1990) Biochem Biophys Res Commun 169, 1117
Glu51Gly (p.Glu71Gly)	c.212A>G	GAG>GGG	Exón 3	H	Americano	Connors (2003) Amyloid 10, 160
Ser52Pro (p.Ser72Pro)	c.214T>C	TCT>CCT	Exón 3	AN, H, K, PN	Británico	Stangou (1998) Transplantation 66(2):229
Gly53Glu (p.Gly73Glu)	c.218G>A	GGA>GAA	Exón 3	CNS, LM, N	Francés	Ellie (2001) Neurology 57, 135
Gly53Ala (p.Gly73Ala)	c.218G>C	GGA>GCA	Exón 3	AN, E, H, PN, LM	Británico	Douglass (2007) J Neurol Neurosurg Psychiatry 78, 193
Glu54Leu (p.Glu74Leu)	c.220_221 GA>TT	GAG>TTG	Exón 3	H	Belga	Rowczenio (2006) XI International Symposium on Amyloidosis
Glu54Lys (p.Glu74Lys)	c.220G>A	GAG>AAG	Exón 3	AN, H, PN	Japonés	Togashi (1999) Neurology 53, 637
Glu54Gly (p.Glu74Gly)	c.221A>G	GAG>GGG	Exón 3	AN, E, PN	Británico	Reilly (1995) Brain 118, 849

Nombre (Variante de proteína que incluye el péptido señal de 20 aa)	Variante de Secuencia (ARNm)	Cambio de Codón	Ubicación	Fenotipo Reportado	Grupo Étnico	Referencias
Glu54Asp (p.Glu74Asp)	c.222G>T	GAG>GAC	Exón 3	No enlistado	Alemán	Eriksson (2009) Am J Surg Pathol 33 (1):58
Glu54Gln (p.Glu74Gln)	c.220G>C	GAG>CAG	Exón 3	H, PN	Rumano	Coriu D, XIII International Symposium on Amyloidosis
Leu55Gln (p.Leu75Gln)	c.224T>A	CTG>CAG	Exón 3	AN, E, PN	Americano (Español)	Yazaki (2002) Amyloid 9, 268
Leu55Arg (p.Leu75Arg)	c.224T>G	CTG>CGG	Exón 3	LM, PN	Alemán	Connors (2003) Amyloid 10, 160
Leu55Pro (p.Leu75Pro)	c.224T>C	CTG>CCG	Exón 3	AN, E, H, PN	Taiwanés, Americano (Holandés, Alemán)	Jacobson (1992) Hum Genet 89, 353
His56Arg (p.His76Arg)	c.227A>G c.233T>G	CAT>CGT	Exón 3	H AN,	Americano	Jacobson (1999) TTR Locus-specific database Unpublished
Leu58Arg (p.Leu78Arg)		CTC>CGC	Exón 3	CTS, E, H	Japonés	Saeki (1991) Biochem Biophys Res Commun 180, 380
Leu58His (p.Leu78His)	c.233T>A	CTC>CAC	Exón 3	CTS, H	Alemán, Americano (MD)	Nichols (1989) Genomics 5, 535
Thr59Lys (p.Thr79Lys)	c.236C>A	ACA>AAA	Exón 3	AN, H, PN	Italiano, Americano (Asiático)	Saraiva (1995) Hum Mutat 5, 191
Thr60Ala (p.Thr80Ala)	c.238A>G	ACT>GCT	Exón 3	CTS, H, PN	Australiano, Alemán, Irlandés, Británico Americano	Wallace (1986) J Clin Invest 78, 6
Glu61Lys (p.Glu81Lys)	c.241G>A	GAG>AAG	Exón 3	PN	Japonés	Shiomi (1993) Biochem Biophys Res Commun 194, 1090
Glu61Gly (p.Glu81Gly)	c.242A>G	GAG>GGG	Exón 3	CTS, H, PN	Americano (Inglés/Holandés)	Rosenzweig (2007) Amyloid 14, 65
Glu62Lys (p.Glu82Lys)	c.243G>A	GAG>AAG	Exón 3	H	Caucásico	Briani C, Cavallaro T, Ferrari S, Taioli F, Calamelli S, Verga L, Adami F, Fabrizi GM. Sporadic transthyretin amyloidosis with a novel TTR gene mutation misdiagnosed as primary amyloidosis. J Neurol. Oct de 2012; 259 (10): 2226-8.
Phe64Leu (p.Phe84Leu)	c.250T>C	TTT>CTT	Exón 3	CTS, H, PN	Italiano, Americano	Li (1991) Neurology 41, 893

Nombre (Variante de proteína que incluye el péptido señal de 20 aa)	Variante de Secuencia (ARNm)	Cambio de Codón	Ubicación	Fenotipo Reportado	Grupo Étnico	Referencias
Phe64Ser (p.Phe84Ser)	c.251T>C	TTT>TCT	Exón 3	E, LM, PN, CNS	Canadiense (Italiano), Británico	Uernichi (1999) Arch Neurol 56, 1152
Gly67Glu (p.Gly87Glu)	c.260G>A c.	GGG>GAG ATA	Exón 3	H, PN	Chino	Mak (2007) Amyloid, 14, 293
Ile68Leu (p.Ile88Leu)	262A>T/C	>C/TTA	Exón 3	H	Alemán, Americano	Almeida (1991) Basic Res Cardiol 86, 567
Tyr69His (p.Tyr89His)	c.265T>C	TAC>CAC	Exón 3	E	Escosés, Americano	Zeldenrust (1994) Amyloid, 1, 17
Tyr69Ile (p.Tyr89Ile)	c.265-266 TA>AT	TAC >ATC	Exón 3	CTS, H	Japonés	Takei (2003) Amyloid 10, 25
Lys70Asn (p.Lys90Asn)	c.270A>C/T	AAA>AAC/T	Exón 3	CTS, E, PN	Alemán, Americano	Izumoto (1992) Neurology 42, 2094
Val71Ala (p.Val91Ala)	c.272T>C	GTG>GCG	Exón 3	CTS, E, PN	Francés, Español	Almeida (1993) Hum Mutat 2, 420.
Ile73Val (p.Ile93Val)	c.277A>G	ATA>GTA	Exón 3	AN, PN	Bangladesí	Booth (1997) Hum Mutat 12, 135
Asp74His (p.Asp94His)	c.280G>C	GAC>CAC	Exón 3	no amiloidogénico	Alemán	Uernichi (1994) Amyloid, 1, 149
Ser77Phe (p.Ser97Phe)	c.290C>T	TCT>TTT	Exón 3	AN, PN	Francés	Plante-Bordeneuve (1998) Neurology 51, 708
Ser77Tyr (p.Ser97Tyr)	c.290C>A	TCT>TAT	Exón 3	H, K, PN	Francés, Alemán, Americano (IL, TX)	Wallace (1988) J Clin Invest 81, 189
Tyr78Phe (p.Tyr98Phe)	c.293A>T	TAC>TTC	Exón 3	CTS, S, PN	Francés (Italiano)	Magy (2003) Amyloid 10, 29
Ala81Thr (p.Ala101Thr)	c.301 G>A	GCA>ACA	Exón 3	H	Americano	Connors (2003) Amyloid 10, 160
Ala81Val (p.Ala101Val)	c.302C>T	GCA>GTA	Exón 3	H	Ruso, Polaco	Rowczenio (2006) XI International Symposium on Amyloidosis
Gly83Arg (p.Gly103Arg)	c.307G>C	GGC>CGC	Exón 3	E	Chino	Xie Y, Zhao Y, Zhou JJ, Wang X. Identification of a TTR gene mutation in a family with hereditary vitreous amyloidosis Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi. Feb de 2012; 29(1): 13-5.
Ile84Asn (p.Ile104Asn)	c.311T>A	ATC>AAC	Exón 3	CTS, E, H	Americano	Skinner (1992) Ophthalmology 99, 503
Ile84Ser (p.Ile104Ser)	c.311T>G	ATC>AGC	Exón 3	CTS, E, H, LM	Húngaro, Suizo, Americano	Dwulet (1986) J Clin Inv est 78, 880

Nombre (Variante de proteína que incluye el péptido señal de 20 aa)	Variante de Secuencia (ARNm)	Cambio de Codón	Ubicación	Fenotipo Reportado	Grupo Étnico	Referencias
Ile84Thr (p. Ile104Thr)	c.311T>C	ATC>ACC	Exón 3	H, PN	Alemán, Británico	Stangou (1998) Transplantation 66, 229
Glu89Gln (p. Glu109Gln)	c.325G>C	GAG>CAG	Exón 3	CTS, H, PN	Italiano	Almeida (1992) Hum Mutat 1, 211
Glu89Lys (p. Glu109Lys)	c.325G>A	GAG>AAG	Exón 3	AN, H, PN	Americano	Nakamura (2000) Amyloid 7, 46
His90Asn (p. His110Asn)	c.328C>A	CAT>AAT	Exón 3	no amiloidogénico	Alemán, Portugués	Skare (1994) Clin Genet 45, 281
His90Asp (p. His110Asp)	c.328C>G	CAT>GAT	Exón 3		Británico	Rowczenio (2006) XI International Symposium on Amyloidosis
Ala91Ser (p. Ala111Ser)	c.331G>T	GCA>TCA	Exón 3	H AN, CTS, H, PN	Francés	Misrahi (1998) Hum Mutat 12, 71
Gln92Lys (p. Gln112Lys)	c.334G>A	GAG>AAG	Exón 3	H	Japonés	Saito (2001) Hum Pathol 32, 237
Val93Met (p. Val113Met)	c.367G>A	GTG>ATG	Exón 4	PN	Mallense	Lozem (2008) The VII th International Symposium on FAP and Other TTR Related Disorders.
Val94Ala (p. Val114Ala)	c.341T>C	GTA>GCA	Exón 4	AN, H, PN	Alemán, Griego (Chipriota)	Kristen (2007) Amyloid 14(4): 283
Ala97Ser (p. Ala117Ser)	c.349G>T	GCC>TCC	Exón 4	PN, H	Chino, Taiwanés	Tachibana (1999) Amyloid 6, 282
Ala97Gly (p. Ala117Gly)	c.350C>G	GCC>GGC	Exón 4	H, PN	Japonés	Yasuda (1994) J Neurol Sci 121, 97
Gly101Ser (p. Gly121Ser)	c.361G>A	GGC>AGC	Exón 4	no amiloide	Japonés	Kishikawa M et al., (1988) Hum Mutat 12, 363
Pro102Arg (p. Pro122Arg)	c.365C>G	CCC>CGC	Exón 4	no amiloide	Alemán	Altland (1999) The 4th International Symposium on FAP and Other TTR Related Disorders.
Arg103Ser (p. Arg123Ser)	c.367C>A	CGC>AGC	Exón 4		Americano	(2003) Amyloid 10, 160
Arg104Cys (p. Arg124Cys)	c.370C>T	CGC>TGC	Exón 4	H no amiloide,	Americano	Connors Torres (1996) Neuromuscular Disord Vol 6, S21,
Arg104His (p. Arg124His)	c.371G>A	CGC>CAC	Exón 4	no amiloide	Japonés, Americano	Terazaki (1999) Biochem Biophys Res Commun 264, 365
Ile107Val (p. Ile127Val)	c.379A>G	ATT>GTT	Exón 4	CTS, H, PN	Alemán, Americano	Jacobson (1994) Hum Mutat 3, 399
Ile107Phe (p. Ile127Phe)	c.379A>T	ATT>TTT	Exón 4	AN, PN	Británico	Rowczenio (2006) XI International Symposium on Amyloidosis

Nombre (Variante de proteína que incluye el péptido señal de 20 aa)	Variante de Secuencia (ARNm)	Cambio de Codón	Ubicación	Fenotipo Reportado	Grupo Étnico	Referencias
Ile107Met (p. Ile127Met)	c.381T>G	ATT>ATG	Exón 4	H, PN	Alemán	Connors (2003) Amyloid 10, 160
Ala108Ala (p. Ala128Ala)	c.384C>T	GCC>GCT	Exón 4	no amiloidogénico	Portugués	Palha (1997) Amyloid 4,52
Ala109Ser (p. Ala129Ser)	c.385G>T	GCC>TCC	Exón 4	PN	Japonés	Date (1997) J Neurol Sci 150, 143
Ala109Thr (p. Ala129Thr)	c.385G>A	GCC>ACC	Exón 4	no amiloidogénico	Portugués	Moses (1990) J Clin Invest 86, 2025
Ala109Val (p. Ala129Val)	c.386C>T	GCC>GTC	Exón 4	no amiloidogénico	Americano	Izumoto (1993) J Rheumatol 20 188
Leu111Met(p. Leu131Met)	c391C>A	CTG>ATG	Exón 4	CTS, H	Danés	Nordlie (1988) Scand J Immunol 27, 119
Ser112Ile (p. Ser132Ile)	c395G>T	AGC>ATC	Exón 4	H, PN	Italiano	De Lucia (1993) Clin Neuropathol 12, S44
Tyr114His(p. Tyr134His)	c400T>C	TAC>CAC	Exón 4	CTS	Japonés	Murakami (1994) Neurology 44, 315
Tyr114Cys (p. Tyr134Cys)	c401A>G	TAC>TGC	Exón 4	AN, E, H, LM, PN	Japonés	Ueno (1990) BiochemBiophys Res Commun 169, 143
Tyr116Ser (p. Tyr136Ser)	c.407A>C	TAT>TCT	Exón 4	AN, PN, CTS	Francés	Misrahi (1997) Hum Mutat 12, 71
Thr119Met(p. Thr139Met)	c.416C>T	ACG>ATG	Exón 4	no amiloidogénico	Portugués, Americano	Harrison (1991) Am J Med Genet 39,442
Ala120Ser (p. Ala140Ser)	c.418G>T	GCT>TCT	Exón 4	AN, H, PN	Caribeño	Lachmann (2002) N Engl J Med 346, 1786
Val122del (p. Val142del)	c.424_426	del GTC	Exón 4	CNS, CTS, H, PN	Americano (Ecuador/España)	Uemichi (1997) Neurology 48
Val122Ile (p. Val142Ile)	c.424G>A	GTC>ATC	Exón 4	H	Africano, Portugués, Americano	Jacobson (1990) Am J Hum Genet 47, 127
Val122Ala (p. Val142Ala)	c425T>C	GTC>GCC	Exón 4	E, H, PN	Británico, Americano	Theberge (1999) Amyloid 6, 54
Pro125Ser(p. Pro145Ser)	c.433C>T	CCC>TCC	Exón 4	no amiloidogénico	Italiano	Ferlini (1996) Neuromuscular Disord Vol 6, S23,

Significado de las abreviaturas:

AN = neuropatía autónoma; CTS = síndrome del túnel carpiano; E = ojo; H = corazón, K = riñón; L = hígado; LM = leptomeníngeo; N = neuropatía; PN = polineuropatía; CNS = sistema nervioso central

Listado de secuencias

<110> Neurimmune Holding AG

<120> Terapia basada en anticuerpos de la amiloidosis por transtiretina (TTR) y anticuerpos de origen humano para la misma

<130> NE30A43/P-WO

<150> EP 13199251.3

<151> 2013-12-20

<160> 91

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 378

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(378)

<223> Secuencia de cadena pesada variable (VH) de NI-301.59F1

<220>

<221> Región V

<222> (91)..(105)

<223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR1

<220>

<221> Región V

<222> (148)..(195)

<223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR2

<220>

<221> Región V

<222> (292)..(345)

<223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR3

<400> 1

gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggg ttg gtc cag cct ggg ggg	48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	
1 5 10 15	
tcc ctg aga ctc tcc tgt gta gcc tct gga ttc act ttt agt aat tat	96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr	
20 25 30	
tgg atg agt tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtg	144
Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
35 40 45	
gcc aat ata aat caa gat agt gag aaa tac tat gtg gac tct gtg aag	192
Ala Asn Ile Asn Gln Asp Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys	
50 55 60	
ggc cga ttc gcc atc tcc aga gac aac tcc aag aac tca ctg tat ctg	240
Gly Arg Phe Ala Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu	
65 70 75 80	

ES 2 815 527 T3

```

caa atg aac agc ctg aga gtc gag gac acg ggc gtg tat tac tgt gcg      288
Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Ala
      85                      90                      95

aga gat cgc tat tgc agt ggt ggg aga tgc tcc cgg ggt aac aac tgg      336
Arg Asp Arg Tyr Cys Ser Gly Gly Arg Cys Ser Arg Gly Asn Asn Trp
      100                      105                      110

ttc gac ccc tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tcg      378
Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
      115                      120                      125

```

<210> 2
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

```

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
      20                      25                      30

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

Ala Asn Ile Asn Gln Asp Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys
      50                      55                      60

Gly Arg Phe Ala Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
65                      70                      75                      80

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

Arg Asp Arg Tyr Cys Ser Gly Gly Arg Cys Ser Arg Gly Asn Asn Trp
      100                      105                      110

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

```

<210> 3
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(324)
 <223> Secuencia variable de cadena ligera K (VK) de NI-301.59F1

<220>
 <221> Región V
 <222> (70)..(102)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VK-CDR1

<220>
 <221> Región V
 <222> (148)..(168)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VK-CDR2

<220>
 <221> Región V
 <222> (265)..(294)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VK-CDR3

<400> 3

gaa att gtg ttg acg cag tct cca gcc act ctg tct ctg tct cca ggg	48
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly	
1 5 10 15	
gag aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt aga agc aac	96
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Asn	
20 25 30	
tta gcc tgg tac cag cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc atc	144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile	
35 40 45	
tat ggt gca tcc acc agg gcc act gat atc cca gcc agg ttc agt ggc	192
Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Asp Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly	
50 55 60	
agt ggg tct ggg aca gaa ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag tct	240
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser	
65 70 75 80	
gag gat ttt gca gtt tat tac tgt cag caa tat aat aac tgg cct ccg	288
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Pro	
85 90 95	
tac act ttt ggc cag ggg acc aaa gtg gat atc aaa	324
Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys	
100 105	

<210> 4
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly	
1 5 10 15	
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Asn	
20 25 30	
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile	
35 40 45	

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

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

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

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

- 5 <210> 5
<211> 360
<212> ADN
<213> Homo sapiens
- 10 <220>
<221> CDS
<222> (1)..(360)
<223> Secuencia de cadena pesada variable (VH) de NI-301.35G11
- 15 <220>
<221> Región V
<222> (91)..(105)
<223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR1
- 20 <220>
<221> Región V
<222> (148)..(198)
<223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR2
- 25 <220>
<221> Región V
<222> (295)..(327)
<223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR3
- 30 <400> 5

gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gtg cag cct ggg ggg	48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	
1 5 10 15	
tcc ctg aga ctc tcc tgt gta gcc tct gga ttc act ttt agc agc tat	96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr	
20 25 30	
gcc atg agc tgg gtc cgc cag gtt cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtc	144
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
35 40 45	
tca tct att agt ggt agt ggt gat aca aca aaa tac aca gac tcc gtg	192
Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Asp Thr Thr Lys Tyr Thr Asp Ser Val	
50 55 60	
aag ggc cgg ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg gtg ttt	240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Phe	
65 70 75 80	

ES 2 815 527 T3

```

ctg caa atg agc agc ctg aga gcc gag gac acg gcc cta tat tac tgt      288
Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
      85                      90                      95

gtg aaa gat ggt agt gga cgg atc gat cct ttt gct tta tgg ggc caa      336
Val Lys Asp Gly Ser Gly Arg Ile Asp Pro Phe Ala Leu Trp Gly Gln
      100                      105                      110

ggg aca atg gtc acc gtc tct tcg      360
Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
      115                      120

```

<210> 6
 <211> 120
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6

```

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Asp Thr Thr Lys Tyr Thr Asp Ser Val
      50                      55                      60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Phe
65                      70                      75                      80

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

Val Lys Asp Gly Ser Gly Arg Ile Asp Pro Phe Ala Leu Trp Gly Gln
      100                      105                      110

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
10      115                      120

```

<210> 7
 <211> 336
 <212> ADN
 15 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(336)
 20 <223> Secuencia variable de cadena ligera K (VK) de NI-301.35G11

<220>
 <221> Región V
 <222> (70)..(117)
 25 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VK-CDR1

<220>
 <221> Región V
 <222> (163)..(183)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VK-CDR2

5

<220>
 <221> Región V
 <222> (280)..(306)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VK-CDR3

10

<400> 7

gaa att gtg atg aca cag tct cca ctc tcc ctg ccc gtc acc ctt gga	48
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly	
1 5 10 15	
cag ccg gcc tcc atc tcc tgc agg tct agt cgt agt ctc gta tac agt	96
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Ser Leu Val Tyr Ser	
20 25 30	
gat gga aac att tac ttg aat tgg ttt cag cag agg cca ggc caa tct	144
Asp Gly Asn Ile Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser	
35 40 45	
cca agg cgc cta att tat aag gtt tct aac cgg gac tct ggg gtc cca	192
Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Asp Ser Gly Val Pro	
50 55 60	
gac aga ttc agt ggc agt ggg tca gac act gac ttc aca ctg aga atc	240
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile	
65 70 75 80	
agc agg gtg gag gct gag gat gtt ggg gtc tat tac tgc atg cag ggt	288
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly	
85 90 95	
aca cac tgg cct agg acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gag atc aaa	336
Thr His Trp Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
100 105 110	

15 <210> 8
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20 <400> 8

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Ser Leu Val Tyr Ser
20 25 30
Asp Gly Asn Ile Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly
85 90 95

Thr His Trp Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 9

5 <211> 360

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

10 <221> CDS

<222> (1)..(360)

<223> Secuencia de cadena pesada variable (VH) de NI-301.37F1

<220>

15 <221> Región V

<222> (91)..(105)

<223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR1

<220>

20 <221> Región V

<222> (154)..(201)

<223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR2

<220>

25 <221> Región V

<222> (298)..(327)

<223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR3

<400> 9

30

cag gtg cag ctg cag gag tgc ggc cca gga ctg gtg aag cct tcg gag 48
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

acc ctg tcc ctc acc tgc agt gtc tct ggt ggc tcc atc atc agt agg 96
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Ser Gly Gly Ser Ile Ile Ser Arg
20 25 30

agt tcc tac tgg ggc tgg atc cgc cag ccc cca ggg aag ggg ctg gag 144
Ser Ser Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

tgg att ggg ggt atc tat cat agt ggg aac act tac gac aac ccg tcc 192
Trp Ile Gly Gly Ile Tyr His Ser Gly Asn Thr Tyr Asp Asn Pro Ser
50 55 60

ctc aag agt cga ctc acc atg tcc gta gac acg tcg aag aac cag ttc 240
Leu Lys Ser Arg Leu Thr Met Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe

ES 2 815 527 T3

65	70	75	80	
tcc ctg aat ctg agg tct gtg acc gcc gca gac acg gct gtg tat tac				288
Ser Leu Asn Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr				
85		90	95	
tgt gcg agg ata gtg ccg ggg ggt gat gct ttt gat atc tgg ggc caa				336
Cys Ala Arg Ile Val Pro Gly Gly Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln				
100	105	110		
ggg aca atg gtc acc gtc tct tcg				360
Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser				
115	120			

<210> 10
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10

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

<210> 11
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(321)
 <223> Secuencia variable de cadena ligera K (VK) de NI-301.37F1

<220>
 <221> Región V

<222> (70)..(102)
<223> región determinante de complementariedad (CDR) VK-CDR1

<220>

5 <221> Región V
<222> (148)..(168)
<223> región determinante de complementariedad (CDR) VK-CDR2

<220>

10 <221> Región V
<222> (265)..(291)
<223> región determinante de complementariedad (CDR) VK-CDR3

<400> 11

15
gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga 48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
gac aga gtc aca atc gct tgc cgg gcc agt cag agc gtt ggc acc tat 96
Asp Arg Val Thr Ile Ala Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Thr Tyr
20 25 30
tta aat tgg tat cag cag aaa aga ggg aaa gcc cct aaa ctc ctc atc 144
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Arg Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
ttt gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca tca agg ttc agt ggc 192
Phe Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agt ctg caa cct 240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
gaa gac ttt gca act tac tac tgt caa cag agt tac agt tct cct cca 288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Ser Pro Pro
85 90 95
acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gag atc aaa 321
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 12

<211> 107

20 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12

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 Ala Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Thr Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Arg Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
25

ES 2 815 527 T3

35

40

45

Phe Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

<210> 13
<211> 363
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(363)
<223> Secuencia de cadena pesada variable (VH) de NI-301.2F5

<220>
<221> Región V
<222> (91)..(105)
<223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR1

<220>
<221> Región V
<222> (148)..(198)
<223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR2

<220>
<221> Región V
<222> (295)..(330)
<223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR3

<400> 13

gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cgg tct agg agg	48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val Arg Ser Arg Arg	
1 5 10 15	
tcc ctg aga ctc tcc tgt gca acc tct gga ttc acc ttc agt aac tat	96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr	
20 25 30	
gcg atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg	144
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
35 40 45	
gcc att att tca tat gat gga aac aat aaa tac tac gca gac tcc gtg	192
Ala Ile Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val	
50 55 60	
agg ggc cga ttc acc gtc tcc aga gac aat tcc aag aac aca ttc tat	240

ES 2 815 527 T3

Arg	Gly	Arg	Phe	Thr	Val	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Phe	Tyr		
65					70					75					80		
ctg	caa	atg	aac	agc	ctg	aga	att	gag	gac	acg	gct	gta	tat	ttt	tgt		288
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ile	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys		
			85					90						95			
gcg	aga	ggg	agc	ggc	aga	gca	gct	cgt	cac	tgg	ttc	gac	ccc	tgg	ggc		336
Ala	Arg	Gly	Ser	Gly	Arg	Ala	Ala	Arg	His	Trp	Phe	Asp	Pro	Trp	Gly		
			100				105						110				
cag	ggc	acc	ctg	gtc	acc	gtc	tcc	tcg									363
Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser									
			115				120										

<210> 14
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 14

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

<210> 15
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(336)
 <223> Secuencia de cadena ligera variable (VL) de NI-301.2F5

<220>
 <221> Región V

<222> (67)..(108)
<223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR1

<220>

5 <221> Región V

<222> (154)..(174)

<223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR2

<220>

10 <221> Región V

<222> (271)..(306)

<223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR3

<400> 15

15

cag tct gcc ctg act cag cct gcc tcc gtg tct ggg tct cct gga cag	48
Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln	
1 5 10 15	

tcg atc acc atc tcc tgc act gga acc agc agt gac gtt ggt ggt tat	96
Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr	
20 25 30	

aac tat gtc tcc tgg tac caa caa tac cca ggc aaa gcc ccc aaa gtc	144
Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Tyr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val	
35 40 45	

atg att ttt gat gtt ttt aat cgg cct tca ggg gtt tct aat cgc ttc	192
Met Ile Phe Asp Val Phe Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe	
50 55 60	

tct ggc tcc aag tct ggc aac acg gcc tcc ctg acc atc tct gga ctc	240
Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu	
65 70 75 80	

cag gca gag gac gag gct gat tat tac tgc agt tca tat aca agc agc	288
Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Ser	
85 90 95	

gtc act cct cac tgg gtg ttc ggc gga ggg acc aag ctg acc gtc cta	336
Val Thr Pro His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu	
100 105 110	

<210> 16

<211> 112

20 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr	
20 25 30	

25

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

Met Ile Phe Asp Val Phe Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

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

Val Thr Pro His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

5 <210> 17
<211> 381
<212> ADN
<213> Homo sapiens

10 <220>
<221> CDS
<222> (1)..(381)
<223> Secuencia de cadena pesada variable (VH) de NI-301.28B3

15 <220>
<221> Región V
<222> (91)..(111)
<223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR1

20 <220>
<221> Región V
<222> (154)..(201)
<223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR2

25 <220>
<221> Región V
<222> (298)..(348)
<223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR3

30 <400> 17

cag ctg cag ctg cag gag tcg ggc cca gga ctg gtg aag cct tcg gag 48
Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

acc ctg tcc ctc acc tgc act gtc tcc ggt ggc tcc atc act agt agt 96
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Thr Ser Ser
20 25 30

aat ttc tac tgg ggc tgg atc cgc cag ccc cca ggg aag ggg ctg gag 144
Asn Phe Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

tgg att ggg gct att tat tct agt gga aac acc tac tac aac ccg tcc 192
Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Ser Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

ES 2 815 527 T3

ctc aag agt cga gtc acc ata tcc gta gac acg tcc aag aaa aag ttc 240
 Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Lys Lys Phe
 65 70 75 80

tcc ctg aag ctg agc tct gtg acc gcc gct gac acg gct gtc tat tac 288
 Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

tgt gcg aga cac tct tgt agt agt gcc agc tgc tat cct ccc ggt ttc 336
 Cys Ala Arg His Ser Cys Ser Ser Ala Ser Cys Tyr Pro Pro Gly Phe
 100 105 110

tgg ttc gac ccc tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tcg 381
 Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 18

<211> 127

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Thr Ser Ser
 20 25 30

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

Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Ser Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Lys Lys Phe
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg His Ser Cys Ser Ser Ala Ser Cys Tyr Pro Pro Gly Phe
 100 105 110

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

<210> 19

<211> 324

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(324)

<223> Secuencia variable de cadena ligera K (VK) de NI-301.28B3

<220>
 <221> Región V
 <222> (70)..(102)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VK-CDR1

5

<220>
 <221> Región V
 <222> (148)..(168)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VK-CDR2

10

<220>
 <221> Región V
 <222> (265)..(294)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VK-CDR3

15

<400> 19

gaa att gtg atg aca cag tct cca gcc acc ctg tct gcg tct cca ggg	48
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Ala Ser Pro Gly	
1 5 10 15	
gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag act gtt agt tac aac	96
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Thr Val Ser Tyr Asn	
20 25 30	
tta gcc tgg tac cag cag aaa cct ggc cag gct ccc cgg ctc ctc atc	144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile	
35 40 45	
tat ggc gcg tcc acc agg gcc act ggt atc cca ggc agg ttc agt ggc	192
Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Gly Arg Phe Ser Gly	
50 55 60	
agt ggg tct ggg aca gag ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag tct	240
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser	
65 70 75 80	
gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt cag caa tat aat aac tgg cct ccg	288
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Pro	
85 90 95	
tgg acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa	324
Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
100 105	

20

<210> 20
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25

<400> 20

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Thr Val Ser Tyr Asn
20 25 30

ES 2 815 527 T3

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

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

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

- 5 <210> 21
<211> 384
<212> ADN
<213> Homo sapiens
- 10 <220>
<221> CDS
<222> (1)..(384)
<223> Secuencia de cadena pesada variable (VH) de NI-301.119C12
- 15 <220>
<221> Región V
<222> (91)..(111)
<223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR1
- 20 <220>
<221> Región V
<222> (154)..(201)
<223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR2
- 25 <220>
<221> Región V
<222> (298)..(351)
<223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR3
- 30 <400> 21

cag gtg cag ctg cag gag tgc ggc cca aga ctg gtg aag cct tca cag	48
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Arg Leu Val Lys Pro Ser Gln	
1 5 10 15	
acc ctg tcc ctc acc tgc act gtc tct ggt ggc tcc atc agc agt ggt	96
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly	
20 25 30	
gtt tac tac tgg agc tgg atc cgc cag cac cca ggg aag ggc ctg gag	144
Val Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu	
35 40 45	
tgg att gga tat att tct aat act ggg aac acc tac tac aac ccg tcc	192
Trp Ile Gly Tyr Ile Ser Asn Thr Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser	
50 55 60	

ES 2 815 527 T3

ctc aag agt cga gtt acc ata tcg ata gac acc tcc aag aac cag ttc 240
 Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Ile Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80

tcc ctc aac ctg cgc tct gtg act gcc gcg gac acg gcc gac tat ttc 288
 Ser Leu Asn Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Asp Tyr Phe
 85 90 95

tgt gcg aga gag tat tgt agt ggt ggt aat tgc tac tct cgc ttc tac 336
 Cys Ala Arg Glu Tyr Cys Ser Gly Gly Asn Cys Tyr Ser Arg Phe Tyr
 100 105 110

tac tac atg gac gtc tgg ggc aaa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tcg 384
 Tyr Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 22

<211> 128

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
 20 25 30

Val Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Ser Asn Thr Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Ile Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80

Ser Leu Asn Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Asp Tyr Phe
 85 90 95

Cys Ala Arg Glu Tyr Cys Ser Gly Gly Asn Cys Tyr Ser Arg Phe Tyr
 100 105 110

Tyr Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 23

<211> 336

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(336)

<223> Secuencia de cadena ligera variable (VL) de NI-301.119C12

<220>
 <221> Región V
 <222> (67)..(108)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR1

5

<220>
 <221> Región V
 <222> (154)..(174)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR2

10

<220>
 <221> Región V
 <222> (271)..(306)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR3

15

<400> 23

cag tct gtg ctg acg cag ccg ccc tca gtg tct ggg gcc cca ggg cag	48
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln	
1 5 10 15	
agg gtc acc atc tcc tgc act ggg agc agc tcc aac atc ggg gca ggt	96
Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly	
20 25 30	
tat ggt gta cac tgg tac cag caa ctt tca gga aca ccc ccc aaa ctc	144
Tyr Gly Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Ser Gly Thr Pro Pro Lys Leu	
35 40 45	
ctc atc tat gga gac aac aat cgg ccc tca ggg gtc cct gac cga ttc	192
Leu Ile Tyr Gly Asp Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe	
50 55 60	
tct ggc tcc aag tct ggc acc tca gcc tcc ctg gcc atc act ggg ctc	240
Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu	
65 70 75 80	
cag gct gag gat gag gct cat tat tac tgc cag tcc tat gac acc acc	288
Gln Ala Glu Asp Glu Ala His Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Thr Thr	
85 90 95	
ttg agt ggt tgc agg gtg ttc ggc gga ggg acc aag ctg acc gtc cta	336
Leu Ser Gly Ser Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu	
100 105 110	

20

<210> 24
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25

<400> 24

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly
20 25 30

Tyr Gly Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Ser Gly Thr Pro Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Gly Asp Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala His Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Thr Thr
85 90 95

Leu Ser Gly Ser Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

5 <210> 25
<211> 363
<212> ADN
<213> Homo sapiens

10 <220>
<221> CDS
<222> (1)..(363)
<223> Secuencia de cadena pesada variable (VH) de NI-301.5D8

15 <220>
<221> Región V
<222> (91)..(105)
<223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR1

20 <220>
<221> Región V
<222> (148)..(195)
<223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR2

25 <220>
<221> Región V
<222> (292)..(330)
<223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR3

30 <400> 25

cag gtg cag cta cag cag tgg ggc gca gga cgg ttg aag cct tcg gag 48
Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Arg Leu Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

acc ctg tcc ctc acg tgc gct gtc tat ggt ggg tct ttc agt gct tac 96
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Ala Tyr
20 25 30

tac tgg aat tgg atc cgc cag gcc cca ggg aag ggg ctg gag tgg att 144
Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

ggt gaa gtc agt cat ggt ggc agc agc aac tac agc ccg tcc ctc agg 192
Gly Glu Val Ser His Gly Gly Ser Ser Asn Tyr Ser Pro Ser Leu Arg

ES 2 815 527 T3

50	55	60	
ggt cga gtc gcc att tct tta gac acg tcc aag agc cag ttc tcc ctg			240
Gly Arg Val Ala Ile Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Gln Phe Ser Leu			
65	70	75	80
agg ctg aat tct gtg acc gcc gcg gac acg gct gtt tat tac tgt gcg			288
Arg Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala			
	85	90	95
aga ggc agc cct gta gta cta cca ggt gcc aga ttc gac ccc tgg ggc			336
Arg Gly Ser Pro Val Val Leu Pro Gly Ala Arg Phe Asp Pro Trp Gly			
	100	105	110
cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tcg			363
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
	115	120	

<210> 26
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 26

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

<210> 27
 <211> 327
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(327)
 <223> Secuencia de cadena ligera variable (VL) de NI-301.5D8

<220>
 <221> Región V
 <222> (91)..(108)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR1

5

<220>
 <221> Región V
 <222> (154)..(174)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR2

10

<220>
 <221> Región V
 <222> (271)..(297)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR3

15

<400> 27

cag tct gcc ctg act cag cct gcc tcc gtg tct ggg ttt cct gga cag	48
Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Phe Pro Gly Gln	
1 5 10 15	
tcg atc acc atc tcc tgc act gga acc agc agt gat gtt ggg agt tat	96
Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr	
20 25 30	
aac ctt gtc tcc tgg tac caa caa cac cca ggc aaa gcc ccc aaa ctc	144
Asn Leu Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu	
35 40 45	
ttg att tat gag gtc aat aag cgg ccc tca gga gtt tct act cgc ttc	192
Leu Ile Tyr Glu Val Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Thr Arg Phe	
50 55 60	
tct ggc tcc aag tct ggc aac acg gcc tcc ctg acg atc tct ggg ctc	240
Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu	
65 70 75 80	
cag act gag gac gag gct gat tat tac tgc tgc tca tat gca ggt agt	288
Gln Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Cys Ser Tyr Ala Gly Ser	
85 90 95	
act aag gtc ttc gga att ggg acc aag gtc acc gtc cta	327
Thr Lys Val Phe Gly Ile Gly Thr Lys Val Thr Val Leu	
100 105	

20

<210> 28
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25

<400> 28

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

ES 2 815 527 T3

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

- 5 <210> 29
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
- 10 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(372)
 <223> Secuencia de cadena pesada variable (VH) de NI-301.9D5
- 15 <220>
 <221> Región V
 <222> (91)..(111)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR1
- 20 <220>
 <221> Región V
 <222> (154)..(201)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR2
- 25 <220>
 <221> Región V
 <222> (298)..(339)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR3
- 30 <400> 29

cag	gtg	cag	ctg	cag	gag	tcg	ggc	cca	ggc	ctg	gtg	aag	cct	tca	gag	48
Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu	
1			5					10					15			
acc	ctg	tcc	ctc	acc	tgc	att	gtc	tct	ggg	gtc	tcc	atc	aga	agt	ggg	96
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ile	Val	Ser	Gly	Val	Ser	Ile	Arg	Ser	Gly	
			20					25					30			
ggg	tac	tac	tgg	agc	tgg	atc	cgg	cag	cac	cca	ggg	aag	ggc	ctg	gag	144
Gly	Tyr	Tyr	Trp	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	His	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	
			35				40					45				
tgg	gtt	ggg	ttc	atc	tat	tac	act	ggg	aac	acc	tac	tac	aac	ccg	tcc	192

ES 2 815 527 T3

```

Trp Val Gly Phe Ile Tyr Tyr Thr Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
   50                      55                      60

ctc aag agt cga gct acc ata tca gta gac acc tct aag aac cag ttc      240
Leu Lys Ser Arg Ala Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
  65                      70                      75                      80

tcc ctg agg ctg acc gct gtg act gcc gcg gac acg gcc gtg tat tac      288
Ser Leu Arg Leu Thr Ala Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
   85                      90                      95

tgt gcg aga gat tgt agt ggt ggc agc tgc ccc gag tcc tac ttt gac      336
Cys Ala Arg Asp Cys Ser Gly Gly Ser Cys Pro Glu Ser Tyr Phe Asp
  100                      105                      110

tcc tgg ggt cgg ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tcg      372
Ser Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
  115                      120

```

<210> 30
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 30

```

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ile Val Ser Gly Val Ser Ile Arg Ser Gly
   20                      25                      30

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

Trp Val Gly Phe Ile Tyr Tyr Thr Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
   50                      55                      60

Leu Lys Ser Arg Ala Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
  65                      70                      75                      80

Ser Leu Arg Leu Thr Ala Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
   85                      90                      95

Cys Ala Arg Asp Cys Ser Gly Gly Ser Cys Pro Glu Ser Tyr Phe Asp
  100                      105                      110

```

```

Ser Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
  115                      120

```

<210> 31
 <211> 327
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(327)

<223> Secuencia variable de cadena ligera K (VK) de NI-301.9D5

<220>
 <221> Región V
 <222> (70)..(102)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VK-CDR1
 5
 <220>
 <221> Región V
 <222> (148)..(168)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VK-CDR2
 10
 <220>
 <221> Región V
 <222> (268)..(297)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VK-CDR3
 15
 <400> 31

 gaa att gtg atg aca cag tct cca gcc acc ctg tct ttg tct cca ggg 48
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

 gaa aga gcc acc ctc tcc tgt agg gcc agt cag agt gtt cgc agt ttc 96
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Phe
 20 25 30

 tta gcc tgg tac caa cag aaa tct ggc cag gct ccc cga ctc ctc atc 144
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

 tat gat gca tcc aag agg gcc act ggc atc cca gcc agg ttc agt gac 192
 Tyr Asp Ala Ser Lys Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Asp
 50 55 60

 agt ggg tct gga aca gac ttc act ctc acc atc agc aga cta gag act 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Thr
 65 70 75 80

 gaa gac tct gcg gtt tat tac tgt cag cag cgt acc aac tgg cct cca 288
 Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Thr Asn Trp Pro Pro
 85 90 95

 cac ctc act ttc ggc gga ggg acc aag gtg gaa atc aaa 327
 His Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

 20 <210> 32
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 25 <400> 32

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Phe
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 33

5 <211> 357

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

10 <221> CDS

<222> (1)..(357)

<223> Secuencia de cadena pesada variable (VH) de NI-301.104F5

<220>

15 <221> Región V

<222> (91)..(105)

<223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR1

<220>

20 <221> Región V

<222> (148)..(198)

<223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR2

<220>

25 <221> Región V

<222> (295)..(324)

<223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR3

<400> 33

30

cag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct gag agg 48
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Glu Arg
1 5 10 15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcg tct gga ttc acc ttc agg agc tat 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Tyr
20 25 30

ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg 144
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

ES 2 815 527 T3

```

gca gtt ata tgg ttt gat gga agt aat aaa tac tat gca gac tcc gtg      192
Ala Val Ile Trp Phe Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                      55                      60

aag ggc cga ttc acc gtc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat      240
Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
    65                      70                      75                      80

ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gct gtc tac tac tgt      288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                      85                      90                      95

gca aga gat ggt ata gca gcc act tat gcg gac tac tgg ggc cag gga      336
Ala Arg Asp Gly Ile Ala Ala Thr Tyr Ala Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
                      100                      105                      110

acc ctg gtc acc gtc tcc tcg      357
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
                      115

```

<210> 34
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 34

```

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Glu Arg
1                      5                      10                      15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Tyr
                20                      25                      30

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

Ala Val Ile Trp Phe Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                      55                      60

Lys Gly Arg Phe Thr Val 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 Asp Gly Ile Ala Ala Thr Tyr Ala Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
    100                      105                      110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
    115

```

<210> 35
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS

<222> (1)..(321)
<223> Secuencia variable de cadena ligera K (VK) de NI-301.104F5

<220>
5 <221> Región V
<222> (70)..(102)
<223> región determinante de complementariedad (CDR) VK-CDR1

<220>
10 <221> Región V
<222> (148)..(168)
<223> región determinante de complementariedad (CDR) VK-CDR2

<220>
15 <221> Región V
<222> (265)..(291)
<223> región determinante de complementariedad (CDR) VK-CDR3

<400> 35
20

gaa att gtg ttg aca cag tct cca gcc acc ctg tct ttg tct cca ggg Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly 1 5 10 15	48
gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt cgc agc tac Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Tyr 20 25 30	96
tta gcc tgg tac caa caa aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc atc Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile 35 40 45	144
tat ggt gca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gcc agg ttc agt ggc Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly 50 55 60	192
agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agc ctg gag cct Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro 65 70 75 80	240
gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt cag caa cgt agc aac tgg ccg atc Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile 85 90 95	288
acc ttc ggc caa ggg aca cga ctg gag att aaa Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys 100 105	321

<210> 36
<211> 107
25 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 36
30

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 37
<211> 375
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(375)
<223> Secuencia de cadena pesada variable (VH) de NI-301.21F10

<220>
<221> Región V
<222> (91)..(114)
<223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR1

<220>
<221> Región V
<222> (157)..(207)
<223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR2

<220>
<221> Región V
<222> (304)..(342)
<223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR3

<400> 37

cag gtg cag ctg gtg gag tcg ggg gga ggt ttg gtc cag cct ggg ggg 48
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

tcc ttg aga ctg tcc tgt gcg gtc tct gga ttc acc ctt agt agt ctt 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Leu Ser Ser Leu
20 25 30

agt tct tat tac atg agt tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg 144
Ser Ser Tyr Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45

ES 2 815 527 T3

```

gag tgg gtg gcc act ata aac cca ggt gga agt gag aag tcc tat gtg      192
Glu Trp Val Ala Thr Ile Asn Pro Gly Gly Ser Glu Lys Ser Tyr Val
   50                               55                               60

gac tct gtg aag ggc cga ttc acc gtc tcc aga gac aac gcc agg agc      240
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Arg Ser
   65                               70                               75                               80

tca gta tat ttg caa atg gac agc ctg aca gtc gag gac acg gct att      288
Ser Val Tyr Leu Gln Met Asp Ser Leu Thr Val Glu Asp Thr Ala Ile
                               85                               90                               95

tat tac tgt gcg aga cca aga tat tgc act agt ggt ggt tgc tat ttt      336
Tyr Tyr Cys Ala Arg Pro Arg Tyr Cys Thr Ser Gly Gly Cys Tyr Phe
                               100                               105                               110

gac aac tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tcg      375
Asp Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
   115                               120                               125

```

<210> 38
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 38

```

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Leu Ser Ser Leu
                               20                               25                               30

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

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

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Arg Ser
   65                               70                               75                               80

Ser Val Tyr Leu Gln Met Asp Ser Leu Thr Val Glu Asp Thr Ala Ile
                               85                               90                               95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Pro Arg Tyr Cys Thr Ser Gly Gly Cys Tyr Phe
   100                               105                               110

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

```

<210> 39
 <211> 327
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS

<222> (1)..(327)

<223> Secuencia de cadena ligera variable (VL) de NI-301.21F10

<220>

5 <221> Región V

<222> (67)..(108)

<223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR1

<220>

10 <221> Región V

<222> (154)..(174)

<223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR2

<220>

15 <221> Región V

<222> (271)..(297)

<223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR3

<400> 39

20

cag tct gcc ctg act cag cct cgc tca gtg tcc ggg tct cct gga cag	48
Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Arg Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln	
1 5 10 15	
tca gtc acc atc tcc tgc act gca acc aat agt gat gtt ggc gat tat	96
Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Ala Thr Asn Ser Asp Val Gly Asp Tyr	
20 25 30	
aag tct gtc tcc tgg tac caa caa cac cca ggc aaa gcc ccc aaa ctc	144
Lys Ser Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu	
35 40 45	
atg att tat gat gtc ggt agg cgg ccc tca ggg gtc cct gat cgc ttc	192
Met Ile Tyr Asp Val Gly Arg Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe	
50 55 60	
tct ggc tcc aaa tct gac aac acg gcc ttc ctg acc atc tct ggg ctc	240
Ser Gly Ser Lys Ser Asp Asn Thr Ala Phe Leu Thr Ile Ser Gly Leu	
65 70 75 80	
cag act gag gat gaa gct gat tac ttt tgc tgt ata tat gta ggc agg	288
Gln Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Cys Ile Tyr Val Gly Arg	
85 90 95	
tct tcg gtg ttc ggc gga ggg acc aag ttg acc gtc ctg	327
Ser Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu	
100 105	

<210> 40

<211> 109

25 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

30

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

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

Lys Ser Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Gly Arg Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Asp Asn Thr Ala Phe Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Cys Ile Tyr Val Gly Arg
85 90 95

Ser Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 41
<211> 372
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(372)
<223> Secuencia de cadena pesada variable (VH) de NI-301.9G12

<220>
<221> Región V
<222> (91)..(108)
<223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR1

<220>
<221> Región V
<222> (151)..(198)
<223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR2

<220>
<221> Región V
<222> (295)..(339)
<223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR3

<400> 41

cag gtg cag ctg cag gag tcg ggc cca gga ctg gtg aag cct tcg gag	48
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu	
1 5 10 15	
acc ctg tcc ctc acc tgc gct gtc tct ggt ttc tcc atc agc agt ggt	96
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Phe Ser Ile Ser Ser Gly	
20 25 30	
tac tac tgg ggc tgg atc cgg cag ccc cca ggg acg ggg ctg gag tgg	144
Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Thr Gly Leu Glu Trp	

ES 2 815 527 T3

35	40	45	
att ggg agt atg tat cat agt ggg agg acc tac tac aac ccg tcc ctc			192
Ile Gly Ser Met Tyr His Ser Gly Arg Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu			
50	55	60	
aag agt cga gtc acc ata tca gta gac acg tcc aag aac cag ttg tcc			240
Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Leu Ser			
65	70	75	80
ctg aag ctg agc tct gtg acc gcc gca gac acg gcc gtg tat tac tgt			288
Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
85	90	95	
gcg agg ggc ttc gat act agt ggt tcc cat cgg ccc ctc tcg act gac			336
Ala Arg Gly Phe Asp Thr Ser Gly Ser His Arg Pro Leu Ser Thr Asp			
100	105	110	
tac tgg ggc cag ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tcg			372
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
115	120		

<210> 42
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 42

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

<210> 43
 <211> 330
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(330)
 <223> Secuencia de cadena ligera variable (VL) de NI-301.9G12

5

<220>
 <221> Región V
 <222> (67)..(105)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR1

10

<220>
 <221> Región V
 <222> (151)..(171)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR2

15

<220>
 <221> Región V
 <222> (268)..(300)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR3

20

<400> 43

cag tct gtg ttg acg cag ccg ccc tca gtg tct gcg gcc cca gga cag	48
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln	
1 5 10 15	
aag gtc acc atc tcc tgc tct gga agc agc tcc aac att ggg aat aat	96
Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn	
20 25 30	
tat gta tcc tgg tac cag cag ctc cca gga aca gcc ccc aaa ctc ctc	144
Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu	
35 40 45	
att tat gac aat aat aag cga ccc tca ggg att cct gac cga atc tct	192
Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Ile Ser	
50 55 60	
ggc tcc aag tct ggc acg tca gcc acc ctg ggc atc acc gga ctc cag	240
Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln	
65 70 75 80	
act ggg gac gag gcc gat tat tac tgc gga acc tgg gat agc agc ctg	288
Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu	
85 90 95	
agt gct tat gtc ttc gga act ggg acc aag gtc acc gtc cta	330
Ser Ala Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu	
100 105 110	

25

<210> 44
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30

<400> 44

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln

ES 2 815 527 T3

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

5 <210> 45
 <211> 357
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(357)
 <223> Secuencia de cadena pesada variable (VH) de NI-301.12D3

15 <220>
 <221> Región V
 <222> (91)..(105)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR1

20 <220>
 <221> Región V
 <222> (148)..(198)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR2

25 <220>
 <221> Región V
 <222> (295)..(324)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR3

30 <400> 45

gag gtg cag ctg gtg gag act ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg	48
Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg	
1 5 10 15	
tcc ctg aga ctc tcc tgt gta gcg tct gga ttc acc ttc agg aac tat	96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Asn Tyr	
20 25 30	
ggc atg cac tgg gtc cgc cgg gcc cca ggc agg ggg ctg gag tgg gta	144

ES 2 815 527 T3

Gly Met His Trp Val Arg Arg Ala Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val	
35 40 45	
gca gtt ata tgg tct gat gga agt gat aaa tac tat gca gac tcc gtg	192
Ala Val Ile Trp Ser Asp Gly Ser Asp Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val	
50 55 60	
gag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg gtg ttt	240
Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Phe	
65 70 75 80	
ctc caa atg aac agc ctg aga gcc gac gac acg gct gta tac ttc tgt	288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys	
85 90 95	
gcg aga gag ccg agc agc acc tgg gct ttt gac tac tgg ggc cag gga	336
Ala Arg Glu Pro Ser Ser Thr Trp Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly	
100 105 110	
acc ctg gtc acc gtc tcc tcg	357
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
115	

<210> 46
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 46

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

<210> 47
 <211> 330
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(330)
 <223> Secuencia de cadena ligera variable (VL) de NI-301.12D3

5

<220>
 <221> Región V
 <222> (67)..(108)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR1

10

<220>
 <221> Región V
 <222> (154)..(174)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR2

15

<220>
 <221> Región V
 <222> (271)..(300)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR3

20

<400> 47

cag tct gcc ctg act cag cct gcc tcc gtg tct ggg tct cct gga cag	48
Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln	
1 5 10 15	
tcg atc acc atc tcc tgc act gga acc agc agt gat gtt ggg ggt tat	96
Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr	
20 25 30	
aac ctt gtc tcc tgg tac caa cag cac cca ggc aaa gcc ccc aaa ctc	144
Asn Leu Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu	
35 40 45	
atg att tat gag gac att aag ggg ccc tca ggg gtt tct aat cgc ttc	192
Met Ile Tyr Glu Asp Ile Lys Gly Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe	
50 55 60	
tct ggc tcc aag tct ggc aac acg gcc tcc ctg aca atc tct ggg ctc	240
Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu	
65 70 75 80	
cag gct gag gac gag gct gat tat ttc tgc tgc tca tat gca ggt act	288
Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Cys Ser Tyr Ala Gly Thr	
85 90 95	
ggc act ctg gta ttc ggc gga ggg acc aag ctg acc gtc cta	330
Gly Thr Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu	
100 105 110	

25

<210> 48
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30

<400> 48

ES 2 815 527 T3

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr
20 25 30

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

Met Ile Tyr Glu Asp Ile Lys Gly Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

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

Gly Thr Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 49

<211> 9

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Epítopo reconocido por el anticuerpo NI-301.59F1

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(9)

15 <223> Epítopo del anticuerpo NI-301.59F1, aa 61 hasta aa 69

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(9)

20 <223> Epítopo del anticuerpo NI-301.59F1, aa 61 hasta aa 69

<400> 49

Glu Glu Glu Phe Val Glu Gly Ile Tyr
1 5

25 <210> 50

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> Epítopo reconocido por el anticuerpo NI-301.35G11

<220>

<221> PÉPTIDO

35 <222> (1)..(11)

<223> Epítopo del anticuerpo NI-301.35G11, aa 53 hasta aa 63

<400> 50

ES 2 815 527 T3

		Gly	Glu	Leu	His	Gly	Leu	Thr	Thr	Glu	Glu	Glu	
		1				5					10		

5 <210> 51
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Epítopo reconocido por el anticuerpo NI-301.37F1

15 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(5)
 <223> Epítopo del anticuerpo NI-301.37F1, aa 41 hasta aa 45

<400> 51

				Trp	Glu	Pro	Phe	Ala	
				1				5	

20 <210> 52
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

25 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(360)
 <223> Secuencia de cadena pesada variable (VH) de NI-301.37F1-PIMC después de la corrección de mutaciones inducidas por cebadores

30 <220>
 <221> Región V
 <222> (91)..(105)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR1

35 <220>
 <221> Región V
 <222> (154)..(201)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR2

40 <220>
 <221> Región V
 <222> (298)..(327)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR3

45 <400> 52

cag	ctg	cag	ctg	cag	gag	tcg	ggc	cca	gga	ctg	gtg	aag	cct	tcg	gag	48
Gln	Leu	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu	
1				5					10					15		

acc	ctg	tcc	ctc	acc	tgc	agt	gtc	tct	ggg	ggc	tcc	atc	atc	agt	agg	96
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	----

ES 2 815 527 T3

```

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Ser Gly Gly Ser Ile Ile Ser Arg
    20                      25                      30

agt tcc tac tgg ggc tgg atc cgc cag ccc cca ggg aag ggg ctg gag    144
Ser Ser Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
    35                      40                      45

tgg att ggg ggt atc tat cat agt ggg aac act tac gac aac ccg tcc    192
Trp Ile Gly Gly Ile Tyr His Ser Gly Asn Thr Tyr Asp Asn Pro Ser
    50                      55                      60

ctc aag agt cga ctc acc atg tcc gta gac acg tcg aag aac cag ttc    240
Leu Lys Ser Arg Leu Thr Met Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
    65                      70                      75                      80

tcc ctg aat ctg agg tct gtg acc gcc gca gac acg gct gtg tat tac    288
Ser Leu Asn Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
    85                      90                      95

tgt gcg agg ata gtg ccg ggg ggt gat gct ttt gat atc tgg ggc caa    336
Cys Ala Arg Ile Val Pro Gly Gly Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln
    100                      105                      110

ggg aca atg gtc acc gtc tct tcg    360
Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
    115                      120

```

<210> 53
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 53

```

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Ser Gly Gly Ser Ile Ile Ser Arg
    20                      25                      30

Ser Ser Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
    35                      40                      45

Trp Ile Gly Gly Ile Tyr His Ser Gly Asn Thr Tyr Asp Asn Pro Ser
    50                      55                      60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Met Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
    65                      70                      75                      80

Ser Leu Asn Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
    85                      90                      95

Cys Ala Arg Ile Val Pro Gly Gly Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln
    100                      105                      110

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
    115                      120

```

<210> 54
 <211> 360

<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
5 <221> CDS
<222> (1)..(360)
<223> Secuencia de cadena pesada variable (VH) de NI-301.44E4 VH

<220>
10 <221> Región V
<222> (91)..(105)
<223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR1

<220>
15 <221> Región V
<222> (148)..(198)
<223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR2

<220>
20 <221> Región V
<222> (295)..(327)
<223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR3

<400> 54
25

gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag ccg ggg ggg	48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	
1 5 10 15	
tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttt agc agc tat	96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr	
20 25 30	
gcc atg atc tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtc	144
Ala Met Ile Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
35 40 45	
tca ggt att agt ggc agt ggc agt acg aca tac tac gca gac tcc gtg	192
Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val	
50 55 60	
aag ggc cgg ttc gcc atc tcc aga gac aaa tcc aag aac acg ctg tcc	240
Lys Gly Arg Phe Ala Ile Ser Arg Asp Lys Ser Lys Asn Thr Leu Ser	
65 70 75 80	
cta caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gcc gta tat tac tgt	288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
85 90 95	
gca aaa ggg gca tgg gag ata ccc acc tac ttt gac aac tgg ggc cag	336
Ala Lys Gly Ala Trp Glu Ile Pro Thr Tyr Phe Asp Asn Trp Gly Gln	
100 105 110	
gga acc ctg gtc acc gtc tcc tcg	360
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
115 120	

<210> 55
<211> 120
30 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 55

ES 2 815 527 T3

Glu	Val	Gln	Leu	Val	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	Ile	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val		
		35					40					45					
Ser	Gly	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Thr	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val		
	50					55					60						
Lys	Gly	Arg	Phe	Ala	Ile	Ser	Arg	Asp	Lys	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Ser		
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	Gly	Ala	Trp	Glu	Ile	Pro	Thr	Tyr	Phe	Asp	Asn	Trp	Gly	Gln		
			100					105					110				
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser										
		115					120										

- <210> 56
- 5 <211> 327
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens
- <220>
- 10 <221> CDS
- <222> (1)..(327)
- <223> Secuencia variable de cadena ligera kappa (VK) de NI-301.44E4 VK
- <220>
- 15 <221> Región V
- <222> (70)..(102)
- <223> región determinante de complementariedad (CDR) VK-CDR1
- <220>
- 20 <221> Región V
- <222> (148)..(168)
- <223> región determinante de complementariedad (CDR) VK-CDR2
- <220>
- 25 <221> Región V
- <222> (265)..(297)
- <223> región determinante de complementariedad (CDR) VK-CDR3
- <400> 56

ES 2 815 527 T3

```

gaa att gtg ctg act cag tct cca gcc acc ctg tct gtg tct cca ggg      48
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1           5           10           15

gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt att agg aac aac      96
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Arg Asn Asn
           20           25           30

tta gcc tgg tac cag cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc atc     144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
           35           40           45

tat ggt gca tcc acc agg gcc act ggt atc cca gcc agg ttc agt ggc     192
Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
           50           55           60

act ggg tct ggg aca gag ttc act ctc atc gtc agc agc ctg cag tct     240
Thr Gly Ser Gly Thr Val Gln Phe Thr Leu Ile Val Ser Ser Leu Gln Ser
65           70           75           80

gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt cag cag tat aat aac tgg cct ccc     288
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Pro
           85           90           95

acg tgg acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa                 327
Thr Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
           100           105

```

<210> 57
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 57

```

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

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

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

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

Thr Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Ile Val Ser Ser Leu Gln Ser
65           70           75           80

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

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

```

<210> 58
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Epítipo del anticuerpo NI-301.59F1 59F1, aa 62 hasta aa 69 después de la exploración con alanina

5 <220>
 <221> característica miscelánea

<222> (4)..(4)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

10 <400> 58

Glu Glu Phe Xaa Glu Gly Ile Tyr
 1 5

15 <210> 59
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Epítipo del anticuerpo NI-301.35G11, aa 54 hasta aa 61 después de la exploración con alanina

<220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (3)..(3)
 25 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (7)..(7)
 30 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 59

Glu Leu Xaa Gly Leu Thr Xaa Glu
 1 5

35 <210> 60
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Epítipo del anticuerpo NI-301.37F1, aa 41 hasta aa 45 después de la exploración con alanina

<400> 60

45

Trp Glu Pro Phe Ala
 1 5

50 <210> 61
 <211> 375
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

55 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(375)
 <223> Secuencia de cadena pesada variable (VH) de NI-301.18C4 VH

60 <220>
 <221> Región V
 <222> (91)..(105)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR1

<220>

<221> Región V

<222> (148)..(198)

<223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR2

5

<220>

<221> Región V

<222> (295)..(342)

<223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR3

10

<400> 61

gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga acc ttg gtc cag ccg ggg ggg	48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Thr Leu Val Gln Pro Gly Gly	
1 5 10 15	
tcc ctg agg ctc tcc tgc gca gcg tcg gga ttc aca ttc aac att tat	96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Ile Tyr	
20 25 30	
gcc atg acc tgg gtc cgc ctg tct cca gtg agg gga ctg gag tgg gtc	144
Ala Met Thr Trp Val Arg Leu Ser Pro Val Arg Gly Leu Glu Trp Val	
35 40 45	
tct act att act agt ggt ggc gtc agc ata tat tac gca gac tcc ata	192
Ser Thr Ile Thr Ser Gly Gly Val Ser Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Ile	
50 55 60	
aag ggc cgc ttc acc gtc tcc aga gac aat gcc aag aac atg gtg ttt	240
Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Met Val Phe	
65 70 75 80	
cta caa ctg gac aac ctg aca gtc gat gac acg gcc ata tat tac tgt	288
Leu Gln Leu Asp Asn Leu Thr Val Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys	
85 90 95	
ggg aag gac gga aac tgc gat gag aca agt tgt tac tta agg ggg atg	336
Gly Lys Asp Gly Asn Cys Asp Glu Thr Ser Cys Tyr Leu Arg Gly Met	
100 105 110	
gac gtc tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tcg	375
Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser	
115 120 125	

15 <210> 62

<211> 125

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20 <400> 62

ES 2 815 527 T3

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Thr	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly		
1				5					10					15			
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Asn	Ile	Tyr		
			20					25					30				
Ala	Met	Thr	Trp	Val	Arg	Leu	Ser	Pro	Val	Arg	Gly	Leu	Glu	Trp	Val		
		35					40					45					
Ser	Thr	Ile	Thr	Ser	Gly	Gly	Val	Ser	Ile	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Ile		
	50					55					60						
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Val	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Met	Val	Phe		
65					70					75					80		
Leu	Gln	Leu	Asp	Asn	Leu	Thr	Val	Asp	Asp	Thr	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Cys		
				85					90					95			
Gly	Lys	Asp	Gly	Asn	Cys	Asp	Glu	Thr	Ser	Cys	Tyr	Leu	Arg	Gly	Met		
			100					105					110				
Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser					
		115					120					125					

- 5 <210> 63
- <211> 333
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens
- 10 <220>
- <221> CDS
- <222> (1)..(333)
- <223> Secuencia de cadena ligera variable (VL) de NI-301.18C4 VL
- 15 <220>
- <221> Región V
- <222> (67)..(105)
- <223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR1
- 20 <220>
- <221> Región V
- <222> (151)..(171)
- <223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR2
- 25 <220>
- <221> Región V
- <222> (268)..(303)
- <223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR3
- <400> 63

ES 2 815 527 T3

```

cag tct gtg ttg acg cag ccg ccc tca gtg tca gcg gcc cca gga cag      48
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln
1          5          10          15

aag gtc acc atc tcc tgc tct ggt agc agg tcc gac att ggg tct aaa      96
Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Arg Ser Asp Ile Gly Ser Lys
          20          25          30

ctt gtt tcc tgg tac cag gta atc cca gga aga gcc ccc cgg ctc gtc      144
Leu Val Ser Trp Tyr Gln Val Ile Pro Gly Arg Ala Pro Arg Leu Val
          35          40          45

att ttt gac act tat aag cgg ccc tca ggg gta cct gcc cgc ttc tct      192
Ile Phe Asp Thr Tyr Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
          50          55          60

gcc tcc aag tct ggc acg tca gcc acc ctg gac atc gcc ggg ctc cag      240
Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Asp Ile Ala Gly Leu Gln
65          70          75          80

cct ggg gac gag gcc gaa tat ttc tgc gga tca tgg ggt aac agt gag      288
Pro Gly Asp Glu Ala Glu Tyr Phe Cys Gly Ser Trp Gly Asn Ser Glu
          85          90          95

aat ttt tat tat gtc ttc gga tct ggg acc cgg gtc acc gtc ctg      333
Asn Phe Tyr Tyr Val Phe Gly Ser Gly Thr Arg Val Thr Val Leu
          100          105          110

```

<210> 64
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 64

```

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

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Arg Ser Asp Ile Gly Ser Lys
          20          25          30

Leu Val Ser Trp Tyr Gln Val Ile Pro Gly Arg Ala Pro Arg Leu Val
          35          40          45

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

Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Asp Ile Ala Gly Leu Gln
65          70          75          80

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

Asn Phe Tyr Tyr Val Phe Gly Ser Gly Thr Arg Val Thr Val Leu
          100          105          110

```

<210> 65
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(354)
 <223> Secuencia de cadena pesada variable (VH) de NI-301.11A10 (PIMC por omisión)

5

<220>
 <221> Región V
 <222> (91)..(105)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR1

10

<220>
 <221> Región V
 <222> (154)..(201)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR2

15

<220>
 <221> Región V
 <222> (298)..(321)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR3

20

<400> 65

cag ctg cag ctg cag gag tgc ggc cca gga ctg gtg aag cct tgc gag	48
Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu	
1 5 10 15	
acc ctg tcc ctc acc tgc act gtg tct ggt ggc tcc atc agc agt aga	96
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Arg	
20 25 30	
agt tac tac tgg ggc tgg atg cgc cag ccc cca ggg aag ggg ctg gag	144
Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Met Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu	
35 40 45	
tgg att ggg agt att tat tat agt ggg agc acc ctc tac aat ccg tcc	192
Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Tyr Asn Pro Ser	
50 55 60	
ctc aag agt cga gtc acc atg tca ata gtc acg tgc agg aac cag ttc	240
Leu Lys Ser Arg Val Thr Met Ser Ile Val Thr Ser Arg Asn Gln Phe	
65 70 75 80	
tcc ctg aag ctg agt tct gtg acc gcc gcg gac acg gcc gtg tat tat	288
Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr	
85 90 95	
tgt acc cga atg ggg gag ggg ggg cgg gac tac tgg ggc cag gga acc	336
Cys Thr Arg Met Gly Glu Gly Gly Arg Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr	
100 105 110	
ctg gtc acc gtc tcc tgc	354
Leu Val Thr Val Ser Ser	
115	

25

<210> 66
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30

<400> 66

ES 2 815 527 T3

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Arg
20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Met Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Met Ser Ile Val Thr Ser Arg Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

- 5 <210> 67
<211> 321
<212> ADN
<213> Homo sapiens
- 10 <220>
<221> CDS
<222> (1)..(321)
<223> Secuencia variable de cadena ligera K (VK) de NI-301.11A10
- 15 <220>
<221> Región V
<222> (70)..(102)
<223> región determinante de complementariedad (CDR) VK-CDR1
- 20 <220>
<221> Región V
<222> (148)..(168)
<223> región determinante de complementariedad (CDR) VK-CDR2
- 25 <220>
<221> Región V
<222> (265)..(291)
<223> región determinante de complementariedad (CDR) VK-CDR3
- <400> 67

ES 2 815 527 T3

```

gac atc cag atg acc cag tct cct tcc acc ctg tct gca tct gta gga      48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15

gac aga gtc acc atc act tgc cgg gcc agt cag agt att agt agt tgg      96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp
           20           25           30

ttg gcc tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag gtc ctg atc      144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
           35           40           45

tat gat gcc tcc agt ttg gaa aga ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc      192
Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Arg Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
           50           55           60

agt ggg tct ggg aca gaa ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag cct      240
Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80

gat gat tct gca act tat tac tgc caa cac tat aat ggt tat tca agg      288
Asp Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Asn Gly Tyr Ser Arg
           85           90           95

acg ttc ggc cgc ggg acc aag gtg gaa atc aaa      321
Thr Phe Gly Arg Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
           100           105

```

<210> 68
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 68

```

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

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

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

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Arg Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
           50           55           60

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

Asp Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Asn Gly Tyr Ser Arg
           85           90           95

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

```

<210> 69
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(372)
 <223> Secuencia de cadena pesada variable (VH) de NI-301.3C9 (PIMC por omisión)

5

<220>
 <221> Región V
 <222> (91)..(111)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR1

10

<220>
 <221> Región V
 <222> (154)..(201)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR2

15

<220>
 <221> Región V
 <222> (298)..(339)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR3

20

<400> 69

cag	gtg	cag	ctg	cag	gag	tcg	ggc	cca	gga	ctg	gtg	aag	tct	tcg	cag	48
Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Ser	Ser	Gln	
1				5					10					15		
acc	ctg	tcc	ctc	acc	tgc	act	gtc	tct	ggg	gcc	tcc	ttc	acc	agg	ggg	96
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Ala	Ser	Phe	Thr	Arg	Gly	
			20					25				30				
gat	ttc	tac	tgg	agt	tgg	atc	cgc	cag	gtc	cca	ggg	aag	ggc	ctg	gaa	144
Asp	Phe	Tyr	Trp	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Val	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	
		35				40						45				
tgg	att	ggg	tac	ata	tat	tcc	act	ggg	gac	gtc	tac	tac	aat	ccg	tct	192
Trp	Ile	Gly	Tyr	Ile	Tyr	Ser	Thr	Gly	Asp	Val	Tyr	Tyr	Asn	Pro	Ser	
	50					55					60					
ctc	aag	agt	cga	gca	aac	atc	tcg	gtc	gac	acg	ccc	aag	aag	cag	ttc	240
Leu	Lys	Ser	Arg	Ala	Asn	Ile	Ser	Val	Asp	Thr	Pro	Lys	Lys	Gln	Phe	
65					70				75					80		
ttc	ctg	aaa	ttg	acc	tct	ttg	act	gcc	gca	gac	acg	gcc	gtc	tat	ttt	288
Phe	Leu	Lys	Leu	Thr	Ser	Leu	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Phe	
			85					90					95			
tgt	gcc	agg	gaa	gga	caa	tat	tgt	agc	ggg	ggg	agt	tgc	tac	cct	gaa	336
Cys	Ala	Arg	Glu	Gly	Gln	Tyr	Cys	Ser	Gly	Gly	Ser	Cys	Tyr	Pro	Glu	
			100					105				110				
tac	tgg	ggc	cag	gga	acc	ctg	gtc	acc	gtc	tcc	tcg					372
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser					
		115					120									

25

<210> 70
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30

<400> 70

ES 2 815 527 T3

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ala Ser Phe Thr Arg Gly
20 25 30

Asp Phe Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Ser Thr Gly Asp Val Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Ala Asn Ile Ser Val Asp Thr Pro Lys Lys Gln Phe
65 70 75 80

Phe Leu Lys Leu Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Phe
85 90 95

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

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

- 5 <210> 71
<211> 318
<212> ADN
<213> Homo sapiens
- 10 <220>
<221> CDS
<222> (1)..(318)
<223> Secuencia de cadena ligera variable (VL) de NI-301.3C9 (PIMC por omisión)
- 15 <220>
<221> Región V
<222> (67)..(99)
<223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR1
- 20 <220>
<221> Región V
<222> (145)..(165)
<223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR2
- 25 <220>
<221> Región V
<222> (262)..(288)
<223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR3
- <400> 71

ES 2 815 527 T3

```

tcc tat gag ctg act cag cca ccc tca gtg tcc gtg tcc cca gga cag      48
Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1          5          10          15

aca gcc acc atc acc tgc tct gga gat aat ttg gga cat aaa ttt act      96
Thr Ala Thr Ile Thr Cys Ser Gly Asp Asn Leu Gly His Lys Phe Thr
          20          25          30

tgc tgg tat cag cag aag cca ggc cag tcc cct gtc ctg gtc atc tat      144
Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
          35          40          45

caa gat cac aag cgg ccc tca ggg atc cct gag cga ttc tcc ggc tcc      192
Gln Asp His Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
          50          55          60

aac tct ggg gac aca gcc act ctg acc atc agc ggg acc cag gct atg      240
Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
          65          70          75          80

gat gag gct gag tat tac tgt cag gcg tgg gcc ttc ccc tat gtg gtc      288
Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Ala Phe Pro Tyr Val Val
          85          90          95

ttc ggc gga ggg acc aag ctg acc gtc cta      318
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
          100          105

```

<210> 72
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 72

```

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

Thr Ala Thr Ile Thr Cys Ser Gly Asp Asn Leu Gly His Lys Phe Thr
          20          25          30

Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
          35          40          45

Gln Asp His Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
          50          55          60

Asn Ser Gly Asp Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
          65          70          75          80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
          100          105

```

<210> 73
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(372)
 <223> Secuencia de cadena pesada variable (VH) de NI-301.14D8 (no PIMC)

5

<220>
 <221> Región V
 <222> (91)..(105)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR1

10

<220>
 <221> Región V
 <222> (148)..(198)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR2

15

<220>
 <221> Región V
 <222> (295)..(339)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR3

20

<400> 73

gag gtg cag ctg gtg gag act ggg gga cgc ttg gtc cag ccg ggg ggg	48
Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Arg Leu Val Gln Pro Gly Gly	
1 5 10 15	
tcc gtg aga ctc tcc tgt ata gcc tct gga ttt ccc ttt agg aat tat	96
Ser Val Arg Leu Ser Cys Ile Ala Ser Gly Phe Pro Phe Arg Asn Tyr	
20 25 30	
tgg atg agt tgg gtc cgc cag cct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtg	144
Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
35 40 45	
gcc aac ata aag gaa gat ggc agt gac aga tac tat gtg gac tct gtg	192
Ala Asn Ile Lys Glu Asp Gly Ser Asp Arg Tyr Tyr Val Asp Ser Val	
50 55 60	
aag ggc cgc ttc acc atc ttt aga gac aac gcc aag aat ttt ctg agt	240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Phe Arg Asp Asn Ala Lys Asn Phe Leu Ser	
65 70 75 80	
cta caa atg aat cgc ctg aga gcc gag gac acg gcg gta tac ttc tgt	288
Leu Gln Met Asn Arg Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys	
85 90 95	
gcg aga att gta ggg gta atc ccg tcc gct gac cca tac tac ctt gac	336
Ala Arg Ile Val Gly Val Ile Pro Ser Ala Asp Pro Tyr Tyr Leu Asp	
100 105 110	
tcc tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tcg	372
Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	

25

115 120

<210> 74
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30

<400> 74

ES 2 815 527 T3

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

- 5 <210> 75
- <211> 330
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens
- 10 <220>
- <221> CDS
- <222> (1)..(330)
- <223> Secuencia de cadena ligera variable (VL) de NI-301.14D8 (PIMC por omisión)
- 15 <220>
- <221> Región V
- <222> (67)..(108)
- <223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR1
- 20 <220>
- <221> Región V
- <222> (154)..(174)
- <223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR2
- 25 <220>
- <221> Región V
- <222> (271)..(300)
- <223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR3
- <400> 75

ES 2 815 527 T3

```

cag tct gcc ctg act cag cct gcc tcc gtg tct ggg ttt gct gga cag      48
Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Phe Ala Gly Gln
1          5          10          15

tcg gtc acc atc tcc tgc act gga acc agc ctt aac att ggg act tac      96
Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Leu Asn Ile Gly Thr Tyr
          20          25          30

aac ctt atc tcc tgg tac caa caa cac cca ggc aga gcc ccc aga ctc      144
Asn Leu Ile Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Arg Ala Pro Arg Leu
          35          40          45

atc att ttt gag ggc aat agg cgg ccc ccc ggg att tct aat cgc ttc      192
Ile Ile Phe Glu Gly Asn Arg Arg Pro Pro Gly Ile Ser Asn Arg Phe
          50          55          60

tct gcc tcc aag tct ggc aac acg gcc tcc ttg aca gtc tct ggg ctg      240
Ser Ala Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu
65          70          75          80

ctg gct ggc gac gag gct gat tat tac tgt tgc tca ttt gca gga aga      288
Leu Ala Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Cys Ser Phe Ala Gly Arg
          85          90          95

gtc tct ttg gtg ttt ggc gga ggg acc aag ttg acc gtc cta      330
Val Ser Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
          100          105          110

```

<210> 76
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 76

```

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

Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Leu Asn Ile Gly Thr Tyr
          20          25          30

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

Ile Ile Phe Glu Gly Asn Arg Arg Pro Pro Gly Ile Ser Asn Arg Phe
          50          55          60

Ser Ala Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu
65          70          75          80

Leu Ala Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Cys Ser Phe Ala Gly Arg
          85          90          95

Val Ser Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
          100          105          110

```

<210> 77
 <211> 348
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(348)
 <223> Secuencia de cadena pesada variable (VH) de NI-301.9X4 (PIMC por omisión)

5

<220>
 <221> Región V
 <222> (91)..(105)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR1

10

<220>
 <221> Región V
 <222> (148)..(195)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR2

15

<220>
 <221> Región V
 <222> (292)..(315)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR3

20

<400> 77

cag gtg cag ctg cag gag tcg ggc cca gga ctg gtg aaa cct tcg gag	48
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu	
1 5 10 15	
acc ctg tcc ctc acc tgc agt gtc tct gct ggc tcc atc agt agt cac	96
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Ser Ala Gly Ser Ile Ser Ser His	
20 25 30	
tac tgg aac tgg atc cgg cag ccc cca ggg aag gga ctg gaa tgg att	144
Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile	
35 40 45	
ggg tct atc tat cac agt ggg agc acc aac tac aac ccc tcc ctc aag	192
Gly Ser Ile Tyr His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys	
50 55 60	
agt cga gtc acc ata tca gta gac acg tcc aag aac cac gtc tcc ctg	240
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn His Val Ser Leu	
65 70 75 80	
agg ttg acg tct gtg acc gcc gca gac acg gcc gtg tat tac tgt gcg	288
Arg Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala	
85 90 95	
aga gac tac tac tac tac atg gac gtc tgg ggc aaa ggg acc acg gtc	336
Arg Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val	
100 105 110	
acc gtc tcc tcg	348
Thr Val Ser Ser	
115	

25

<210> 78
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30

<400> 78

ES 2 815 527 T3

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

- 5 <210> 79
- <211> 324
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens
- 10 <220>
- <221> CDS
- <222> (1)..(324)
- <223> Secuencia de cadena ligera variable (VL) de NI-301.9X4 (PIMC por omisión)
- 15 <220>
- <221> Región V
- <222> (67)..(99)
- <223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR1
- 20 <220>
- <221> Región V
- <222> (145)..(165)
- <223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR2
- 25 <220>
- <221> Región V
- <222> (262)..(294)
- <223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR3
- <400> 79

ES 2 815 527 T3

```

tcc tat gag ctg act cag cca ccc tcg gtg tca gtg tcc cca gga cag      48
Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1          5          10          15

acg gcc agg atc acc tgc tct gga gat gcg ttg cca gac aag tat gct      96
Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Asp Lys Tyr Ala
          20          25          30

tat tgg tac cag cag aag cca ggc cag gcc cct atg ttg gtt ata tat      144
Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Met Leu Val Ile Tyr
          35          40          45

aag gac agt gag agg ccc tca ggg atc cct gag cga ttc tct ggc tcc      192
Lys Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
          50          55          60

agt ttg ggg aca aca gtc atg ctg acc atc agt gga gtc cag gca gag      240
Ser Leu Gly Thr Thr Val Met Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu
65          70          75          80

gac gag gct gac tat tac tgt aaa tca gca gac agc agt ggt act tat      288
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Lys Ser Ala Asp Ser Ser Gly Thr Tyr
          85          90          95

tgg gtg ttc ggc ggg ggg acc aag ctg acc gtc cta                      324
Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
          100          105

```

<210> 80
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 80

```

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

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Asp Lys Tyr Ala
          20          25          30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Met Leu Val Ile Tyr
          35          40          45

Lys Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
          50          55          60

Ser Leu Gly Thr Thr Val Met Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu
65          70          75          80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Lys Ser Ala Asp Ser Ser Gly Thr Tyr
          85          90          95

Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
          100          105

```

<210> 81
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(363)
 <223> Secuencia de cadena pesada variable (VH) de NI-301.14C3 (PIMC por omisión)

5

<220>
 <221> Región V
 <222> (91)..(105)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR1

10

<220>
 <221> Región V
 <222> (148)..(195)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR2

15

<220>
 <221> Región V
 <222> (292)..(330)
 <223> región determinante de complementariedad (CDR) VH-CDR3

20

<400> 81

gag gtg cag ctg gtg gag act gga gga ggc ttg atc cag cct ggg ggg	48
Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly	
1 5 10 15	
tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct ggg ttc acc gtc agt agc cac	96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Ser His	
20 25 30	
tac atg agc tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtc	144
Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
35 40 45	
tca att att tat agc ggt ggt ggc aca tac tac gca gac tcc gtg aag	192
Ser Ile Ile Tyr Ser Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys	
50 55 60	
ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat ctt	240
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu	
65 70 75 80	
caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gcc gtg tat tac tgt gcg	288
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala	
85 90 95	
aag atc tac agg tcg ggt aat act ggt tat tct tac gac tac tgg ggc	336
Lys Ile Tyr Arg Ser Gly Asn Thr Gly Tyr Ser Tyr Asp Tyr Trp Gly	
100 105 110	
cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tcg	363
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
115 120	

25

<210> 82
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30

<400> 82

ES 2 815 527 T3

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

- 5 <210> 83
- <211> 324
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens
- 10 <220>
- <221> CDS
- <222> (1)..(324)
- <223> Secuencia de cadena ligera variable (VL) de NI-301.14C3
- 15 <220>
- <221> Región V
- <222> (67)..(99)
- <223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR1
- 20 <220>
- <221> Región V
- <222> (145)..(165)
- <223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR2
- 25 <220>
- <221> Región V
- <222> (262)..(294)
- <223> región determinante de complementariedad (CDR) VL-CDR3
- <400> 83

ES 2 815 527 T3

```

tcc tat gag ctg act cag cca ccc tca gtg tcc gtg tcc cca ggg cag      48
Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1          5          10          15

aca gcc agc atc acc tgc tct gga gat aaa ttg ggg agt aaa tat gct      96
Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Lys Leu Gly Ser Lys Tyr Ala
          20          25          30

tgc tgg tat cag cag aag cca ggc cag tcc cct gta ctg gtc atc tat      144
Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
          35          40          45

gaa gat aag aag cgg ccc tca ggg atc cct gag cga ttc tct ggc tcc      192
Glu Asp Lys Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
          50          55          60

aac tct ggg aac aca gcc act ctg acc atc agc ggg acc cag gct atg      240
Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65          70          75          80

gat gag gct gac tat ttc tgt cag gcg tgg gac agc agc act tct cat      288
Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Ala Trp Asp Ser Ser Thr Ser His
          85          90          95

gtg gta ttc ggc gga ggg acc agg ctg acc gtc cta      324
Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu
          100          105

```

<210> 84
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 84

```

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

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

Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
          35          40          45

Glu Asp Lys Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
          50          55          60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65          70          75          80

Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Ala Trp Asp Ser Ser Thr Ser His
          85          90          95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu
          100          105

```

<210> 85
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia peptídica reconocida por NI-301.59F1 en el mapeo de epítomos - Mancha 15

<400> 85

5 Gly Leu Thr Thr Glu Glu Glu Phe Val Glu Gly Ile Tyr Lys Val
 1 5 10 15

<210> 86
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10

<220>
 <223> Secuencia de péptidos reconocida por NI-301.59F1 en el mapeo de epítomos - Mancha 16

15 Glu Glu Glu Phe Val Glu Gly Ile Tyr Lys Val Glu Ile Asp Thr
 1 5 10 15

20 <210> 87
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Secuencia de péptidos reconocida por NI-301.35G11 en el mapeo de epítomos - Mancha 13

 <400> 87

30 Thr Ser Glu Ser Gly Glu Leu His Gly Leu Thr Thr Glu Glu Glu
 1 5 10 15

 <210> 88
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35

 <220>
 <223> Secuencia de péptidos reconocida por NI-301.35G11 en el mapeo de epítomos - Mancha 14

40 <400> 88

 Gly Glu Leu His Gly Leu Thr Thr Glu Glu Glu Phe Val Glu Gly
 1 5 10 15

45 <210> 89
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Secuencia de péptidos reconocida por NI-301.37F1 en el mapeo de epítomos - Mancha 9

50 <400> 89

 Phe Arg Lys Ala Ala Asp Asp Thr Trp Glu Pro Phe Ala Ser Gly
 1 5 10 15

55 <210> 90
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de péptidos reconocida por NI-301.37F1 en el mapeo de epítomos - Mancha 10

<400> 90

5

Ala	Asp	Asp	Thr	Trp	Glu	Pro	Phe	Ala	Ser	Gly	Lys	Thr	Ser	Glu
1				5					10					15

<210> 91

<211> 15

10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de péptidos reconocida por NI-301.37F1 en el mapeo de epítomos - Mancha 11

15

<400> 91

Trp	Glu	Pro	Phe	Ala	Ser	Gly	Lys	Thr	Ser	Glu	Ser	Gly	Glu	Leu
1				5					10					15

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-transtiretina (TTR) de origen humano o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que es capaz de unirse a especies de TTR mutadas, mal plegadas, mal ensambladas y/o agregadas y/o fragmentos de las mismas y no reconoce sustancialmente especies de TTR fisiológicas,

(i) en el que el anticuerpo es capaz de unirse a un epítipo de TTR que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos EEEFVEGIY (SEQ ID NO: 49), y en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende en su región variable o dominio de unión las siguientes seis regiones determinantes de complementariedad (CDR) de la región variable V_H y V_L:

(a)

VH-CDR1: posiciones 31-35 de la SEQ ID NO: 2

VH-CDR2: posiciones 50-65 de la SEQ ID NO: 2

VH-CDR3: posiciones 98-115 de la SEQ ID NO: 2

VL-CDR1: posiciones 24-34 de la SEQ ID NO: 4

VL-CDR2: posiciones 50-56 de la SEQ ID NO: 4, y

VL-CDR3: posiciones 89-98 de SEQ ID NO: 4, o en la que una o más de las CDR pueden comprender una o dos sustituciones de aminoácidos;

(ii) en el que el anticuerpo es capaz de unirse a un epítipo de TTR que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos GELHGLTTEEE (SEQ ID NO: 50), y en la que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende en su región variable o dominio de unión las siguientes seis CDR de la región variable V_H y V_L:

(b)

VH-CDR1: posiciones 31-35 de la SEQ ID NO: 6

VH-CDR2: posiciones 50-66 de la SEQ ID NO: 6

VH-CDR3: posiciones 99-109 de la SEQ ID NO: 6

VL-CDR1: posiciones 24-39 de la SEQ ID NO: 8

VL-CDR2: posiciones 55-61 de la SEQ ID NO: 8

VL-CDR3: posiciones 94-102 de la SEQ ID NO: 8, o en la que una o más de las CDR pueden comprender una o dos sustituciones de aminoácidos;

(iii) en el que el anticuerpo es capaz de unirse a un epítipo de TTR que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos WEPFA (SEQ ID NO: 51), y donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende en su región variable o dominio de unión el seis CDR de la región variable V_H y V_L seleccionadas de:

(c)

VH-CDR1: posiciones 31-35 de la SEQ ID NO: 10

VH-CDR2: posiciones 52-67 de la SEQ ID NO: 10

VH-CDR3: posiciones 100-109 de la SEQ ID NO: 10

VL-CDR1: posiciones 24-34 de la SEQ ID NO: 12

VL-CDR2: posiciones 50-56 de la SEQ ID NO: 12

VL-CDR3: posiciones 89-97 de la SEQ ID NO: 12, o en la que una o más de las CDR pueden comprender una o dos sustituciones de aminoácidos;

(e)

VH-CDR1: posiciones 31-37 de la SEQ ID NO: 18

VH-CDR2: posiciones 52-67 de la SEQ ID NO: 18

VH-CDR3: posiciones 100-116 de la SEQ ID NO: 18

VL-CDR1: posiciones 24-34 de la SEQ ID NO: 20

VL-CDR2: posiciones 50-56 de la SEQ ID NO: 20

VL-CDR3: posiciones 89-98 de la SEQ ID NO: 20, o en la que una o más de las CDR pueden comprender una o dos sustituciones de aminoácidos;

(l)

VH-CDR1: posiciones 31-35 de la SEQ ID NO: 46

VH-CDR2: posiciones 50-66 de la SEQ ID NO: 46

VH-CDR3: posiciones 99-108 de la SEQ ID NO: 46

VL-CDR1: posiciones 23-36 de la SEQ ID NO: 48

VL-CDR2: posiciones 52-58 de la SEQ ID NO: 48

VL-CDR3: posiciones 91-100 de la SEQ ID NO: 48, o en la que una o más de las CDR pueden comprender una o dos sustituciones de aminoácidos;

(m)

- 5 VH-CDR1: posiciones 31-35 de la SEQ ID NO: 53
 VH-CDR2: posiciones 52-67 de la SEQ ID NO: 53
 VH-CDR3: posiciones 100-109 de la SEQ ID NO: 53
 VL-CDR1: posiciones 24-34 de la SEQ ID NO: 12
 10 VL-CDR2: posiciones 50-56 de la SEQ ID NO: 12
 VL-CDR3: posiciones 89-97 de la SEQ ID NO: 12, o en la que una o más de las CDR pueden comprender una o dos sustituciones de aminoácidos; o

(iv) en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende en su región variable o dominio de unión las seis CDR de la región variable V_H y V_L seleccionadas de:

(d)

- 20 VH-CDR1: posiciones 31-35 de la SEQ ID NO: 14
 VH-CDR2: posiciones 50-66 de la SEQ ID NO: 14
 VH-CDR3: posiciones 99-110 de la SEQ ID NO: 14
 VL-CDR1: posiciones 23-36 de la SEQ ID NO: 16
 VL-CDR2: posiciones 52-58 de la SEQ ID NO: 16
 25 VL-CDR3: posiciones 91-102 de la SEQ ID NO: 16;

(f)

- 30 VH-CDR1: posiciones 31-37 de la SEQ ID NO: 22
 VH-CDR2: posiciones 52-67 de la SEQ ID NO: 22
 VH-CDR3: posiciones 100-117 de la SEQ ID NO: 22
 VL-CDR1: posiciones 23-36 de la SEQ ID NO: 24
 VL-CDR2: posiciones 52-58 de la SEQ ID NO: 24
 VL-CDR3: posiciones 91-102 de la SEQ ID NO: 24;

(g)

- 35 VH-CDR1: posiciones 31-35 de la SEQ ID NO: 26
 VH-CDR2: posiciones 50-65 de la SEQ ID NO: 26
 VH-CDR3: posiciones 98-110 de la SEQ ID NO: 26
 40 VL-CDR1: posiciones 31-36 de la SEQ ID NO: 28
 VL-CDR2: posiciones 52-58 de la SEQ ID NO: 28
 VL-CDR3: posiciones 91-99 de la SEQ ID NO: 28;

(h)

- 45 VH-CDR1: posiciones 31-37 de la SEQ ID NO: 30
 VH-CDR2: posiciones 52-67 de la SEQ ID NO: 30
 VH-CDR3: posiciones 100-113 de la SEQ ID NO: 30
 VL-CDR1: posiciones 24-34 de la SEQ ID NO: 32
 50 VL-CDR2: posiciones 50-56 de la SEQ ID NO: 32
 VL-CDR3: posiciones 90-99 de la SEQ ID NO: 32;

(i)

- 55 VH-CDR1: posiciones 31-35 de la SEQ ID NO: 34
 VH-CDR2: posiciones 50-66 de la SEQ ID NO: 34
 VH-CDR3: posiciones 99-108 de la SEQ ID NO: 34
 VL-CDR1: posiciones 24-34 de la SEQ ID NO: 36
 VL-CDR2: posiciones 50-56 de la SEQ ID NO: 36
 60 VL-CDR3: posiciones 89-97 de la SEQ ID NO: 36;

(j)

- 65 VH-CDR1: posiciones 31-38 de la SEQ ID NO: 38
 VH-CDR2: posiciones 53-69 de la SEQ ID NO: 38
 VH-CDR3: posiciones 102-114 de la SEQ ID NO: 38

VL-CDR1: posiciones 23-36 de la SEQ ID NO: 40
 VL-CDR2: posiciones 52-58 de la SEQ ID NO: 40
 VL-CDR3: posiciones 91-99 de la SEQ ID NO: 40;

5 (k)

VH-CDR1: posiciones 31-36 de la SEQ ID NO: 42
 VH-CDR2: posiciones 51-66 de la SEQ ID NO: 42
 VH-CDR3: posiciones 99-113 de la SEQ ID NO: 42
 10 VL-CDR1: posiciones 23-35 de la SEQ ID NO: 44
 VL-CDR2: posiciones 51-57 de la SEQ ID NO: 44
 VL-CDR3: posiciones 90-100 de la SEQ ID NO: 44;

(n)

15 VH-CDR1: posiciones 31-35 de la SEQ ID NO: 55
 VH-CDR2: posiciones 50-66 de la SEQ ID NO: 55
 VH-CDR3: posiciones 99-109 de la SEQ ID NO: 55
 VL-CDR1: posiciones 24-34 de la SEQ ID NO: 57
 20 VL-CDR2: posiciones 50-56 de la SEQ ID NO: 57
 VL-CDR3: posiciones 89-99 de la SEQ ID NO: 57;

(o)

25 VH-CDR1: posiciones 31-35 de la SEQ ID NO: 62
 VH-CDR2: posiciones 50-66 de la SEQ ID NO: 62
 VH-CDR3: posiciones 99-114 de la SEQ ID NO: 62
 VL-CDR1: posiciones 23-35 de la SEQ ID NO: 64
 VL-CDR2: posiciones 51-57 de la SEQ ID NO: 64
 30 VL-CDR3: posiciones 90-101 de la SEQ ID NO: 64;

(p)

VH-CDR1: posiciones 31-35 de la SEQ ID NO: 66
 35 VH-CDR2: posiciones 52-67 de la SEQ ID NO: 66
 VH-CDR3: posiciones 100-107 de la SEQ ID NO: 66
 VL-CDR1: posiciones 24-34 de la SEQ ID NO: 68
 VL-CDR2: posiciones 50-56 de la SEQ ID NO: 68
 40 VL-CDR3: posiciones 89-97 de la SEQ ID NO: 68;

(q)

VH-CDR1: posiciones 31-37 de la SEQ ID NO: 70
 VH-CDR2: posiciones 52-67 de la SEQ ID NO: 70
 45 VH-CDR3: posiciones 100-113 de la SEQ ID NO: 70
 VL-CDR1: posiciones 23-33 de la SEQ ID NO: 72
 VL-CDR2: posiciones 49-55 de la SEQ ID NO: 72
 VL-CDR3: posiciones 88-96 de la SEQ ID NO: 72;

(r)

VH-CDR1: posiciones 31-35 de la SEQ ID NO: 74
 VH-CDR2: posiciones 50-66 de la SEQ ID NO: 74
 VH-CDR3: posiciones 99-113 de la SEQ ID NO: 74
 55 VL-CDR1: posiciones 23-36 de la SEQ ID NO: 76
 VL-CDR2: posiciones 52-58 de la SEQ ID NO: 76
 VL-CDR3: posiciones 91-100 de la SEQ ID NO: 76;

(s)

60 VH-CDR1: posiciones 31-35 de la SEQ ID NO: 78
 VH-CDR2: posiciones 50-65 de la SEQ ID NO: 78
 VH-CDR3: posiciones 98-105 de la SEQ ID NO: 78
 VL-CDR1: posiciones 23-33 de la SEQ ID NO: 80
 65 VL-CDR2: posiciones 49-55 de la SEQ ID NO: 80

VL-CDR3: posiciones 88-98 de la SEQ ID NO: 80; y

(t)

- 5 VH-CDR1: posiciones 31-35 de la SEQ ID NO: 82
 VH-CDR2: posiciones 50-65 de la SEQ ID NO: 82
 VH-CDR3: posiciones 98-110 de la SEQ ID NO: 82
 VL-CDR1: posiciones 23-33 de la SEQ ID NO: 84
 VL-CDR2: posiciones 49-55 de la SEQ ID NO: 84
 10 VL-CDR3: posiciones 88-98 de la SEQ ID NO: 84.

2. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1, que comprende en su región variable o dominio de unión las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada variable (V_H) y ligera variable (V_L) seleccionada entre:

- 15 (a) SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4;
 (b) SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 8;
 (c) SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 12;
 (d) SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 16;
 20 (e) SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 20;
 (f) SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 24;
 (g) SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 28;
 (h) SEQ ID NO: 30 y SEQ ID NO: 32;
 (i) SEQ ID NO: 34 y SEQ ID NO: 36;
 25 (j) SEQ ID NO: 38 y SEQ ID NO: 40;
 (k) SEQ ID NO: 42 y SEQ ID NO: 44;
 (l) SEQ ID NO: 46 y SEQ ID NO: 48;
 (m) SEQ ID NO: 53 y SEQ ID NO: 12;
 (n) SEQ ID NO: 55 y SEQ ID NO: 57;
 30 (o) SEQ ID NO: 62 y SEQ ID NO: 64;
 (p) SEQ ID NO: 66 y SEQ ID NO: 68;
 (q) SEQ ID NO: 70 y SEQ ID NO: 72;
 (r) SEQ ID NO: 74 y SEQ ID NO: 76;
 (s) SEQ ID NO: 78 y SEQ ID NO: 80;
 35 (t) SEQ ID NO: 82 y SEQ ID NO: 84; o

una cadena V_H y V_L que comprende las secuencias de aminoácidos resultantes de una alteración parcial de las secuencias de aminoácidos de cualquiera de (a) a (t) en la que la alteración se selecciona de la eliminación o eliminaciones, inserción o inserciones, sustitución o sustituciones y/o adición o adiciones de aminoácidos.

- 40 3. El anticuerpo de la reivindicación 1 o 2, en el que el anticuerpo se une al epítipo de TTR (i) GELHGLTTEEE (SEQ ID NO: 50) pero no a un epítipo mutante L55P correspondiente o (ii) WEPFA (SEQ ID NO: 51) pero no a un mutante E42G correspondiente.

- 45 4. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende además un dominio constante, preferiblemente en el que el dominio constante es un dominio constante humano, preferiblemente del tipo IgG.

- 50 5. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el dominio constante es de la clase o isotipo IgG1.

6. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que es un anticuerpo quimérico murino-humano o murinizado.

7. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que es un fragmento de anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en un fragmento Fv de cadena sencilla (scFv), un fragmento F(ab'), un fragmento F(ab) y un Fragmento F(ab')₂.

8. Uno o más polinucleótidos que codifican el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o vectores que comprenden el polinucleótido o polinucleótidos, preferiblemente en los que el polinucleótido o polinucleótidos son ADNc.

9. Una célula huésped que comprende el polinucleótido o polinucleótidos o vector o vectores de la reivindicación 8.

10. Un método para preparar un anticuerpo anti-TTR o un derivado biotecnológico del mismo, comprendiendo dicho método

- (a) cultivar la célula de la reivindicación 9; y
- (b) aislar el anticuerpo del cultivo.

11. Un anticuerpo codificado por el polinucleótido o polinucleótidos de la reivindicación 8 o que se puede obtener mediante el método de la reivindicación 10.

12. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 u 11, que

- (i) comprende una etiqueta detectable, preferiblemente en el que la etiqueta detectable se selecciona del grupo que consiste en una enzima, un radioisótopo, un fluoróforo y un metal pesado; y/o
- (ii) está unido a un fármaco.

13. Una composición que comprende el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, 11 o 12, el polinucleótido o polinucleótidos o el vector o vectores de la reivindicación 8 o la célula de la reivindicación 9, preferiblemente en la que la composición

- (i) es una composición farmacéutica y comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable, preferiblemente en el que la composición es una vacuna y/o comprende un agente adicional útil para prevenir o tratar enfermedades asociadas con amiloidosis por TTR; o
- (ii) una composición de diagnóstico, que preferiblemente comprende además reactivos usados convencionalmente en métodos de diagnóstico de base inmunológica o ácido nucleico.

14. Un anticuerpo anti-TTR o un fragmento de unión a TTR de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, 11 o 12, el polinucleótido o polinucleótidos o el vector o vectores de la reivindicación 8, la célula de la reivindicación 9 o la composición de la reivindicación 13 para su uso en el tratamiento profiláctico o terapéutico de una enfermedad asociada con la amiloidosis por TTR, preferiblemente en la que la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en polineuropatía amiloide familiar (FAP), miocardiopatía amiloide familiar (FAC), amiloidosis sistémica senil (SSA), amiloidosis familiar sistémica, amiloidosis leptomeníngea/del sistema nervioso central (CNS) incluida la enfermedad de Alzheimer, amiloidosis ocular relacionada con TTR, amiloidosis renal relacionada con TTR, hipertiroidismo relacionada con TTR, amiloidosis del ligamento relacionada con TTR, incluido el síndrome del túnel carpiano, desgarros del manguito rotador y estenosis espinal lumbar, y preeclampsia o un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, 11 o 12 para su uso en la detección o formación de imágenes *in vivo* de o que se dirige a un agente terapéutico y/o de diagnóstico para TTR en el cuerpo humano o animal, preferiblemente en el que dicha formación de imágenes *in vivo* comprende escintigrafía, tomografía por emisión de positrones (PET), tomografía por emisión de fotón único (SPECT), infrarrojo cercano (NIR), formación de imágenes ópticas o formación de imágenes de resonancia magnética (MRI).

15. Un kit útil en el diagnóstico o seguimiento de un trastorno asociado con la amiloidosis por TTR, comprendiendo dicho kit al menos un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, 11 o 12, el polinucleótido o polinucleótidos o el vector o vectores de la reivindicación 8 y/o la célula de la reivindicación 9, opcionalmente con reactivos y/o instrucciones de uso.

16. Un método para diagnosticar una enfermedad asociada con amiloidosis por TTR como se define en la reivindicación 14, control del tratamiento de la enfermedad con un anticuerpo anti-TTR o determinar la utilidad diagnóstica o terapéutica de un anticuerpo anti-TTR que comprende analizar el nivel de TTR mal plegada y/o agregada en una muestra de fluido corporal de un sujeto después de la administración de un anticuerpo anti-TTR al sujeto, en el que la presencia o nivel elevado de TTR mal plegada y/o agregada en la muestra del sujeto en comparación con un control indica una enfermedad asociada con amiloidosis por TTR, preferiblemente en el que el nivel de TTR mal plegada y/o agregada en la muestra se analiza determinando un complejo formado entre el anticuerpo anti-TTR y la TTR mal plegada y/o agregada, preferiblemente en el que el control es una muestra obtenida del sujeto antes de la administración del anticuerpo anti-TTR, preferiblemente en el que el fluido corporal es sangre y la muestra se deriva de la misma y/o el control es una muestra correspondiente de un fluido corporal tomado del sujeto antes de la administración del anticuerpo anti-TTR, en el que el anticuerpo anti-TTR es un anticuerpo anti-TTR o un fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, 11 o 12.

A **NI-301.59F1-VH (cadena pesada variable)**
 FR1-----CDR1--FR2-----CDR2-----FR3--
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGFTFSNYWMSWVRQAPGKGLEWVANINQDSEKYYVDSVKGRFA
 -----CDR3-----FR4-----
 SRDNSKNSLYLQMNSLRVEDTGVYYCARDRYCSGGRC SRGNNWFDPWGQGT LVTVSS
 (SEQ ID NO: 2)

NI-301.59F1-VL (cadena ligera kappa variable)
 FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATDIPARFSGSGSGT
 -----CDR3-----FR4-----
 EFTLTISLQSEDFAVYYCQQYNNWPPYTFGQGT KVDIK
 (SEQ ID NO: 4)

B **NI-301.35G11-VH (cadena pesada variable)**
 FR1-----CDR1--FR2-----CDR2-----FR3--
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGFTFSYAMSWVRQVPKGLEWVSSISGSGDITTKYTDSVKGRFT
 -----CDR3-----FR4-----
 ISRDNSKNTVFLQMSSLRAEDTALYYCVKDGSGRIDPFALWGQGT MVTVSS
 (SEQ ID NO: 6)

NI-301.35G11-VL (cadena ligera kappa variable)
 FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
 EIVMTQSPPLSLPVTGLQPASISCRSSRSLVYSDGNIYLNWFQQRPGQSPRRLIYKVSNRDSGVDPDRFSG
 -----CDR3-----FR4-----
 SGSDTDFTLRISRVEAEDVGYYCMQGTHWPRTFGQGT KVEIK
 (SEQ ID NO: 8)

C **NI-301.37F1-VH (cadena pesada variable)**
 FR1-----CDR1--FR2-----CDR2-----
 QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCSVSGGSII SRSSYWGWI RQPPGKLEWIGGIYHSGNTYDNPSLKSRL
 -----CDR3-----FR4-----
 TMSVDTSKNQFSLNLRSVTAADTAVYYCARIVPGGDAFDI WGQGT MVTVSS
 (SEQ ID NO: 10)

NI-301.37F1-VL (cadena ligera kappa variable)
 FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIACRASQSVGTYLNWYQQKRGKAPKLLIFAASSLQSGVPSRFSGSGSGT
 -----CDR3-----FR4-----
 DFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSSPPTFGQGT KVEIK
 (SEQ ID NO: 12)

Fig. 1

D NI-301.2F5-VH (cadena pesada variable)

FR1-----CDR1--FR2-----CDR2-----FR3
 EVQLVESGGGVVRSRRSLRLSCATSGFTFSSNYAMHWVRQAPGKGLEWVAIIISYDGNNKYYADSVRGRFT
 -----CDR3-----FR4-----
 VSRDNSKNTFYFLQMNSLRIEDTAVYFCARGSGRAARHWFDPWGQGLTVTVSS
 (SEQ ID NO: 14)

NI-301.2F5-VL (cadena ligera lambda variable)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
 QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQYPGKAPKVMIFDVFNRPSGVSNRFSGSKS
 -----CDR3-----FR4-----
 GNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSVTPHWVFGGGTKLTVL
 (SEQ ID NO: 16)

E NI-301.28B3-VH (cadena pesada variable)

FR1-----CDR1---FR2-----CDR2-----FR
 QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSITSSNFYWGWIRQPPGKGLEWIGAIYSSGNTYYNPSLKSRV
 3-----CDR3-----FR4-----
 TISVDTSKKKFSCLKSSVTAADTAVYYCARHSCSSASCYPPGFWFDPWGQGLTVTVSS
 (SEQ ID NO: 18)

NI-301.28B3-VL (cadena ligera kappa variable)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
 EIVMTQSPATLSASPGERATLSRASQTVSYNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPGRFSGSGSGT
 -----CDR3-----FR4-----
 EFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNNWPPWTFGQGTVKVEIK
 (SEQ ID NO: 20)

F NI-301.119C12-VH (cadena pesada variable)

FR1-----CDR1---FR2-----CDR2-----
 QVQLQESGPRLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGVYYWSWIRQHPGKGLEWIGYISNTGNTYYNPSLKSRV
 -----CDR3-----FR4-----
 TISIDTSKNQFSLNLRSVTAADTADYFCAREYCSGGNCYSRFYYMDVWGKGTTVTVSS
 (SEQ ID NO: 22)

NI-301.119C12-VL (cadena ligera lambda variable)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
 QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYGVHWYQQLSGTTPPKLLIYGDNNRPSGVPDRFSGSKS
 -----CDR3-----FR4-----
 GTSASLAITGLQAEDEAHYYCQSYDTLSGSRVFGGGTKLTVL
 (SEQ ID NO: 24)

Fig. 1 (continuación)

G **NI-301.5D8-VH (cadena pesada variable)**
 FR1-----CDR1--FR2-----CDR2-----FR3--
 QVQLQQWGAGRLKPSETLSLTCVYGGSFSAYYWNWIRQAPGKGLEWIGEVSHTGGSSNYSPSLRGRVAI
 -----CDR3-----FR4-----
 SLDTSKSQFSLRLNSVTAAADTAVYYCARGSPVVLPGARFDPWGQGTILVTVSS
 (SEQ ID NO: 26)

NI-301.5D8-VL (cadena ligera lambda variable))
 FR1-----CDR1--FR2-----CDR2---FR3-----
 QSALTQPASVSGFPGQSITISCTGTSSDVGSYNLVSQYQHPGKAPKLLIYEVNKRPSGVSTRFSGSKS
 -----CDR3-----FR4-----
 GNTASLTISGLQTEDEADYYCCSYAGSTKVFGIGTKVTVL
 (SEQ ID NO: 28)

H **NI-301.9D5-VH (cadena pesada variable)**
 FR1-----CDR1---FR2-----CDR2-----FR
 QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCIVSGVSIRSGGYWSWIRQHPGKGLEWVGFIYYTGNTIYNPSLKSR
 3-----CDR3-----FR4-----
 TISVDTSKNQFSLRLTAVTAADTAVYYCARDSCGGSCPEYFDSWGRGTLVTVSS
 (SEQ ID NO: 30)

NI-301.9D5-VL (cadena ligera kappa variable)
 FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
 EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSFLAWYQQKSGQAPRLLIYDASKRATGIPARFSDSGSGT
 -----CDR3-----FR4-----
 DFTLTISRLETEDSAVYYCQQRINWPPHLTFGGGKVEIK
 (SEQ ID NO: 32)

I **NI-301.104F5-VH (cadena pesada variable)**
 FR1-----CDR1--FR2-----CDR2-----FR3
 QVQLVESGGGVVQPERSLRLSCAASGFTFRSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWFDDGSNKYYADSVKGRFT
 -----CDR3-----FR4-----
 VSRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGIAATYADYWGQGTILVTVSS
 (SEQ ID NO: 34)

NI-301.104F5-VL (cadena ligera kappa variable)
 FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASNRATGIPARFSGSGSGT
 CDR3 FR4
 DFTLTISSELPEDFAVYYCQQRSNWPITFGQGTREIK
 (SEQ ID NO: 36)

Fig. 1 (continuación)

J **NI-301.21F10-VH (cadena pesada variable)**
 FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----
 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTLSSLSSYYMSWVRQAPGKGLEWVATINPGGSEKSYVDSVKG
 FR3-----CDR3-----FR4-----
 RFTVSRDNARSSVYLQMDSLTVEDTAIYYCARPRYCTSGGCYFDNWGQGLVTVSS
 (SEQ ID NO: 38)

NI-301.21F10-VL (cadena ligera lambda variable)
 FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
 QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTATNSDVGDYKSVSWYQQHPGKAPKLMYDVGRRPSGVPDRFSGSKS
 -----CDR3-----FR4-----
 DNTAFLTISGLQTEDEADYFCCIYVGRSSVFGGGTKLTVL
 (SEQ ID NO: 40)

K **NI-301.9G12-VH (cadena pesada variable)**
 FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----FR3
 QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAVSGFSSISGYYWGWRQPPGTGLEWIGSMYHSGRTYYNPSLKSRVT
 -----CDR3-----FR4-----
 ISVDTSKNQLSLKLSSVTAADTAVYYCARGFDISGSHRPLSTDYWGQGLVTVSS
 (SEQ ID NO: 42)

NI-301.9G12-VL (cadena ligera lambda variable)
 FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
 QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRISGSKSG
 -----CDR3-----FR4-----
 TSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSAYVFGTGTKVTVL
 (SEQ ID NO: 44)

L **NI-301.12D3-VH (cadena pesada variable)**
 FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2-----FR3
 EVQLVETGGGVVQPGSLRLSCVASGFTFRNYGMHWVRAPGRGLEWVAVIWDGSDKYADSVVEGRFT
 -----CDR3-----FR4-----
 ISRDNSKNTVFLQMNSLRADDTAVYFCAREPSSTWAFDYWGQGLVTVSS
 (SEQ ID NO: 46)

NI-301.12D3-VL (cadena ligera lambda variable)
 FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
 QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGYNLVSWYQQHPGKAPKLMYEDIKGPSGVSNRFSGSKS
 -----CDR3-----FR4-----
 GNTASLTISGLQAEDEADYFCCSYAGTGLVFGGGTKLTVL
 (SEQ ID NO: 48)

Fig. 1 (continuación)

M **NI-301.37F1-PIMC-VH (cadena pesada variable)**
 FR1-----CDR1---FR2-----CDR2-----
 QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCSVSGGSIISRSSYWGWIRQPPGKGLEWIGGIYHSGNTYDNPSLKSRL
 FR3-----CDR3-----FR4-----
 TMSVDTSKNQFSLNLRSVTAADTAVYYCARIVPGGDAFDIWGQGTMTVTVSS
 (SEQ ID NO: 53)

N **NI-301.44E4-VH (cadena pesada variable)**
 FR1-----CDR1---FR2-----CDR2-----FR3
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSYAMIWVRQAPGKGLEWVSGISGSGSTYYADSVKGRFA
 -----CDR3-----FR4-----
 ISRDKSKNTLSLQMNSLRAEDTAVYYCAKGAWEIPTYFDNWGQGTMTVTVSS
 (SEQ ID NO: 55)

NI-301.44E4-VK (cadena ligera lambda variable)
 FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
 EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSIRNNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGTGS
 -----CDR3-----FR4-----
 EFTLIVSSLSQSEDFAVYYCQQYNNWPPTWTFGQGTKVEIK
 (SEQ ID NO: 57)

O **NI-301.18C4-VH (cadena pesada variable)**
 FR1-----CDR1---FR2-----CDR2-----FR3
 EVQLVESGGTLVQPGGSLRLSCAASGFTFNIYAMTWRLSPVRGLEWVSTITSGGVSIYYADSIKGRFT
 -----CDR3-----FR4-----
 VSRDNAKNMVFLQLDNLTVDDTAIYYCGKDGNCDETSCYLRGMDVWGQGTMTVTVSS
 (SEQ ID NO: 62)

NI-301.18C4-VL (cadena ligera lambda variable)
 FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
 QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSRSDIGSKLVSWYQVIPGRAPRLVIFDTYKRPSGVPARFSASKSG
 -----CDR3-----FR4-----
 TSATLDIAGLQPGDEAEYFCGSWGNSENFYYVFGSGTRVTVL
 (SEQ ID NO: 64)

Fig. 1 (continuación)

P NI-301.11A10-VH (cadena pesada variable) (PIMC por omisión)
 FR1-----CDR1--FR2-----CDR2-----
 QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSRSYWGWMRQPPGKGLEWIGSIYYSGSTLYNPSLKSRV
 FR3-----CDR3----FR4-----
 TMSIVTSRNQFSLKLSSVTAADTAVYYCTRMGEGRDYWGQGTLVTVSS
 (SEQ ID NO: 66)

NI-301.11A10-VK (cadena ligera kappa variable) (PIMC por omisión)
 FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
 DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRASQSISSWLAWYQQKPKAPKVLIYDASSLERGVPSRFSGSGSGT
 -----CDR3-----FR4-----
 EFTLTISLQPDSDATYYCQHNGYSRTFGRGTKVEIK
 (SEQ ID NO: 68)

Q NI-301.3C9-VH (cadena pesada variable) (PIMC por omisión)
 FR1-----CDR1---FR2-----CDR2-----FR
 QVQLQESGPGLVKSSQTLSTCTVSGASFTRGDFYWSWIRQVPKGLEWIGYIYSTGDVYYNPSLKSRA
 3-----CDR3-----FR4-----
 NISVDTPKKQFFLKLTSLTAADTAVYFCAREGQYCSGGSCYPEYWGQGTLVTVSS
 (SEQ ID NO: 70)

NI-301.3C9-VL (cadena ligera lambda variable)
 FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
 SYELTQPPSVSVSPGQTATITCSGDNLGHKFTCWYQQKPGQSPVLVIYQDHKRPSGIPERFSGSNSGDT
 -----CDR3-----FR4-----
 ATLTIISGTQAMDEAEYYCQAWAFPYVVFGGGTKLTVL
 (SEQ ID NO: 72)

R NI-301.14D8-VH (cadena pesada variable)
 FR1-----CDR1--FR2-----CDR2-----FR3
 EVQLVETGGRLVQPGGSVRLSCIASGFPRNYWMSWVRQPPGKLEWVANIKEDGSDRYVDSVKGRFT
 -----CDR3-----FR4-----
 IFRDNAKNFLSLQMNRLRAEDTAVYFCARIVGVIPSADPYLDSWGQGTLVTVSS
 (SEQ ID NO: 74)

NI-301.14D8-VL (cadena ligera lambda variable) (PIMC por omisión)
 FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
 QSALTQPASVSGFAGQSVTISCTGTSLNIGTYNLISWYQQHPGRAPRLIIFEGNRRPPGISNRFSASKS
 -----CDR3-----FR4-----
 GNTASLTVSGLLAGDEADYYCCSFAGRVSLVFGGGTKLTVL
 (SEQ ID NO: 76)

Fig. 1 (continuación)

S **NI-301.9X4-VH (cadena pesada variable)** (PIMC por omisión)

FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----
 QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCSVSAGSISSHYWNWIRQPPGKGLEWIGSIYHSGSTNYPSLKSRVTI
 FR3-----CDR3----FR4-----
 SVDTSKNHVSRLTSVTAADTAVYYCARDYYYYMDVWGKGTTVTVSS
 (SEQ ID NO: 78)

NI-301.9X4-VL (cadena ligera lambda variable) (PIMC por omisión)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
 SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDALPDKYAYWYQKPGQAPMLVIYKDSERPSGIPERFSGSSLGTT
 -----CDR3-----FR4-----
 VMLTISGVQAEDADYYCKSADSSGTYWVFGGGTKLTVL
 (SEQ ID NO: 80)

T **NI-301.14C3-VH (cadena pesada variable)** (PIMC por omisión)

FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----FR3-----
 EVQLVETGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTVSSHYMSWVRQAPGKGLEWVSIYSGGGTYYADSVKGRFTI
 -----CDR3-----FR4-----
 SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKIYRSGNTGYSYDYWGQGTLLTVSS
 (SEQ ID NO: 82)

NI-301.14C3-VL (cadena ligera lambda variable)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3-----
 SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGSKYACWYQKPGQSPVLVIYEDKKRPSGIPERFSGSNSGNT
 -----CDR3-----FR4-----
 ATLTIAGTQAMDEADYFCQAWDSSTSHVVFGGGTRLTVL
 (SEQ ID NO: 84)

Fig. 1 (continuación)

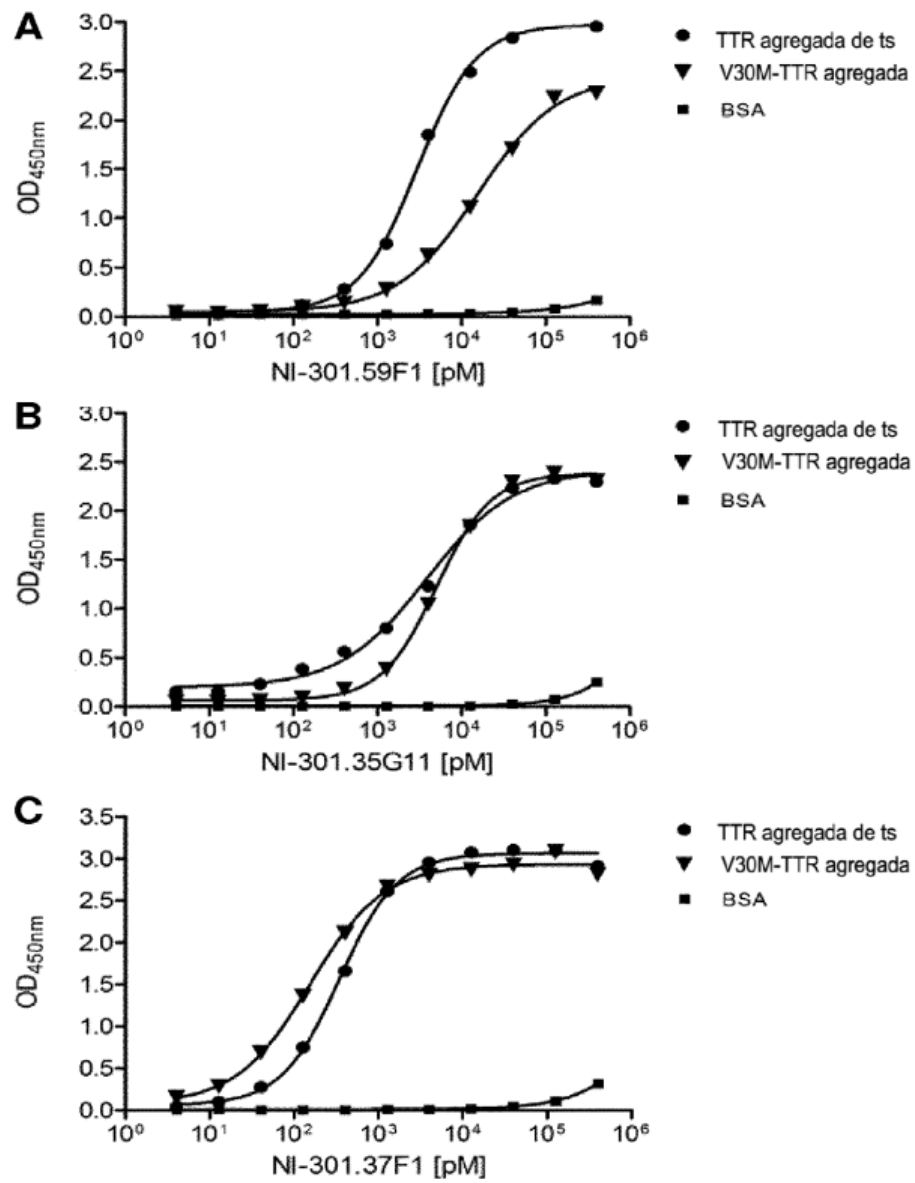
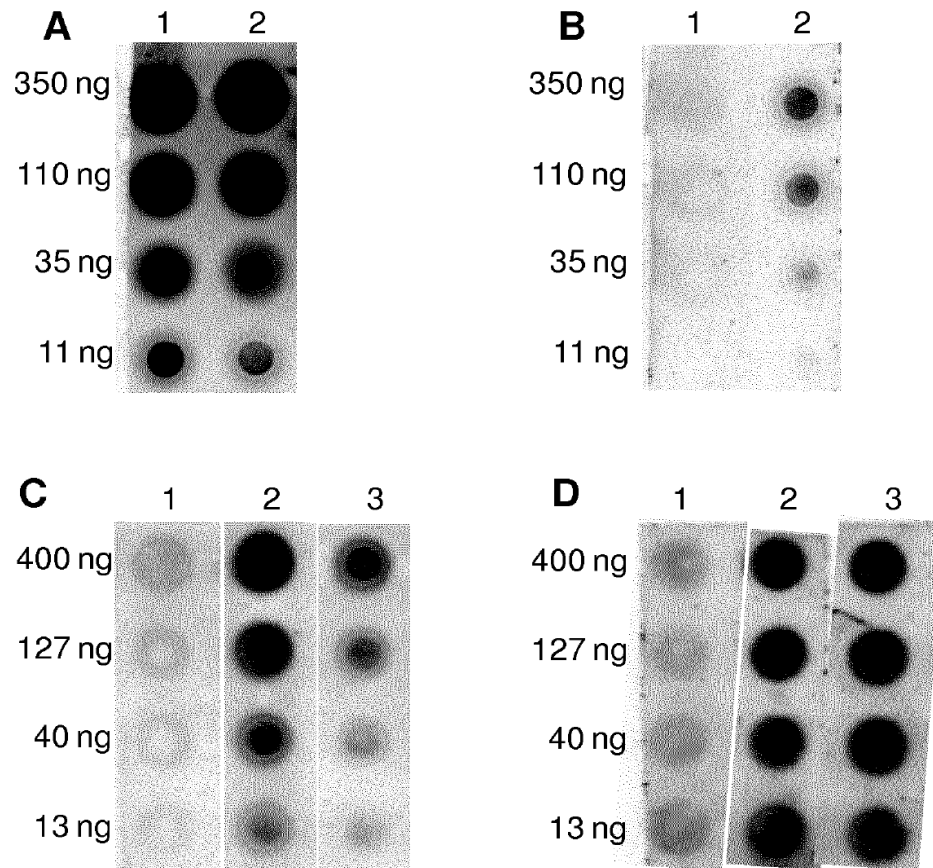
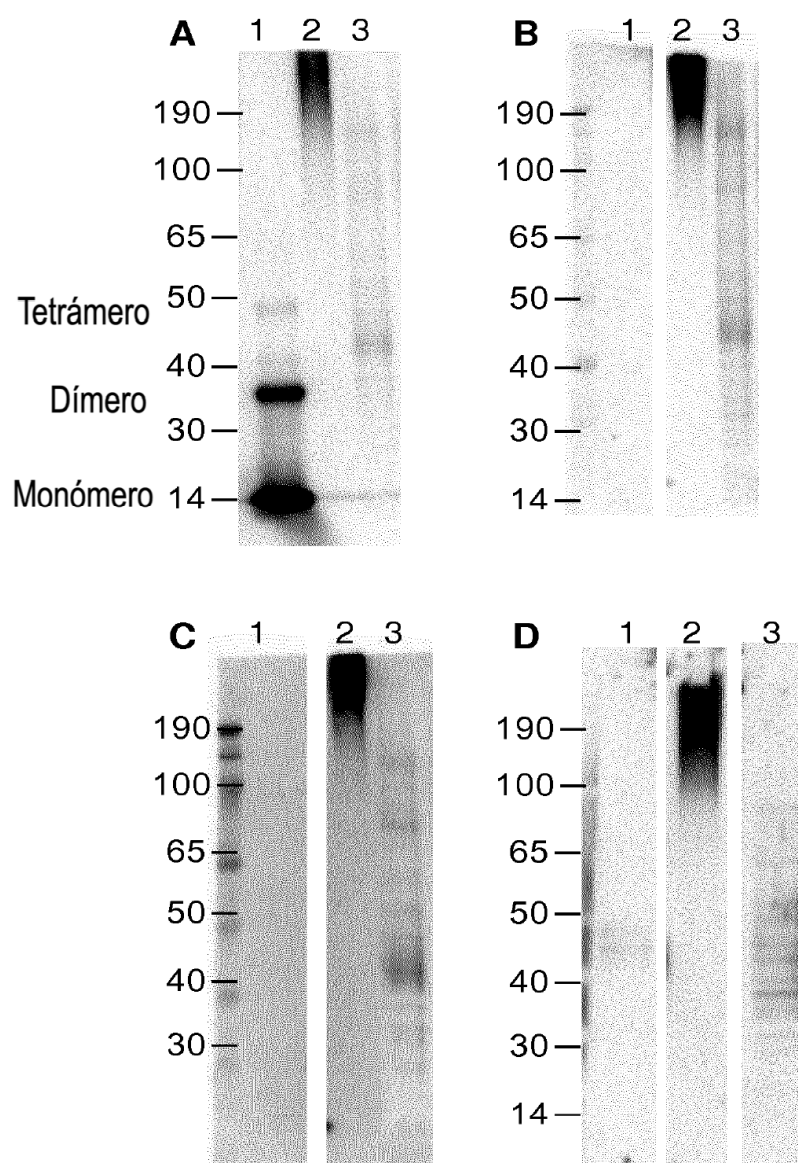


Fig. 2



A: Dako 150 ng/ml
 B: 59F1 50 nM
 C: 35G11 50 nM
 D: 37F1 50 nM

Fig. 3



A: Dako 150 ng/ml
B: 59F1 50 nM
C: 35G11 50 nM
D: 37F1 50 nM

Fig. 4

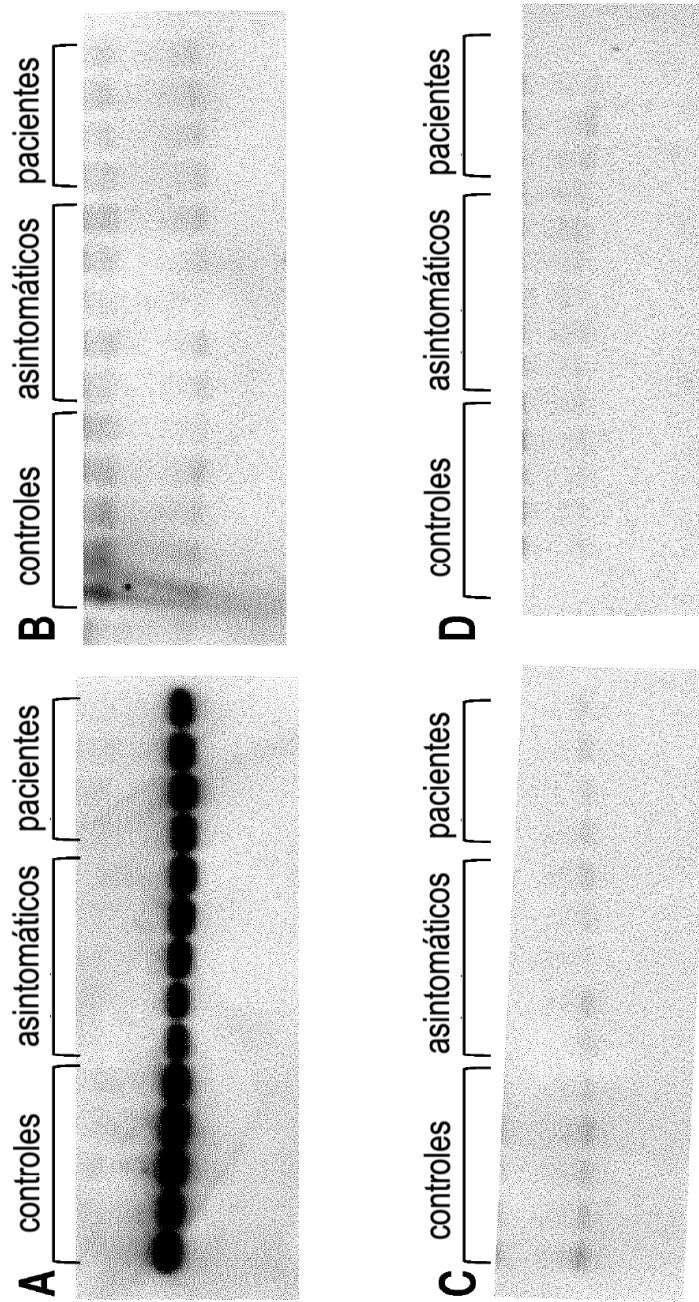


Fig. 5

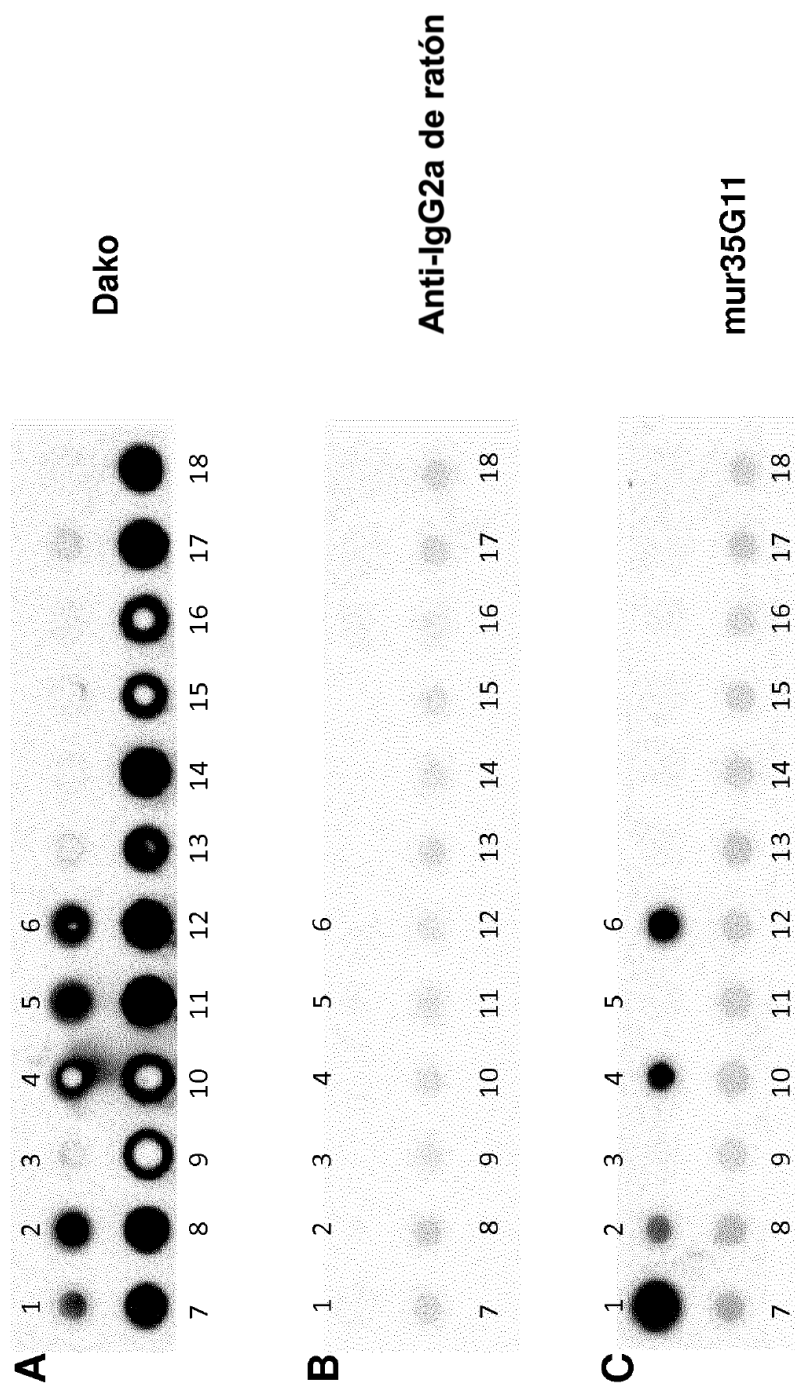


Fig. 6

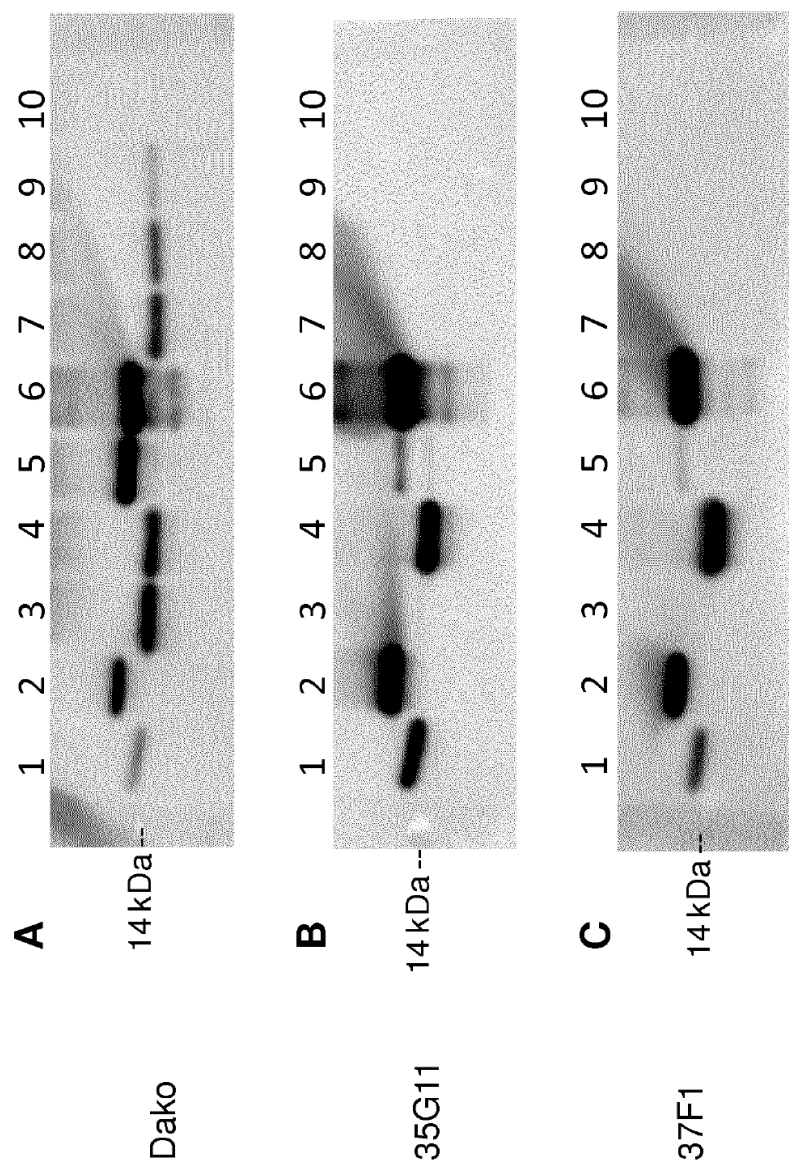


Fig. 7

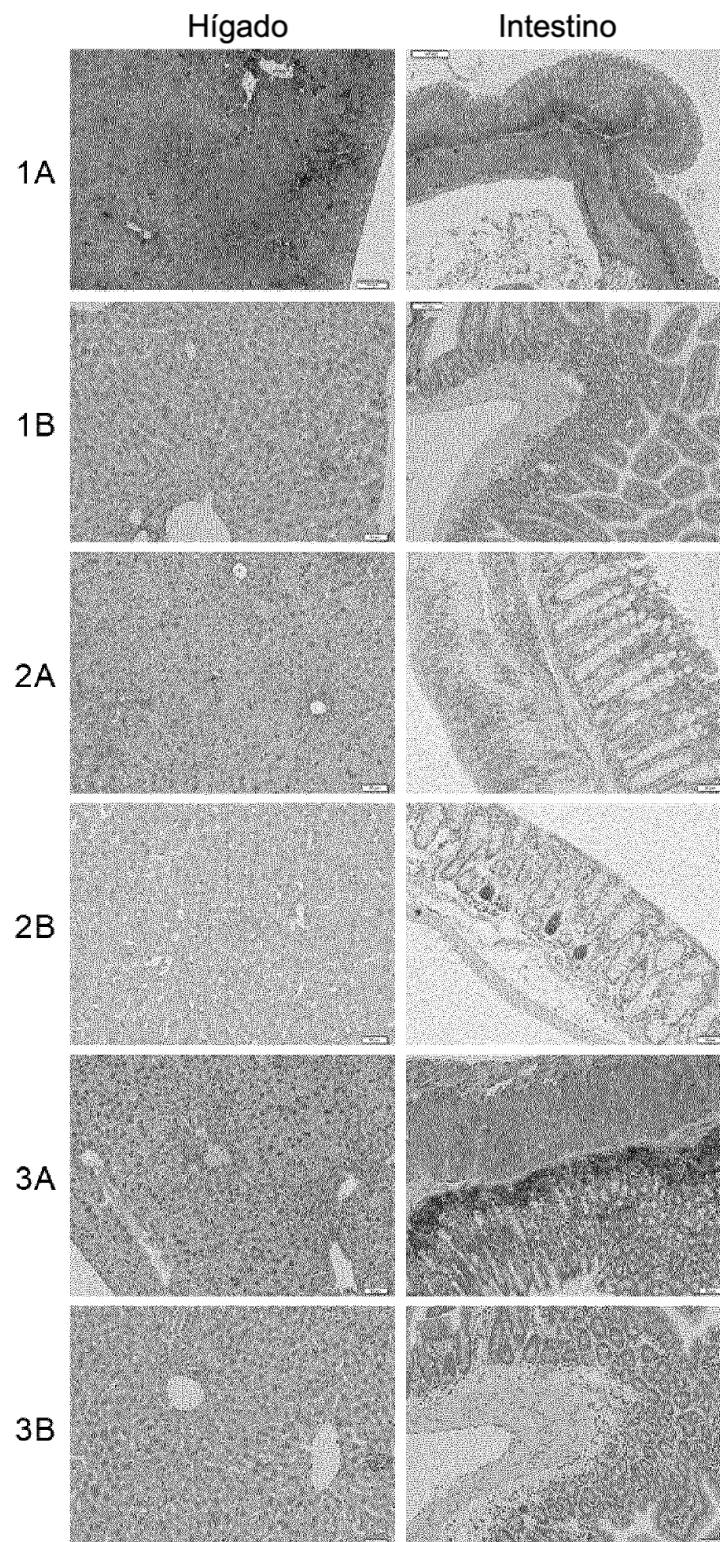


Fig. 8

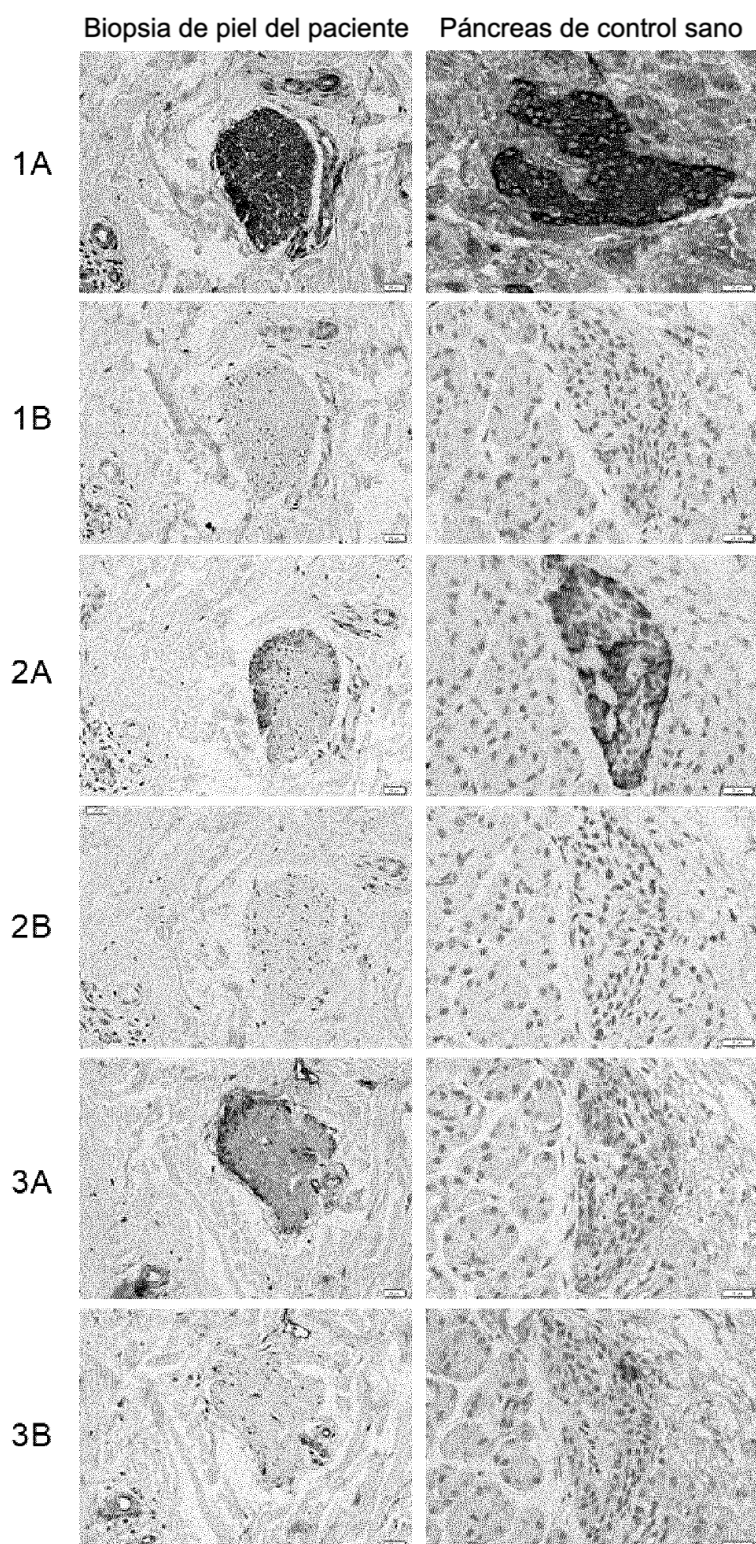


Fig. 9

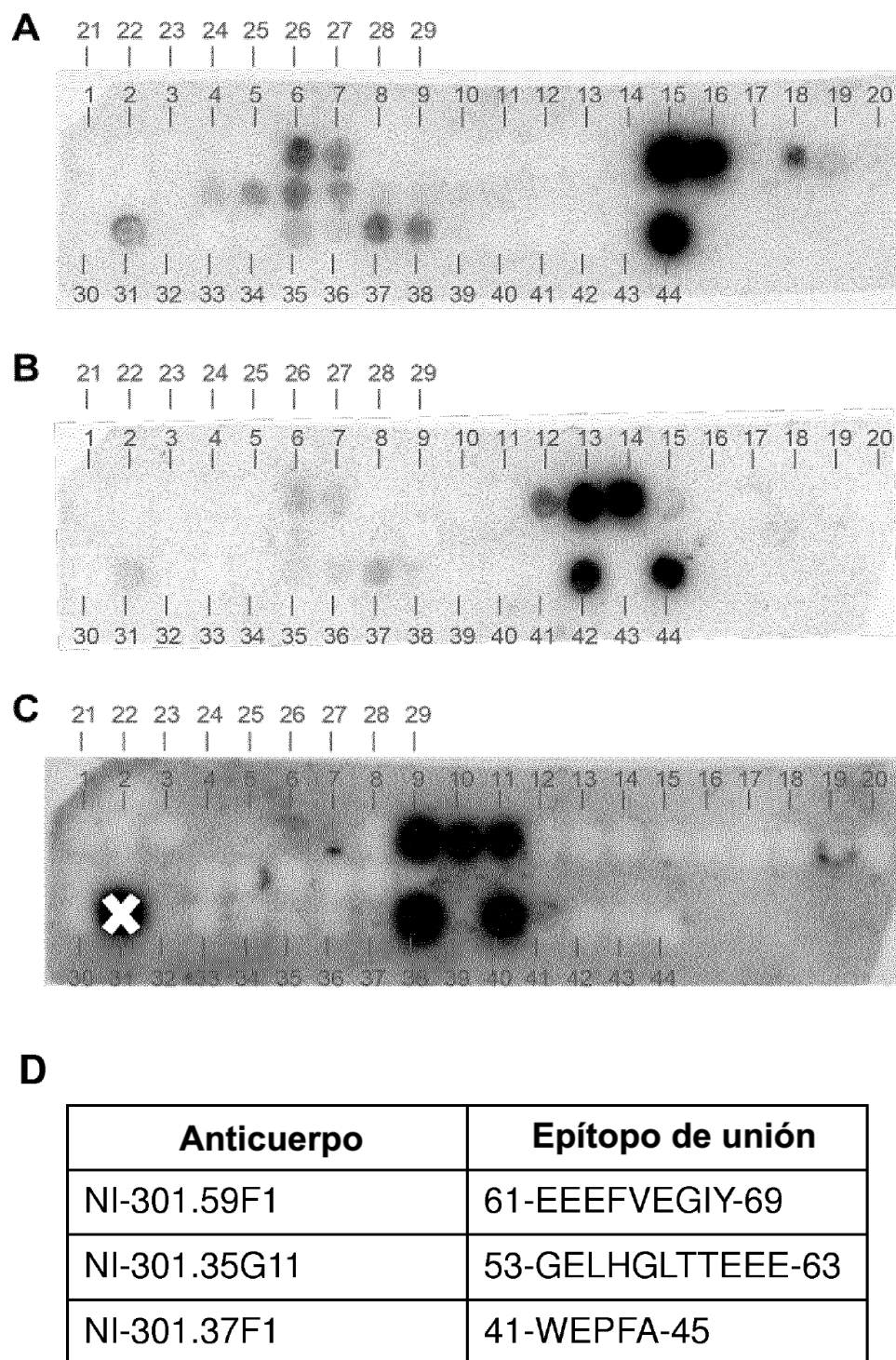


Fig. 10

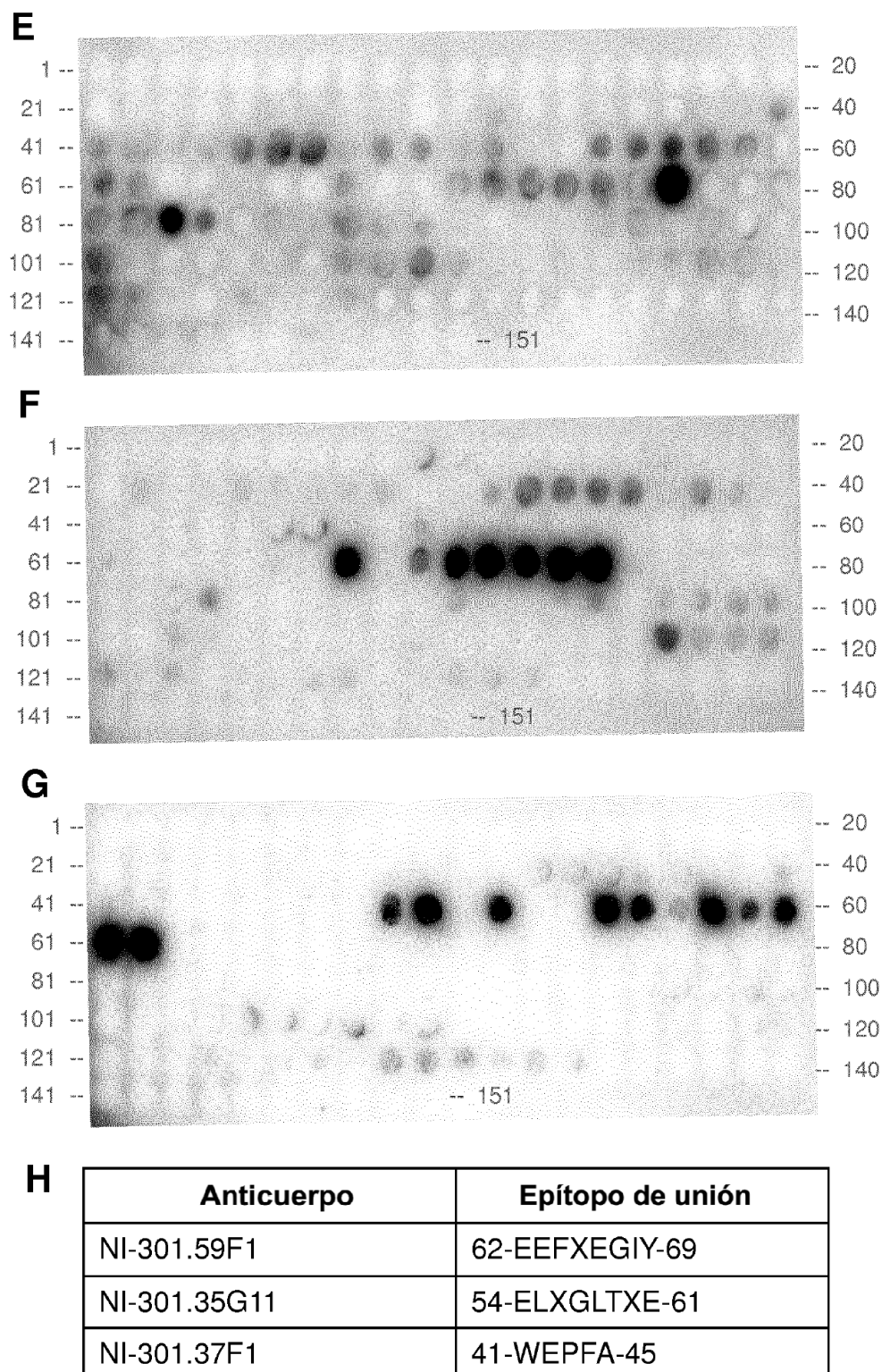


Fig. 10 (continuación)

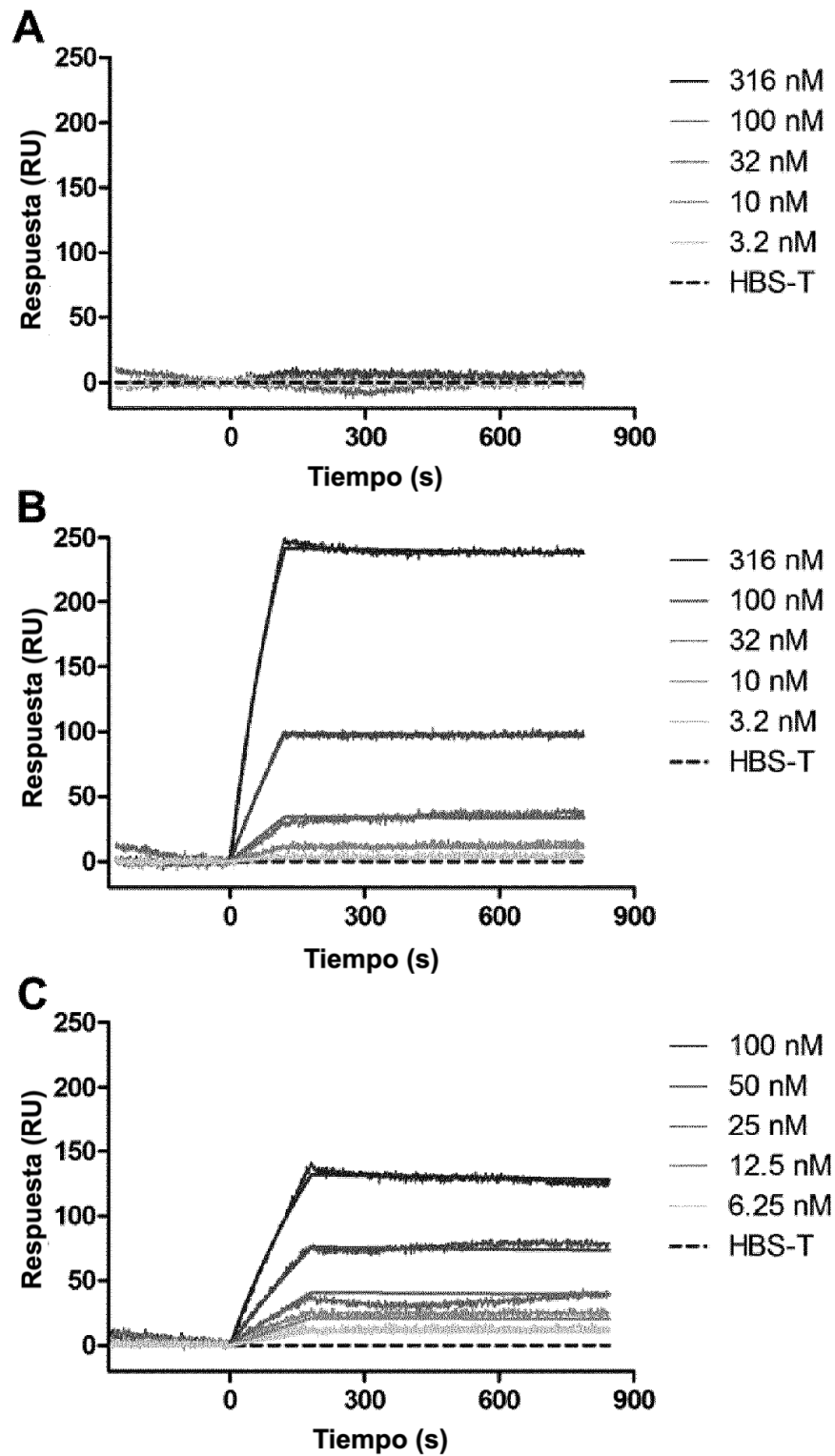


Fig. 11

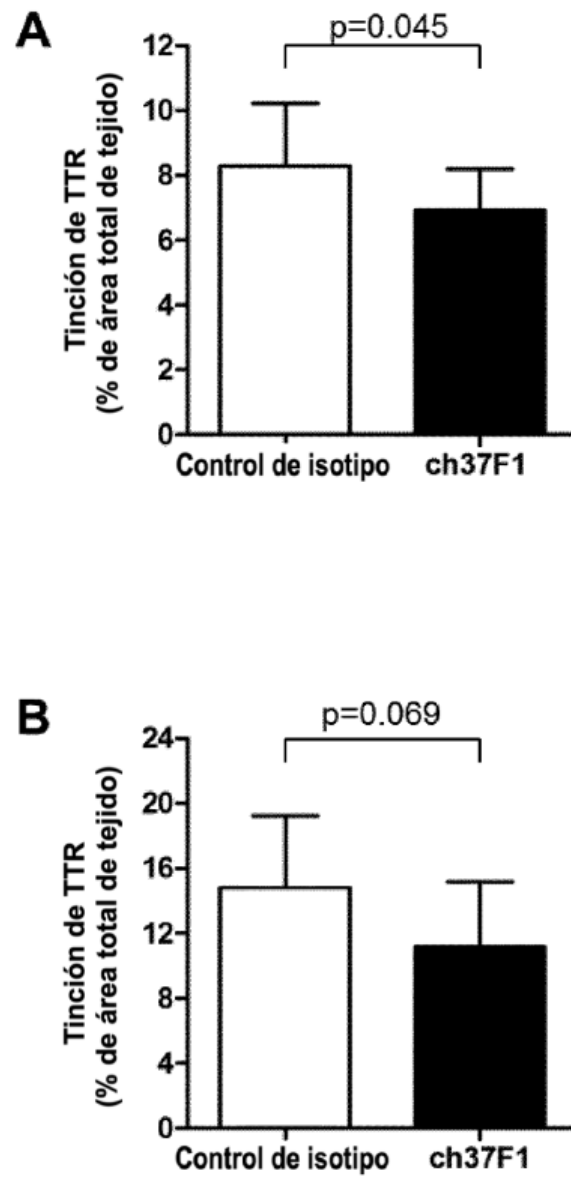


Fig. 12

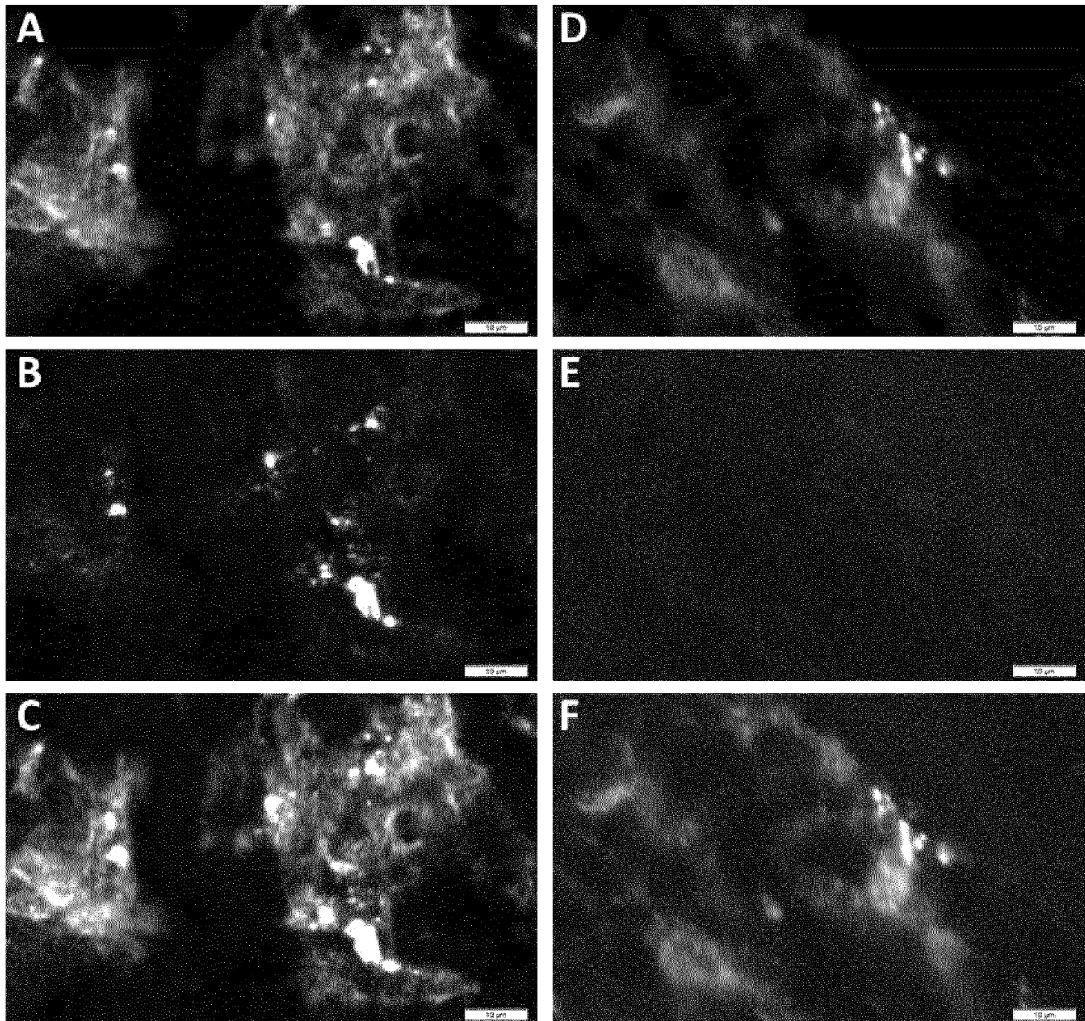


Fig. 13

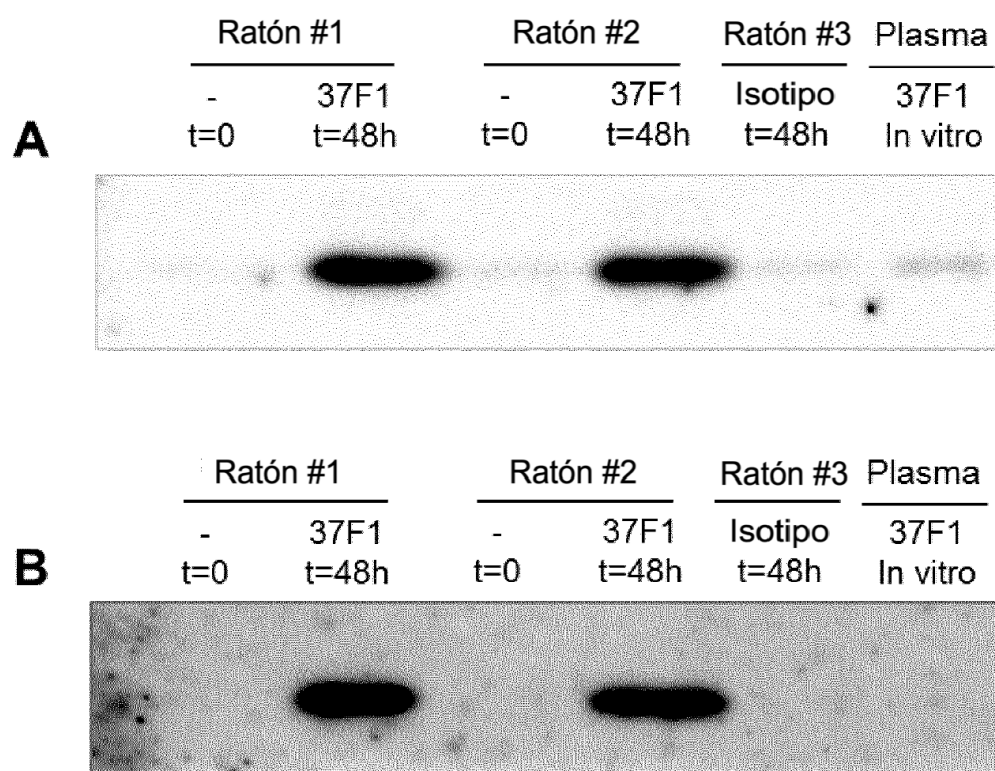


Fig. 14

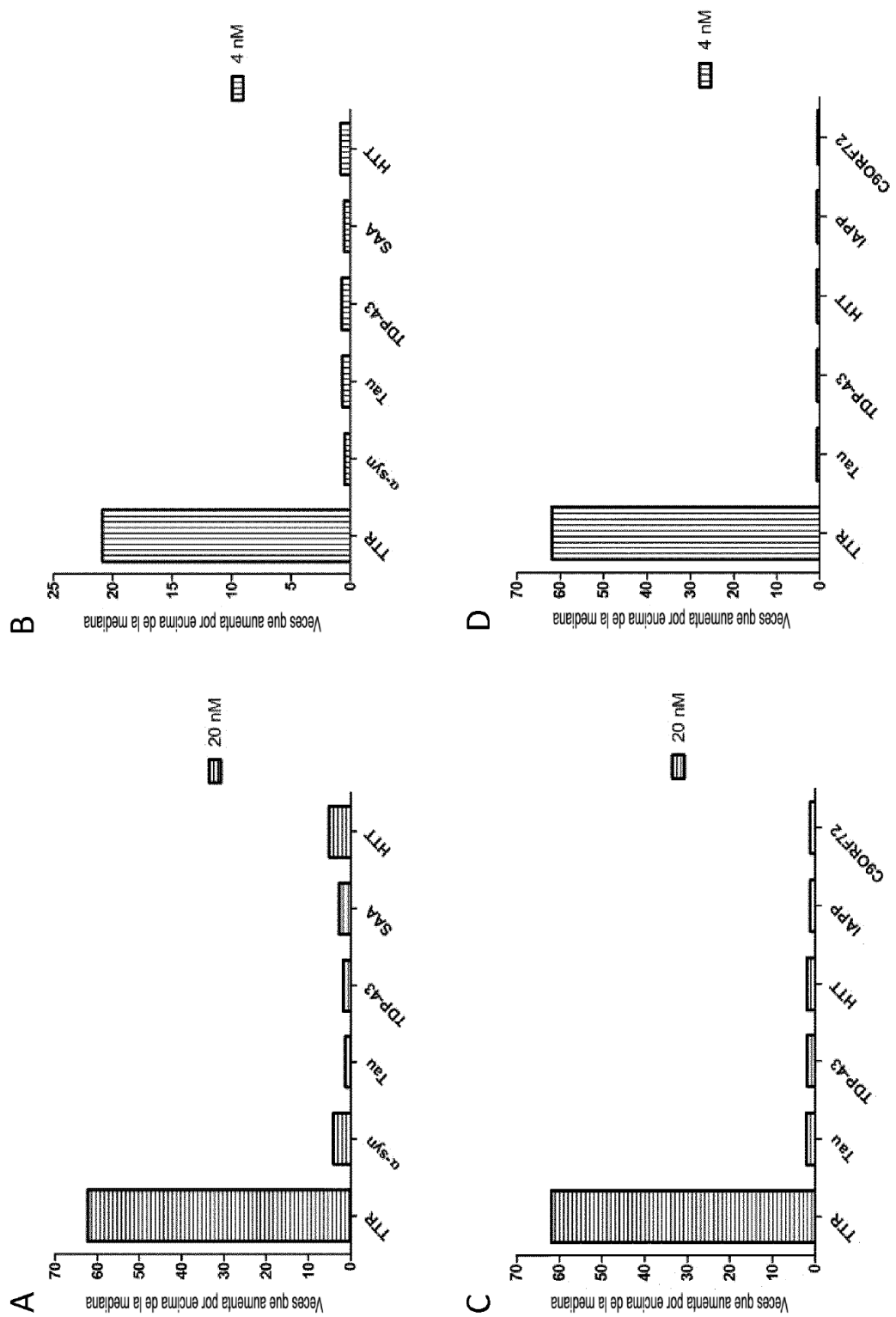


Fig. 15