SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

ENTRADA EN FASE NACIONAL

No. 15-303022- -00000-0000

Fecha: 2015-12-21 16:26:33 Dep: 2020 DIR NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act: 411 PRESENTACION Folios: 10

21. **EXPEDIENTE No.** _____

ANTICUERPOS TEICOICOS ANTI-PARED Y CONJUGADOS

54. **TITULO** _____

_____

_____

_____

51. **CLASIFICACION INTERNACIONAL** _____

71. **SOLICITANTE** GENENTECH, INC.

DOMICILIO SOUTH SAN FRANCISCO, CA, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

74. **APODERADO** JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

22. **BOGOTÁ, D.C.** _____

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 15-303022- -00000-0000
Fecha: 2015-12-21 16:26:33 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act: 411 PRESENTACION Folios: 10

AS. 134.978

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL –PCT

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☐ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☒ Capitulo II

2 DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)

Solicitud Internacional No.	PCT/US2014/040324	Fecha	30.05.2014
Publicación Internacional No.	WO 2014/194247	Fecha	04.12.2014

3 TÍTULO DE LA INVENCIÓN (200 caracteres o espacios máximos)

ANTICUERPOS TEICOICOS ANTI–PARED Y CONJUGADOS

4 CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)

5 SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria

APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL	NOMBRE	IDENTIFICACIÓN	TIPO
1. GENENTECH, INC.			

6 DATOS DEL SOLICITANTE

DIRECCIÓN	1 DNA Way, 94080	No. TELÉFONO	
CIUDAD	South San Francisco	CORREO ELECTRÓNICO	
DEPARTAMENTO/ESTADO	CA	NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN	US
PAÍS DE RESIDENCIA	US		

7 INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria

APELLIDOS	NOMBRES	NACIONALIDAD
1. BROWN	Eric	US
2. DARWISH	Martine	US
3. FLYGARE	John	US
4. HAZENBOS	Wouter	US
5. LEE	Byoung-Chul	US
6. LEHAR	Sophie, M.	US

DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:

8 DATOS INVENTOR (ES)

PAÍS RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
1. US	CA	South San Francisco	c/o Genentech, Inc., 1 DNA Way, 94080
2. US	CA	South San Francisco	c/o Genentech, Inc., 1 DNA Way, 94080
3. US	CA	South San Francisco	c/o Genentech, Inc., 1 DNA Way, 94080
4. US	CA	South San Francisco	c/o Genentech, Inc., 1 DNA Way, 94080
5. US	CA	South San Francisco	c/o Genentech, Inc., 1 DNA Way, 94080
6. US	CA	South San Francisco	c/o Genentech, Inc., 1 DNA Way, 94080

OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)

☒ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja de información complementaria.

9 ☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO

APELLIDOS	NOMBRES	IDENTIFICACIÓN
CADENA SARMIENTO	JUAN PABLO	C.C . 80.410.337 T.P . 57492

DIRECCIÓN	Calle 70A 4 41	No. TELÉFONO	7442200
CIUDAD	Bogotá, D.C.	CORREO ELECTRÓNICO	notificaciones@bc.com.co
PAÍS	CO	No. RADICACIÓN O PROTOCOLO DE PODER GENERAL	

10 DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO

(33) PAÍS DE ORIGEN	CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO	(32) FECHA (AAAA/MM/DD)
1. US	US	61/829,461	2013/05/31
2. US	US	14/284,609	2014/05/22
3. US	US	61/829,466	2013/05/31
4. US	US	PCT/US2014/039113	2014/05/22

11 DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS

Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.

☐ SI ☒ NO

Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.

12 DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES

Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.

☐ SI ☒ NO

Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado o número de registro.

13 REDUCCIÓN DE TASAS

Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.

☐ SI ☒ NO

Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.

Micro, pequeñas y medianas empresas ☐

Universidades públicas o privadas ☐

Entidades sin ánimo de lucro ☐

Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos

14 AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☒ SI ☐ NO

Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.

15	**COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO**	**No.** 15-120193, 15-113357, 15-113358, 15-4808, 15-113324	**Fecha:** 10.11.2015

16 FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL

Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)

17 ANEXOS

Documentación Técnica
Solicitud Internacional en castellano

1. ☒ Descripción — N° de folios: 1-249
2. ☒ Reivindicaciones — N° Reivindicaciones: 107
3. ☒ Dibujos y/o figuras — N° folios: 1-57
4. ☒ Resumen.
5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso.
6. ☒ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.
7. ☐ Arte final 12 x 12.
8. ☒ Anexo formato digital.

Documentación Jurídica

9. ☒ Poderes, si fuera el caso.
10. ☒ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante.
11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso.
12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso.
13. **Reducción de tasas**

Micro, pequeñas o medianas empresas

☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea.

☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.

Universidades públicas o privadas

☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación

Entidades sin ánimo de lucro

☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio.
☒ Hoja de información complementaria.
☐ Otros, especificar:

14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.
17. ☒ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

HOJA DE INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA

1	(12) TIPO DE SOLICITUD	NUMERO DE RADICACIÓN
☒ Patente de invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad		FECHA DE PRESENTACIÓN

4 (71) SOLICITANTE (S)

	APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL	NOMBRE	IDENTIFICACIÓN	TIPO
2.				
3.				
4.				

5 DATOS DEL SOLICITANTE

	PAÍS DE RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
2.				
3.				
4.				

	TELÉFONO	FAX	E-MAIL	NACIONALIDAD
2.				
3.				
4.				

6 (72) INVENTOR (ES)

	APELLIDOS	NOMBRE	NACIONALIDAD
7.	MARIATHASAN	Sanjeev	US
8.	MORISAKI	John Hiroshi	US
9.	PILLOW	Thomas H.	US
10.	STABEN	Leanna	US
11.	VANDLEN	Richard	US
12.	KOEFOED	Klaus	DK
13.	STRANDH	Magnus	DK
14.	ANDERSEN	Peter S.	DK
15.			

7 DATOS INVENTOR (ES)

	DIRECCIÓN	CIUDAD	DEPARTAMENTO/ESTADO	PAÍS RESIDENCIA
7.	c/o Genentech, Inc., 1 DNA Way, 94080	South San Francisco	CA	US
8.	c/o Genentech, Inc., 1 DNA Way, 94080	South San Francisco	CA	US
9.	c/o Genentech, Inc., 1 DNA Way, 94080	South San Francisco	CA	US
10.	c/o Genentech, Inc., 1 DNA Way, 94080	South San Francisco	CA	US
11.	c/o Genentech, Inc., 1 DNA Way, 94080	South San Francisco	CA	US
12.	c/o Symphogen A/S, Elektrovej Building 375, DK-2800	Lyngby		DK
13.	c/o Symphogen A/S, Elektrovej Building 375, DK-2800	Lyngby		DK
14.	Ådalsvej 21A, DK-2720	Vanløse		DK
15.				

9 (30) DECLARACIONES DE PRIORIDAD

	PAÍS DE ORIGEN	CÓDIGO PAÍS	NÚMERO	FECHA (AAAA/MM/DD)
5.				
6.				
7.				
8.				
9.				
10.				

134978 4

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 15 - 120193

Bogotá D.C., Noviembre 04 de 2015 - 18:26:23

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A. NI 860.047.372

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	706310566	04/11/2015	11.010.250.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	7 TTLOS-TRAMITES DE SOL. DE DISENOS INDUSTRIALES	530.000.00	530.000.00
				$530.000.00

SON: **QUINIENTOS TREINTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE*

Responsable: _____
-******-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 15-303022- -00000-0000
Fecha: 2015-12-21 16:26:33 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act: 411 PRESENTACION Folios: 8 10

134778 5

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 15 - 113357

Bogotá D.C., Octubre 16 de 2015 - 09:18:39

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A. NI 860.047.372 RE

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	113268	16/10/2015	7.960.000.00
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	113277	16/10/2015	7.960.000.00
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	113279	16/10/2015	6.534.000.00
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	113293	16/10/2015	1.785.000.00
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	113296	16/10/2015	6.314.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
36	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	32.000.00	1.152.000.00
				$1.152.000.00

SON: **UN MILL&OACUTE;N CIENTO CINCUENTA Y DOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE*

Responsable: _____
- -

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 15-303022- -00000-0000
Fecha: 2015-12-21 16:26:33 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act: 411 PRESENTACION Folios: 10

134978G

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 15 - 113358

Bogotá D.C., Octubre 16 de 2015 - 09:18:39

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A. NI 860.047.372 RE

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	113268	16/10/2015	7.960.000.00
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	113277	16/10/2015	7.960.000.00
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	113279	16/10/2015	6.534.000.00
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	113293	16/10/2015	1.785.000.00
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	113296	16/10/2015	6.314.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
36	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	32.000.00	1.152.000.00
				$1.152.000.00

SON: **UN MILL&OACUTE;N CIENTO CINCUENTA Y DOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE*

Responsable: _____
-*-
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 15-303022- -00000-0000
Fecha: 2015-12-21 16:26:33 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act: 411 PRESENTACION Folios: 10

134978 7

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 15 - 004808

Bogotá D.C., Enero 19 de 2015 - 10:29:15

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A. NI 860.047.372 RE

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
RECIBO DE CA	999999999	4095	15/01/2015		128.000.00
RECIBO DE CA	999999999	4096	15/01/2015		128.000.00
RECIBO DE CA	999999999	4097	15/01/2015		128.000.00
RECIBO DE CA	999999999	4098	15/01/2015		128.000.00
RECIBO DE CA	999999999	4099	15/01/2015		128.000.00
RECIBO DE CA	999999999	4722	19/01/2015		1.949.250.00
RECIBO DE CA	999999999	4795	19/01/2015		862.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
15	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	32.000.00	480.000.00
				$480.000.00

==========

SON: **CUATROCIENTOS OCHENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE*

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 15-303022- -00000-0000
Fecha: 2015-12-21 16:26:33 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act: 411 PRESENTACION Folios: 8 10

1349788

8

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 15 - 113324

Bogotá D.C., Octubre 16 de 2015 - 09:18:39

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A. NI 860.047.372 RE

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	113268	16/10/2015	7.960.000.00
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	113277	16/10/2015	7.960.000.00
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	113279	16/10/2015	6.534.000.00
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	113293	16/10/2015	1.785.000.00
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	113296	16/10/2015	6.314.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
10	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	32.000.00	320.000.00
				$320.000.00

SON: **TRESCIENTOS VEINTE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE*

Responsable: _____
-****-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 15-303022- -00000-0000
Fecha. 2015-12-21 16:26:33 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve. 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 8 10

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 15-303022- -00000-0000

Fecha: 2015-12-21 16:26:33 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act: 411 PRESENTACION Folios: ~~8~~ 10

9

LISTA DE CHEQUEO
ADMISIÓN A TRÁMITE – NUEVAS CREACIONES

MODELO DE UTILIDAD ☐ **Art 33 Decisión 486/00**

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCIÓN PCT ☐ **MODELO DE UTILIDAD PCT** ☐ **Art.33 Decisión 486/00, Circular Única**

- ☐ Indicación que se solicita una PCT
- ☐ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ **(Art. 119 Decisión 486/00)**

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ **(Art. 92 Decisión 486/00)**

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	**TESTIGO DOCUMENTAL**	Folio: 10

Dependencia Jerárquica: DEL PROPIEDAD INDUSTRIAL	**Código**	2000
Dependencia Productora: GRUPO DE NUEVAS CREACIONES	**Código**	2020
Tipo de Radicación: Entrada: **X** Salida: □ Traslado: □ Convenio: □		
Radicador:		

DESCRIPCIÓN DE LA PRUEBA

Nombre de la Serie / Subserie:	Código:
Expediente: 15-303022-0	Solicitante / ***Quejoso / Demandante / otros.***
Prueba excluida: CD	
N°. de Pruebas excluidas: 1	
Fecha de emisión de la Prueba:	

UBICACIÓN DE LA PRUEBA EN LA SECCIÓN DE MATERIAL GRÁFICO

N°. de bloque:		Otras especificaciones:
Nº. de rodante:		
Nº. de estante:		
N°. de archivador:		
Nº. de entrepaño:		
Nº. de gaveta:		
N°. de caja:		

IMPORTANTE:

- El material gráfico ***o especial*** que se encuentra ***dentro o anexo a*** las unidades documentales o expedientes, debe extraerse y llevarse a aquella sección del archivo que se haya dispuesto para conservar documentos en distintos formatos.
- Entiéndase por material gráfico todos aquellos dibujos, croquis, mapas, planos, fotografías, ilustraciones, pictografías, códices, prensa, objetos tridimensionales, entre otros.

Observaciones:

El CD contiene:

*6 archivos PDF procesados y cargados al sistema.

Unidad de Conservación

- ○ Bolsa
- ○ Caja
- ○ Libro
- ○ Sobre
- ○ Tomo
- ○ Otro

Soporte Documental

- ✓ CD
- ○ Disquete
- ○ DVD
- ○ Folleto
- ○ Periódico
- ○ Plano
- ○ Publicación Periódica
- ○ USB
- ○ Otro

JV

ANTICUERPOS TEICOICOS ANTI–PARED Y CONJUGADOS

REFERENCIA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud no provisional, presentada de conformidad con 37 CFR §1.53(b), reivindica el beneficio bajo 35 USC §119(e) de la Solicitud Provisional de EE.UU. Serie Nro. 61/829.461, presentada el 31 de mayo de 2013, la cual se incorpora por referencia en su totalidad.

LISTADO DE SECUENCIAS

La presente solicitud contiene un Listado de Secuencias que ha sido presentado electrónicamente en formato ASCII y que se incorpora por la presente por referencia en su totalidad. Dicha copia ASCII, creada el 20 de mayo de 2014, se denomina P4960R1–WO_SequenceListing.txt y tiene un tamaño de 196.103 bytes.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La invención se refiere a anticuerpos anti–ácido teicoico de pared ("anti–WTA") conjugados con antibióticos tipo rifamicina y al uso de los conjugados anticuerpo–antibiótico resultantes en el tratamiento de enfermedades infecciosas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Las bacterias patogénicas son una causa sustancial de enfermedad y muerte tanto en seres humanos como en animales. En un lugar prominente entre éstas se encuentra *Staphilococcus aureus* (*S. aureus*; SA), que es la causa principal de infecciones bacterianas en los humanos en todo el mundo. *S. aureus* puede causar un rango de enfermedades, que van desde infecciones dérmicas menores hasta enfermedades con riesgo de muerte, tales como neumonía, meningitis, osteomielitis, endocarditis, síndrome de shock tóxico (TSS), bacteremia y sepsis. Su incidencia abarca infecciones de piel, tejidos blandos, sistema respiratorio, huesos, articulaciones, sistema endovascular y heridas. Aún

es una de las cinco causas más comunes de infecciones hospitalarias, y suele ser la causa de infecciones de heridas post–quirúrgicas. Cada año, unos 500.000 pacientes de los hospitales estadounidenses contraer infecciones por estafilococos.

Durante las últimas décadas, la infección por *S. aureus* se ha estado volviendo cada vez más difícil de tratar, en gran parte debido al surgimiento de *S. aureus* resistente a la meticilina (MRSA), que es resistente a todos los antibióticos beta–lactámicos conocidos (Boucher, H.W. *et al.* Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 48, 1–12 (2009)). Las circunstancias son tan agudas que, para el año 2005, la infección por MRSA se reportó como la principal causa de muerte debido a un único agente infeccioso, responsable de más de 15.000 muertes en Estados Unidos (DeLeo, F.R. & Chambers, H.F. Reemergence of antibiotic–resistant Staphilococcus aureus in the genomics era. *The Journal of Clinical Investigation* 119, 2464–2474 (2009)). La vancomicina, el linezolid y la daptomicina se han convertido en los antibióticos de elección para tratar las infecciones invasivas por MRSA (Boucher, H., Miller, L.G. & Razonable, R.R. Serious infections caused by methicilin–resistant Staphilococcus aureus. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 51 Suppl 2, S183–197 (2010)). Sin embargo, también se ha informado sobre una reducida susceptibilidad a la vancomicina y resistencia cruzada a linezolid y daptomicina en cepas clínicas de MRSA (Nannini, E., Murray, B.E. & Arias, C.A. Resistance or decreased susceptibility to glycopeptides, daptomycin, and linezolid in methicilin–resistant Staphilococcus aureus. *Current opinion in pharmacology* 10, 516–521 (2010)). En el tiempo, la dosis de vancomicina necesaria para superar la resistencia se ha elevado a niveles a los que se produce nefrotoxicidad. Por ende,

la mortalidad y la morbilidad a raíz de infecciones invasivas por MRSA siguen siendo altas a pesar de estos antibióticos.

Aunque generalmente se cree que SA es un patógeno extracelular, las investigaciones que datan desde hace al menos 50 años han revelado su capacidad para infectar y sobrevivir en diversos tipos de células huésped, tanto fagocitos profesionales como células no fagocíticas (Gresham, H.D. *et al.* Survival of *Staphilococcus aureus* inside neutrophils contributes to infection. *J Immunol* 164, 3713–3722 (2000); Anwar, S., Prince, L.R., Foster, S.J., Whyte, M.K. & Sabroe, I. The rise and rise of *Staphilococcus aureus*: laughing in the face of granulocytes. *Clinical and Experimental Immunology* 157, 216–224 (2009); Fraunholz, M. & Sinha, B. Intracellular *staphilococcus aureus*: Live–in and let die. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 2, 43 (2012); Garzoni, C. & Kelley, W.L. Return of the Trojan horse: intracellular phenotype switching and immune evasion by *Staphilococcus aureus*. *EMBO molecular medicine* 3, 115–117 (2011)). Esta persistencia intracelular facultativa permite la evasión inmune del huésped, la colonización a largo plazo del huésped, el mantenimiento de un estado crónicamente infectado, y probablemente sea una causa de fracasos clínicos de la terapia antibiótica convencional, y de recaídas luego de ella. Más aún, la exposición de bacterias intracelulares a concentraciones subóptimas de antibióticos puede alentar la emergencia de cepas resistentes a los antibióticos, lo que hace que este problema clínico se agudice. De manera consistente con estas observaciones, el tratamiento de pacientes con infecciones invasivas por MRSA, tales como bacteremia o endocarditis, con vancomicina o daptomicina se asoció con índices de fracaso superiores al 50% (Kullar, R., Davis, S.L., Levine, D.P. & Rybak, M.J. Impact of vancomycin exposure on outcomes in patients with methicilin–resistant *Staphilococcus aureus* bacteremia: support for consensus guidelines suggested targets. *Clinical infectious diseases: an official publication of*

the Infectious Diseases Society of America 52, 975–981 (2011); Fowler, V.G., Jr. *et al.* Daptomycin versus standard therapy for bacteremia and endocarditis caused by *Staphilococcus aureus*. *The New England journal of medicine* 355, 653–665 (2006); Yoon, Y.K., Kim, J.Y., Park, D.W., Sohn, J.W. & Kim, M.J. Predictors of persistent methicilin–resistant *Staphilococcus aureus* bacteraemia in patients treated with vancomycin. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 65, 1015–1018 (2010)). Por lo tanto, una terapia anti–estafilocócica más exitosa debe incluir la eliminación de bacterias intracelulares.

La mayoría de los antibacterianos hoy en día son químicamente modificaciones semisintéticas de distintos compuestos naturales. Éstos incluyen, por ejemplo, los antibacterianos beta–lactámicos, que incluyen las penicilinas (producidas por hongos del género *Penicillium*), las cefalosporinas y los carbapenems. Los compuestos antimicrobianos que aún se aíslan a partir de organismos vivos incluyen los aminoglucósidos, mientras que otros antibacterianos –por ejemplo, las sulfonamidas, las quinolonas y las oxazolidinonas– son producidos únicamente por síntesis química. De acuerdo con esto, muchos compuestos antibacterianos se clasifican según su origen químico/ biosintético en naturales, semisintéticos y sintéticos. Otro sistema de clasificación se basa en la actividad biológica; en esta clasificación, los antibacterianos se dividen en dos grandes grupos según su efecto biológico sobre los microorganismos: los agentes bactericidas matan bacterias, y los agentes bacteriostáticos retardan o detienen el desarrollo bacteriano.

Las ansamicinas son una clase de antibióticos, que incluyen rifamicina, rifampina, rifampicina, rifabutina, rifapentina, rifalazilo, ABI–1657 y sus análogos, que inhiben la ARN polimerasa bacteriana y tienen una potencia excepcional contra bacterias Gram–positivas y Gram–negativas selectivas (Rothstein, D.M., *et al* (2003) Expert Opin. Invest. Drugs 12(2):255–271; US 7342011; US 7271165).

Se han reportado inmunoterapias para prevenir y tratar las infecciones por *S. aureus* (incluidas MRSA). El documento US2011/0262477 se refiere a los usos de las proteínas de adhesión bacterianas Eap, Emp y AdsA como vacunas para estimular la respuesta inmune contra MRSA. El documento WO2000071585 describe anticuerpos monoclonales aislados reactivos contra aislados de cepas específicas de *S. aureus*. El documento US20110059085A1 sugiere una estrategia basada en Ab que utiliza Ab de IgM específicos para uno o varios antígenos capsulares de SA, aunque no se describen anticuerpos reales.

Los ácidos teicoicos (TA) son polisacáridos bacterianos hallados dentro de la pared celular de bacterias Gram–positivas, que incluyen SA. Los ácidos teicoicos de pared (WTA) son aquellos unidos en forma covalente a la capa de peptidoglicano (PDG) de la pared celular; mientras que los ácidos lipoteicoicos (LTA) son aquellos unidos en forma covalente a los lípidos de la membrana citoplásmica (Xia *et al.* (2010) *Intl. J. Med. Microbiol.* 300:148–54). Estos glicopolímeros juegan papeles fundamentales en la supervivencia bacteriana en condiciones desventajosas y en otros procesos celulares básicos. Las estructuras de WTA conocidas varían ampliamente entre las especies bacterianas. Los TA de *S. aureus* se componen de subunidades repetitivas de fosfato de poliol, tales como fosfato de ribitol o fosfato de glicerol. Dada su diversidad y variabilidad estructural, los WTA se consideran blancos atractivos para los anticuerpos, al igual que como vacunas.

Los conjugados anticuerpo–fármaco (ADC), también conocidos como inmunoconjugados, son moléculas quimioterapéuticas dirigidas que combinan propiedades ideales tanto de los anticuerpos como de los fármacos citotóxicos al dirigir a los potentes fármacos citotóxicos a las células tumorales que expresan el antígeno (Teicher, B.A. (2009) *Curr. Cancer Drug Targets* 9:982–1004), con lo cual mejora el índice terapéutico maximizando la eficacia y minimizando la

toxicidad fuera de blanco (Carter, P.J. y Senter P.D. (2008) *The Cancer J.*. 14(3):154–169; Chari, R.V. (2008) *Acc. Chem. Res*. 41:98–107. Los ADC comprenden un anticuerpo dirigido unido en forma covalente, a través de una unidad ligadora, a un resto de fármaco citotóxico. Los inmunoconjugados permiten la administración dirigida de un resto de fármaco a un tumor, y su acumulación intracelular allí, donde la administración sistémica de fármaco no conjugados puede causar niveles inaceptables de toxicidad a las células normales, así como a las células tumorales que se busca eliminar (Polakis P. (2005) *Curr. Opin. Pharmacol.* 5:382–387). El desarrollo efectivo de ADC para un antígeno blanco dado depende de la optimización de parámetros tales como los niveles de expresión de antígeno blanco, la accesibilidad del tumor (Kovtun, Y.V. y Goldmacher V.S. (2007) Cancer Lett. 255:232–240), la selección de anticuerpos (US 7964566), la estabilidad del ligador (Erickson *et al* (2006) Cancer Res. 66(8):4426–4433; Doronina *et al* (2006) Bioconjugate Chem. 17:114–124; Alley *et al* (2008) Bioconjugate Chem. 19:759–765), el mecanismo de acción y la potencia del fármaco citotóxico, la carga del fármaco (Hamblett *et al* (2004) Clin. Cancer Res. 10:7063–7070) y el modo de conjugación ligador–fármaco al anticuerpo (Lyon, R. *et al* (2012) Métodos in Enzym. 502:123–138; Xie *et al* (2006) Expert. Opin. Biol. Ther. 6(3):281–291; Kovtun *et al* (2006) Cancer Res. 66(6):3214–3121; Law *et al* (2006) Cancer Res. 66(4):2328–2337; Wu *et al* (2005) Nature Biotech. 23(9):1137–1145; Lambert J. (2005) Current Opin. in Pharmacol. 5:543–549; Hamann P. (2005) Expert Opin. Ther. Patents 15(9):1087–1103; Payne, G. (2003) Cancer Cell 3:207–212; Trail *et al* (2003) Cancer Immunol. Immunother. 52:328–337; Syrigos y Epenetos (1999) Anticancer Res. 19:605–614).

El concepto de ADC en la terapia contra el cáncer también se ha expandido a la terapia antibacteriana; en este caso, la porción del fármaco es un antibiótico, lo cual da como resultado un conjugado de anticuerpo–antibiótico

(AAC). Los documentos US 5545721 y US 6660267 describen la síntesis de un conjugado de inmunoglobulina–antibiótico no específico que se une a la superficie de las bacterias blanco a través del antibiótico, y a usos de dicho conjugado para el tratamiento de la sepsis. US 7569677 y las patentes relacionadas sugieren proféticamente anticuerpos conjugados con antibióticos que tienen una porción de unión a antígeno específica para un antígeno bacteriano (tal como un polisacárido capsular de SA), pero que carecen de una región constante que reacciona con una proteína de unión a Fc bacteriana (por ejemplo, proteína A estafilocócica).

SÍNTESIS DE LA INVENCIÓN

La invención proporciona composiciones denominadas “conjugados anticuerpo–antibiótico” o “AAC”) que comprenden un anticuerpo conjugado por un enlace covalente con uno o varios restos de antibiótico tipo rifamicina.

Un aspecto de la invención consiste en un anticuerpo monoclonal anti–WTA aislado, que comprende una cadena liviana (L) y una cadena pesada (H), donde la cadena L comprende CDR L1, CDR L2 y CDR L3, y la cadena H comprende CDR H1, CDR H2 y CDR H3, en donde CDR L1, CDR L2 y CDR L3, y CDR H1, CDR H2 y CDR H3 comprenden las secuencias de aminoácidos de las CDR de cada uno de los Ab 4461 (SEC. ID NRO. 1–6), 4624 (SEC. ID NRO. 7–12), 4399 (SEC. ID NRO. 13–18) y 6267 (SEC. ID NRO. 19–24), respectivamente, como se muestra en las Tablas 6A y 6B.

En una forma de realización, el anticuerpo monoclonal anti–WTA aislado comprende una región variable de cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada (VH), en donde la VH comprende al menos un 95% de identidad de secuencia respecto de la longitud de la región VH seleccionada de la secuencia VH de SEC. ID NRO.26, SEC. ID NRO.28, SEC. ID NRO.30, SEC. ID NRO.32 de los anticuerpos 4461, 4624, 4399 y 6267, respectivamente. En una

forma de realización, este anticuerpo comprende además una región variable de cadena L (VL), en donde la VL comprende al menos un 95% de identidad de secuencia respecto de la longitud de la región VL seleccionada de la secuencia VL de SEC. ID NRO.25, SEC. ID NRO.27, SEC. ID NRO.29, SEC. ID NRO.31 de los anticuerpos 4461, 4624, 4399 y 6267, respectivamente. En otras formas de realización, la identidad de secuencia es 96%, 97%, 98%, 99% ó 100%.

En formas de realización más específicas, el anticuerpo comprende:

(i) VL de SEC. ID NRO. 25 y VH de SEC. ID NRO. 26;

(ii) VL de SEC. ID NRO. 27 y VH de SEC. ID NRO. 28;

(iii) VL de SEC. ID NRO. 29 y VH de SEC. ID NRO. 30; o

(iv) VL de SEC. ID NRO. 31 y VH de SEC. ID NRO. 31.

En un aspecto, el Ab de cualquiera de las formas de realización precedentes se une a WTA alfa.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal anti–WTA aislado que comprende una cadena liviana (L) y una cadena pesada (H), donde la cadena L comprende CDR L1, CDR L2 y CDR L3, y la cadena H comprende CDR H1, CDR H2 y CDR H3, en donde la CDR L1, CDR L2 y CDR L3, y CDR H1, CDR H2 y CDR H3 comprenden las secuencias de aminoácidos de las correspondientes CDR de cada uno de los Ab que se muestran en la Figura 14 (SEC. ID NRO. 33–110). En una forma de realización específica, estos Ab se unen con WTA alfa.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal anti–WTA aislado, específicamente anticuerpo monoclonal anti–WTA beta, que comprende una región variable de cadena L (VL), en donde la VL comprende al menos un 95% de identidad de secuencia respecto de la longitud de la región VL seleccionada de la secuencia VL que corresponde a cada uno de los anticuerpos 6078, 6263, 4450, 6297, 6239, 6232, 6259, 6292, 4462, 6265, 6253, 4497 y 4487,

respectivamente, como se muestra en las Figuras 17A–1 a 17A–2 en las posiciones de Kabat 1–107. En formas de realización adicionales, el anticuerpo además comprende una región variable de cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada (VH), en donde la VH comprende al menos un 95% de identidad de secuencia respecto de la longitud de la región VH seleccionada de las secuencias VH correspondientes a cada uno de los anticuerpos 6078, 6263, 4450,6297, 6239, 6232, 6259, 6292, 4462, 6265, 6253, 4497 y 4487, respectivamente, como se muestra en las Figuras 17B–1 a 17B–2 en las posiciones de Kabat 1–113. En una forma de realización más específica del anticuerpo, la VH comprende la secuencia de SEC. ID NRO. 112 y la VL comprende la SEC. ID NRO. 111.

En una determinada forma de realización, el anticuerpo anti–WTA beta aislado es uno en el cual la cadena liviana comprende la secuencia de SEC. ID NRO. 115 y la cadena H, que tiene una cisteína modificada por ingeniería genética, comprende la secuencia de SEC. ID NRO. 116. En otra forma de realización, el anticuerpo es uno en el cual la cadena liviana comprende la secuencia de SEC. ID NRO. 115 y la cadena H, que tiene una cisteína modificada por ingeniería genética, comprende la secuencia de SEC. ID NRO. 117, en donde X es M, I o V. En una forma de realización diferente, la cadena L que comprende la secuencia de SEC. ID NRO.113) se aparea con una cadena H con Cys modificada por ingeniería genética variante de SEC. ID NRO. 117; la variante es una en la cual X es M, I o V.

Otro anticuerpo anti–WTA beta aislado provisto por la invención comprende una cadena pesada y una cadena liviana, en donde la cadena pesada comprende una VH que tiene al menos un 95% de identidad de secuencia con la SEC. ID NRO. 120. En una forma de realización adicional, este anticuerpo además comprende una VL que tiene al menos un 95% de identidad de secuencia con la

SEC. ID NRO. 119. En una forma de realización específica, el anticuerpo anti–WTA beta comprende una cadena liviana y una cadena pesada, en donde la cadena L comprende una secuencia VL de SEC. ID NRO. 119 y la cadena H comprende una secuencia VH de SEC. ID NRO. 120. En una forma de realización incluso más específica, el anticuerpo aislado que se une a WTA beta comprende una cadena L de SEC. ID NRO. 121 y una cadena H de SEC. ID NRO. 122.

Las variantes de cadena H y L anti–WTA beta con Cys modificada por ingeniería genética se pueden aparear en cualquiera de las siguientes combinaciones para formar Ab completos para conjugar con intermediarios de ligador–Abx a fin de generar AAC anti–WTA de la invención. En una forma de realización, la cadena L comprende la secuencia de SEC. ID NRO.121 y la cadena H comprende la secuencia de SEC. ID NRO. 124. En otra forma de realización, el anticuerpo aislado comprende una cadena L de SEC. ID NRO. 123 y una cadena H que comprende una secuencia de SEC. ID NRO.124 o SEC. ID NRO.157. En una forma de realización particular, el anticuerpo anti–WTA beta, así como el AAC anti–WTA beta de la invención, comprende una cadena L de SEC. ID NRO. 123.

Incluso otra forma de realización consiste en un anticuerpo que se une al mismo epítopo que cada uno de los Ab anti–WTA alfa de la Figura 13A y la Figura 13B. También se proporciona un anticuerpo que se une al mismo epítopo que cada uno de los Ab anti–WTA beta de la Figura 14, las Figuras 15A y 15B, y las Figuras 16A y 16B.

En otra forma de realización, los anticuerpos anti–WTA beta y anti–WTA alfa de la presente invención son fragmentos de unión a antígeno que carecen de la región Fc, preferentemente F(ab')2 o F(ab). De esta forma, la presente invención proporciona conjugados de anticuerpo–antibiótico en donde el anticuerpo WTA es un F(ab')2 o F(ab).

En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los anticuerpos divulgados en la presente, y un portador farmacéuticamente aceptable.

En incluso otro aspecto, la invención también proporciona un ácido nucleico aislado que codifica cualquiera de los anticuerpos divulgados en la presente. En incluso otro aspecto, la invención proporciona un vector que comprende un ácido nucleico que codifica cualquier de los anticuerpos divulgados en la presente. En una forma de realización adicional, el vector es un vector de expresión.

La invención además proporciona una célula huésped que comprende un ácido nucleico que codifica cualquiera de los anticuerpos divulgados en la presente. En una forma de realización adicional, la célula huésped es procariota o eucariota.

La invención además proporciona un método para producir un anticuerpo, que comprende cultivar una célula huésped que comprende un ácido nucleico que codifica cualquiera de los anticuerpos divulgados en la presente en condiciones adecuadas para la expresión del ácido nucleico; y recuperar el anticuerpo producido por la célula. En algunas formas de realización, el método además comprende purificar el anticuerpo.

Otro aspecto de la invención consiste en un compuesto conjugado de anticuerpo–antibiótico (AAC) que comprende un anticuerpo anti–ácido teicoico de pared (WTA) de la invención, unido en forma covalente por un ligador peptídico a un antibiótico tipo rifamicina.

Una forma de realización ilustrativa de un compuesto conjugado de anticuerpo–antibiótico tiene la fórmula:

$$Ab-(L-abx)_p$$

en donde:

Ab es el anticuerpo anti–ácido teicoico de pared;

L es el ligador peptídico que tiene la fórmula:

–Str–Pep–Y–

donde Str es una unidad extensora; Pep es un péptido de dos a doce residuos de aminoácidos, e Y es una unidad espaciadora;

abx es el antibiótico tipo rifamicina; y

p es un número entero de 1 a 8.

Los compuestos de conjugados de anticuerpo–antibiótico de la invención pueden comprender un ligador peptídico que es un ligador escindible de proteasa cisteína de *S. aureus*; dicho ligador incluye un ligador escindible de estafopaína B o estafopaína A. En otra forma de realización, el ligador es un ligador escindible de proteasa huésped, preferentemente un ligador escindible de proteasa catepsina B humana.

En una forma de realización, los compuestos de conjugados de anticuerpo–antibiótico de cualquiera de las anteriores comprenden una relación de antibiótico a anticuerpo (AAR) de 2 ó 4.

Otro aspecto de la invención es una composición farmacéutica que comprende un compuesto conjugado de anticuerpo–antibiótico de la invención.

Otro aspecto de la invención es un método para tratar una infección bacteriana mediante la administración a un paciente de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto conjugado de anticuerpo–antibiótico de cualquiera de las formas de realización anteriores. En una forma de realización, el paciente es un ser humano. En una forma de realización, la infección bacteriana es una infección por *Staphilococcus aureus*. En algunas formas de realización, al paciente se le ha diagnosticado una infección por *Staph aureus*. En algunas formas de realización, el tratamiento de la infección bacteriana comprende reducir la carga bacteriana.

La invención además proporciona un método para destruir *Staph aureus* intracelulares en las células huésped de un paciente infectado con *Staph aureus* sin matar las células huésped, mediante la administración de un compuesto de conjugado de antibiótico anti–WTA de cualquiera de las formas de realización anteriores. Se proporciona otro método para matar células bacterianas persistentes (por ejemplo, *Staph A*) *in vivo* poniendo en contacto las bacterias persistenets con un AAC de cualquiera de las formas de realización precedentes.

En otra forma de realización, el método de tratamiento además comprende administrar un segundo agente terapéutico. En una forma de realización adicional, el segundo agente terapéutico es un antibiótico, incluido un antibiótico contra *Staph aureus* en general o MRSA en particular.

En una forma de realización, el segundo antibiótico administrado en combinación con el compuesto conjugado de anticuerpo–antibiótico de la invención se selecciona de las siguientes clases estructurales: (i) aminoglucósidos; (ii) beta–lactámicos; (iii) macrólidos/péptidos cíclicos; (iv) tetraciclinas; (v) fluoroquinolinas/fluoroquinolonas; (vi) y oxazolidinonas.

En una forma de realización, el segundo antibiótico administrado en combinación con el compuesto conjugado de anticuerpo–antibiótico de la invención se selecciona de clindamicina, novobiocina, retapamulina, daptomicina, GSK–2140944, CG–400549, sitafloxacina, teicoplanina, triclosano, naptiridona, radezolid, doxorrubicina, ampicilina, vancomicina, imipenem, doripenem, gemcitabina, dalbavancina y azitromicina.

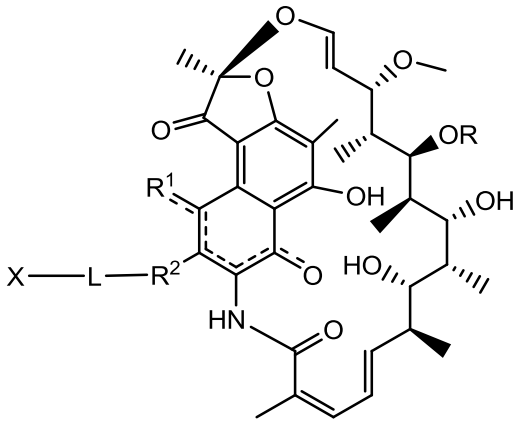
En algunas formas de realización de la presente, la carga bacteriana en el sujeto se reduce hasta un nivel indetectable luego del tratamiento. En una forma de realización, el cultivo sanguíneo del paciente es negativo luego del tratamiento, en comparación con un cultivo sanguíneo positivo antes del tratamiento. En algunas formas de realización de la presente, la resistencia bacteriana en el

sujeto es indetectable o baja. En algunas formas de realización de la presente, el sujeto no responde al tratamiento con meticilina o vancomicina.

Otro aspecto de la invención consiste en un proceso para elaborar un anticuerpo o un compuesto conjugado de anticuerpo–antibiótico de la invención.

Otro aspecto de la invención es un kit para tratar una infección bacteriana, que comprende una composición farmacéutica de la invención e instrucciones de uso.

Otro aspecto de la invención es un intermediario ligador–antibiótico que tiene la Fórmula II:



II

en donde:

las líneas de puntos indican un enlace opcional;

R es H, alquiloC_1–C_{12} o $C(O)CH_3$;

R^1 es OH;

R^2 es CH=N–(heterociclilo), en donde el heterociclilo está opcionalmente sustituido con uno o varios grupos seleccionados independientemente de $C(O)CH_3$, alquiloC_1–C_{12}, heteroariloC_1–C_{12}, heterocicliloC_2–C_{20}, ariloC_6–C_{20} y carbocicliloC_3–C_{12};

o R^1 y R^2 forman un heteroarilo o heterociclilo fusionado de 5 ó 6 miembros, y formando opcionalmente un anillo heteroarilo, heterociclilo, arilo o carbociclilo spiro o fusionado de 6 miembros, en donde el anillo heteroarilo,

heterociclilo, arilo o carbociclilo spiro o fusionado de 6 miembros está opcionalmente sustituido con H, F, Cl, Br, I, alquiloC_1–C_{12} o OH;

L es un ligador peptídico unido a R^2, o el heteroarilo o heterociclilo fusionado formado por R^1 y R^2; y que tiene la fórmula:

$$-Str-Pep-Y-$$

donde Str es una unidad extensora; Pep es un péptido de 2 a 12 residuos de aminoácidos, e Y es una unidad espaciadora; y

X es un grupo funcional reactivo seleccionado de maleimida, tiol, amino, bromuro, bromoacetamido, iodoacetamido, p–toluensulfonato, ioduro, hidroxilo, carboxilo, piridil disulfuro y N–hidroxisuccinimida.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra que la exposición a la vancomicina o rifampicina mata MRSA gradualmente. La vancomicina fue evaluada a 2 µg/ml (cuadrados abiertos) y 20 µg/ml (cuadrados cerrados). La rifampicina fue evaluada a 0,02 µg/ml (triángulos abiertos) y 0,2 µg/ml (triángulos cerrados).

La Figura 2 muestra que las células peritoneales infectadas fueron capaces de transferir la infección a osteoblastos en presencia de vancomicina.

La Figura 3 muestra la pared celular de bacterias Gram–positivas, tales como *S. aureus*, con una representación dibujada de ácidos teicoicos de pared (WTA), ácido lipo–teicoico (LTA) y las vainas de peptidoglucano (PGN) que estabilizan la membrana celular y proporcionan sitios de unión.

La Figura 4 muestra la estructura química y las modificaciones glucosílicas del ácido teicoico de pared (WTA), descritas en detalle en la sección de Definiciones.

La Figura 5 muestra un posible mecanismo de activación farmacológica para conjugados de anticuerpo–antibiótico (AAC). El antibiótico activo (Abx) es liberado luego de la internalización del AAC dentro de las células del mamífero.

Las Figuras 6A y 6B sintetizan las características de los Ab de la selección primaria de una biblioteca de mAb que muestra una unión positiva por ELISA a preparaciones de pared celular de las cepas USA300 o Wood46 de *S. aureus*, como se describe en el Ejemplo 21. De los Ab que se unen a WTA, 4 son específicos de WTA alfa y 13 se unen específicamente a WTA beta.

La Figura 7A muestra un ensayo de macrófagos *in vitro* que demuestra que AAC mata la MRSA intracelular.

La Figura 7B muestra la destrucción intracelular de MRSA (cepa USA300) con 50 µg/ml del tio–S4497–HC–A118C–pipBOR **102** en macrófagos, osteoblastos (MG63), células epiteliales de las vías aéreas (A549) y células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) en comparación con el anticuerpo S4497 anti–WTA no conjugado simple. La línea punteada indica el límite de detección del ensayo.

La Figura 7C muestra la comparación de AAC elaborado con los intermediarios de ligador–antibiótico LA–**51** y LA–**54** (Tabla 2). MRSA fue opsonizada con anticuerpo S4497 solamente o con AAC: AAC–**102** ó AAC–**105** (Tabla 3) a distintas concentraciones, que oscilaron entre 10 µg/ml y 0,003 µg/ml.

La Figura 7D muestra que AAC mata bacterias intracelulares sin dañar los macrófagos.

La Figura 7E muestra la recuperación de USA300 viva desde el interior de los macrófagos a partir de la lisis celular de macrófagos anterior. Se recuperaron pocas *S. aureus* vivas (10.000 veces menos) de los macrófagos infectados con bacterias opsonizadas con S–4497–AAC en comparación con los controles tratados con el anticuerpo simple.

La Figura 8A muestra la eficacia *in vivo* de AAC tio–S4497–HC–A118C–MC–vc–PAB–pipBOR **102** en un modelo de infección intraperitoneal en ratones A/J. Los ratones fueron infectados con MRSA por inyección intraperitoneal y

fueron tratados con 50 mg/kg de anticuerpo S4497 solamente o con 50 mg/kg de AAC **102** (HC–A114C Kabat = HC–A118C EU) por inyección intraperitoneal. Los ratones fueron sacrificados 2 días después de la infección, y la carga bacteriana total fue evaluada en el sobrenadante peritoneal (bacterias extracelulares), en células peritoneales (bacterias intracelulares) o en el riñón.

La Figura 8B muestra un modelo de infección *in vivo,* intravenoso, en ratones A/J. Los ratones fueron infectados con MRSA por inyección intravenosa y fueron tratados con 50 mg/kg de anticuerpo S4497, 50 mg/kg de AAC tio–S4497–HC–A118C–MC–vc–PAB–pipBOR **102,** o con una mezcla simple de 50 mg/kg de anticuerpo S4497 + 0,5 mg/kg de rifamicina libre. La línea punteada gris indica el límite de detección para cada órgano.

La Figura 9A muestra la eficacia del AAC tio–S4497–HC–A118C–MC–vc–PAB–pipBOR **102** en un modelo de infección intravenosa por titulación del AAC S4497–pipBOR.

La Figura 9B muestra que el AAC tio–S4497–HC–A118C–MC–vc–PAB–dimetilpipBOR **105** es más eficaz que el AAC tio–S4497–HC–A118C–MC–vc–PAB–pipBOR **102** en un modelo de infección intravenosa por titulación. Los tratamientos con anticuerpo S4497, AAC **102** o AAC tio–S4497–HC–A118C–MC–vc–PAB–dimetil–pipBOR **112** fueron administrados en las dosis indicadas 30 minutos después de la infección. Los ratones fueron sacrificados 4 días después de la infección, y el número total de bacterias sobrevivientes por ratón (2 riñones combinados) se determinó por colocación en placas.

La Figura 9C muestra que el AAC tio–S4497–HC–A118C–MC–vc–PAB–dimetilpipBOR **105** es más eficaz que el anticuerpo S4497 o el antibiótico dimetilpipBOR **7** solo en un modelo de infección intravenosa. Los ratones CB17.SCID fueron infectados con 2 x 10^7 CFU de MRSA por inyección intravenosa. Un día después de la infección, los ratones fueron tratados con 50

mg/kg de anticuerpo S4497, 50 mg/kg de AAC **105** o con 0,5 mg/kg de dimetil–pipBOR **7** (la dosis equivalente de antibiótico contenida en 50 mg/kg de AAC). Los ratones fueron sacrificados 4 días después de la infección, y el número total de bacterias sobrevivientes por ratón (2 riñones combinados) se determinó por colocación en placas.

La Figura 10A muestra la prevalencia de anticuerpos anti–*S. aureus* en suero humano. Los pacientes infectados con *S. aureus* o los controles normales contienen altas cantidades de anticuerpos séricos específicos de WTA con la misma especificidad que S4497 anti–WTA. La unión de distintas muestras de suero de tipo salvaje (WT) a MRSA que expresaba el antígeno S4497 fue examinada en comparación con la unión a una cepa de mutante MRSA TarM/TarS DKO (doble knockout) que carece de las modificaciones de azúcares que son reconocidas por el anticuerpo S4497.

La Figura 10B muestra que un AAC es eficaz en presencia de niveles fisiológicos de IgG humana (10 mg/ml) en un ensayo de macrófagos *in vitro* con la cepa USA300 de MRSA. El tio–S4497–HC–A118C–MC–vc–PAB–dimetilpipBOR **105** es eficaz en presencia de 10 mg/ml de IgG humana. La cepa USA300 de MRSA fue opsonizada con AAC solamente o con AAC diluido en 10 mg/ml de IgG humana. El número total de bacterias intracelulares sobrevivientes fue evaluado 2 días después de la infección.

La Figura 10C muestra un modelo de infección *in vivo,* que demuestra que AAC es eficaz en presencia de niveles fisiológicos de IgG humana. Los datos combinados provienen de 3 experimentos diferentes que usaron dos preparaciones separadas de AAC tio–S4497–HC–A118C–MC–vc–PAB–dimetilpipBOR **105** o **112**. Los ratones tratados con el AAC tuvieron una reducción de más de 4–log en la carga bacteriana (prueba t de Student, p=0,0005).

La Figura 11A muestra un modelo de infección *in vivo*, que demuestra que AAC es más eficaz que el actual antibiótico estándar de referencia (SOC), la vancomicina, en ratones que son reconstituidos con niveles normales de IgG humana. Los ratones fueron tratados con anticuerpo S4497 (50 mg/kg), vancomicina (100 mg/kg), AAC tio–S4497–HC–A118C–MC–vc–PAB–dimetilpipBOR **105** (50 mg/kg) o con un AAC elaborado con un anticuerpo de control de isotipo que no reconoce MRSA, AAC tio–hu–anti gD 5B5–HC–A118C–MC–vc–PAB–dimetilpipBOR **110** (50 mg/kg).

La Figura 11B muestra la unión relativa de anticuerpos anti–*Staph. aureus* a la cepa USA300 aislada del riñón en un modelo de infección *in vivo*, según se determina por FACS. El anticuerpo S4497 reconoce una modificación de N–acetilglucosamina que está unida al ácido teicoico de pared (WTA) a través de un enlace beta–anomérico en la pared celular de *S. aureus*. El anticuerpo S7578 se une a una modificación de N–acetilglucosamina similar, que está unida a WTA a través de un enlace alfa–anomérico. El anticuerpo rF1 es un anticuerpo anti–MRSA de control positivo que reconoce modificaciones de azúcares halladas en una familia de proteína ancladas en la pared celular que contienen repeticiones de SDR. El anticuerpo gD es una IgG_1 humana de control negativo que no reconoce *S. aureus*.

La Figura 11C muestra un modelo de infección *in vivo*, que demuestra que el AAC tio–S6078–HC A114C–LCWT–MC–vc–PAB–dimetilpipBOR **129** es más eficaz que el anticuerpo anti–WTA simple S4497, de acuerdo con el mismo régimen que en la Figura 11A, en ratones que son reconstituidos con niveles normales de IgG humana. Los ratones fueron tratados con anticuerpo S4497 (50 mg/kg) o con AAC tio–S6078–HC A114C–LCWT–MC–vc–PAB–dimetilpipBOR **129** (50 mg/kg).

La Figura 12 muestra un ensayo de inhibición de crecimiento, que demuestra que AAC no es tóxico para *S. aureus* a menos que el ligador sea escindido por catepsina B. A la izquierda se muestra un ensayo de liberación de catepsina esquemático (Ejemplo 20). El AAC se trata con catepsina B para liberar el antibiótico libre. La cantidad total de actividad antibiótica en el AAC intacto versus el AAC tratado con catepsina B se determina preparando diluciones en serie de la reacción resultante y determinando la dosis mínima de AAC que es capaz de inhibir el crecimiento de *S. aureus*. El gráfico de la parte derecha superior muestra el ensayo de liberación de catepsina para tio–S4497–HC–A118C–MC–vc–PAB–pipBOR **102,** y el gráfico de la parte derecha inferior muestra el ensayo de liberación de catepsina para tio–S4497–HC–A118C–MC–vc–PAB–dimetilpipBOR **105**.

La Figura 13A muestra una alineación de secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena liviana (VL) de cuatro anticuerpos anti–WTA alfa humanos (SEC. ID NROS. 25, 27, 29 y 31, respectivamente, en orden de aparición). Las secuencias de CDR, CDRL1, L2 y L3, según la numeración de Kabat se encuentran subrayadas.

La Figura 13B muestra una alineación de secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada (VH) de los cuatro anticuerpos anti–WTA alfa humanos de la Figura 13A. Las secuencias de CDR, CDR H1, H2 y H3, según la numeración de Kabat se encuentran subrayadas (SEC. ID NROS. 26, 28, 30 y 32, respectivamente, en orden de aparición)..

La Figura 14 muestra las secuencias de CDR de las cadenas L y H de 13 anticuerpos anti–WTA beta humanos (SEC. ID NROS. 33–110).

Las Figuras 15A–1 y 15A–2 muestran una alineación de la cadena L de longitud completa (cadena liviana) del Ab anti–WTA beta 6078 (no modificado) y sus variantes, v2, v3, v4 (SEC. ID NROS. 113, 113, 115, 113, 115, 113, 115 y

115, respectivamente, en orden de aparición). Las secuencias de CDR CDRL1, L2 y L3 según la numeración de Kabat se encuentran subrayadas. Los recuadros muestran los residuos de contacto y los residuos de CDR de acuerdo con Kabat y Chotia. Las variantes de cadena L que contienen una Cys modificada por ingeniería genética se indican con la C en el recuadro negro al final de la región constante (en el residuo de EU Nro. 205 en este caso). La designación de la variante, por ejemplo, v2LC–Cys, significa la variante 2 que contiene una Cys modificada por ingeniería genética en la cadena L. HCLC–Cys significa que cada una de las cadenas H y L contienen una Cys modificada por ingeniería genética. Las variantes 2, 3 y 4 tienen cambios en el comienzo de la cadena H, como se muestra en las Figuras 15B.

Las Figuras 15B–1, 15B–2, 15B–3, 15B–4 muestran una alineación de la cadena H de longitud completa (cadena pesada) del Ab anti–WTA beta 6078 (no modificado) y sus variantes, v2, v3, v4 (SEC. ID NROS. 114, 139–144 y 143, respectivamente, en orden de aparición), las cuales tienen cambios en el comienzo de la cadena H. Las variantes de la cadena H que contienen una Cys modificada por ingeniería genética se indican con la C en el recuadro negro al final de la región constante (en el residuo de EU Nro. 118 en este caso).

Las Figuras 16A–1 y 16A–2 muestran una alineación de la cadena L de longitud completa del Ab anti–WTA beta 4497 (no modificado) y cadenas L con Cys modificada por ingeniería genética (SEC. ID NROS. 121, 123, 145 y 145, respectivamente, en orden de aparición). Las secuencias de CDR, CDRL1, L2 y L3 según la numeración de Kabat se encuentran subrayadas. Los recuadros muestran los residuos de contacto y los residuos de CDR de acuerdo con Kabat y Chotia. Las variantes de cadena L que contienen una Cys modificada por ingeniería genética se indican con la C en el recuadro punteado cerca del final de la región constante (en el residuo de EU Nro. 205 en este caso).

Las Figuras 16B–1, 16B–2, 16B–3 muestran una alineación de la cadena H de longitud completa del Ab anti–WTA beta 4497 (no modificado) y su variante v8 con D alterada en E en la posición de CDR H3 96, con o sin la Cys modificada por ingeniería genética (SEC. ID NROS. 146–147, 157 y 147, respectivamente, en orden de aparición). Las variantes de cadena H que contienen una Cys modificada por ingeniería genética se indican con la C en el recuadro negro al final de la región constante (en el residuo de EU Nro. 118 en este caso).

Las Figuras 17A–1, 17A–2, 17A–3 muestran una alineación de secuencias de aminoácidos de la cadena liviana de longitud completa de los 13 anticuerpos anti–WTA beta humanos (SEC. ID NROS. 113, 158–167, 121 y 168, respectivamente, en orden de aparición). La región variable (VL) se extiende en las posiciones de aminoácidos según Kabat de 1 a 107. Las secuencias de CDR, CDRL1, L2 y L3 según la numeración de Kabat se encuentran subrayadas.

Las Figuras 17B–1 a 17B–6 muestran una alineación de secuencias de aminoácidos de la cadena pesada de longitud completa de los 13 anticuerpos anti–WTA beta humanos de las Figuras 17A–1, 17A–2, 17A–3 (SEC. ID NROS. 114, 169–176, 133–134, 138 y 127, respectivamente, en orden de aparición). La región variable (VH) se extiende en las posiciones de aminoácidos según Kabat 1–113. Las secuencias de CDR, CDR H1, H2 y H3 según la numeración de Kabat se encuentran subrayadas. La posición 118 de Eu en la cadena H marcada con un asterisco se puede cambiar por Cys para la conjugación del fármaco. Los residuos señalados en negro se pueden reemplazar por otros residuos que no afecten la unión a antígeno, a fin de evitar la desamidación, la isomerización de ácido aspártico, la oxidación o la glucosilación unida a N.

La Figura 18A muestra la unión de mutantes de Ab 4497 a la pared celular de *S. aureus*, según se analiza por ELISA.

La Figura 18B muestra una comparación de Ab 4497 y sus mutantes (SEC. ID NROS. 177, 177, 177–178, 178–179, 179–180, 180 y 180, respectivamente, en orden de aparición) en las posiciones de aminoácidos destacadas y su potencia relativa de unión a antígeno según se evalúa por ELISA.

La Figura 19 muestra los resultados del análisis FACS de Ab 6078 WT y sus mutantes que se unen a la cepa deficiente en proteína A de USA300 (USA300–SPA), como se describe en el Ejemplo 23. Los mutantes mostraron una unión no alterada con *S. aureus*.

La Figura 20 muestra que el tratamiento previo con 50 mg/kg de anticuerpos libres no es eficaz en un modelo de infección intravenosa. Se administró una única dosis del vehículo de control (PBS) o 50 mg/kg de anticuerpos por inyección intravenosa a ratones Balb/c 30 minutos antes de la infección con 2 x 10^7 CFU de USA300. Los grupos de tratamiento incluyeron un anticuerpo de control de isotipo que no se une con *S. aureus* (gD), un anticuerpo dirigido contra la modificación beta del ácido teicoico de pared (4497) o un anticuerpo dirigid contra la modificación alfa del ácido teicoico de pared (7578). Los ratones de control recibieron tratamiento dos veces por día con 110 mg/kg de vancomicina por inyección intraperitoneal (Vanco).

La Figura 21 y la Figura 22 muestran que los AAC dirigidos contra la modificación beta del ácido teicoico de pared o la modificación alfa del ácido teicoico de pared son eficaces en un modelo de infección intravenosa que usa ratones reconstituidos con niveles normales de IgG humana. Los ratones CB17.SCID fueron reconstituidos con IgG humana usando un régimen posológico optimizado para producir niveles constantes de al menos 10 mg/ml de IgG humana en suero y fueron infectados con 2 x 10^7 CFU de USA300 por inyección intravenosa. El tratamiento se inició 1 día después de la inyección con control sólo

de búfer (PBS), 60 mg/kg de AAC beta–WTA (AAC **136**) o 60 mg/kg de AAC alfa–WTA (AAC **155**).

La Figura 23A y la Figura 23B muestran la síntesis del intermediario ligador–antibiótico **51** a partir de 2–nitrobenceno–1,3–diol **1**.

La Figura 24 muestra la síntesis del intermediario ligador–antibiótico MC–vc–PAB–dimetilpipBOR **54** a partir de benzoxazino rifamicina protegida con TBS **4**.

La Figura 25A y la Figura 25B muestran la síntesis de dimetil pipBOR **7** a partir de (5–fluoro–2–nitro–1,3–fenilen)bis(oxi)bis(metilen)dibenceno **9**.

La Figura 26 muestra la estructura de un sustrato de péptido FRET para validación de la escisión, mal–K(TAMRA)GGAFAGGGK(fluoresceína) (SEC. ID NRO.: 125) que conteine los residuos más abundantes en P1, P2 y P3 a partir de la detección de actividad de proteasa REPLi. Los residuos Gly acommpañantes de la estructura de péptido REPLi FRET se conservaron. Un grupo maleimida tiol–reactivo en el término N permitió la conjugación a anticuerpos con cisteínas reactivas. Tras la escisión del péptido FRET, se pierde el efecto de extinción y se observa un aumento de la fluorescencia.

La Figura 27 muestra la estructura de tioFAB S4497–MC–GGAFAGGG–(pipBOR) ("péptido central" divulgado como SEC. ID NRO.: 126), un compuesto herramienta usado para identificar fracciones activas que contienen la proteasa de interés. Mal–GGAFAGGG–DNA31 ("péptido central" divulgado como SEC. ID NRO.: 126) se conjugó a THIOFAB 4497. THIOFABs contienen una cisteína reactiva. La proteasa de *S. aureus* escindió el terminal C del ligador a Ala, con lo cual liberó Gly–Gly–Gly–(pipBOR).

La Figura 28 y la Figura 29 muestran que los AAC de Mal–K(tamra)GGAFAGGGK(fluoresceína) (SEC. ID NRO.: 125) son escindidos en Wood46 (Figura 28) y USA300 (Figura 29) cuando se conjugan a un anticuerpo

que se une a *S. aureus* (tio–S4497) y no cuando se conjugan a un anticuerpo que no se une a *S. aureus* (tio–trastuzumab). La intensidad de fluorescencia se midió en el tiempo de tioMAB 4497 mal–K(tamra)GGAFAGGGK(fluoresceína) (SEC. ID NRO.: 125) incubado con cultivos log fase de Wood46 y USA300 MRSA. Los conjugados de péptido tioMAB 4497 FRET hechos de mal–K(TAMRA)GGAFAGGGK(fluoresceína) (SEC. ID NRO.: 125) de la Figura 26 muestran un aumento de la fluorescencia en ambas cepas, lo cual indica que el ligador experimental es escindido por una proteasa de *S. aureus* y que la proteasa está presente en la cepa clínicamente relevante de MRSA, USA300 (Figura 29). La densidad celular afecta la velocidad de escisión, la cual se produce más temprano en cultivos de mayor densidad celular (10^8 células/ml). El conjugado de control de isótopo (tio–trastuzumab) no mostró un aumento de la fluorescencia en ninguna condición.

La Figura 30 muestra dos ligadores optimizados para la escisión de estafopaína B en AAC. Los ligadores se optimizaron por escisión por estafopaína B, incluyendo preferencias de residuos por P4 y P1'. Los ligadores se diseñaron usando datos de la selección REPLi. Se agregó QSY7 al término C de cada ligador para que actuara como reemplazo de antibiótico.

La Figura 31 muestra los resultados del ensayo de macrófagos, que demuestra que el AAC escindible por estafopaína es capaz de matar bacterias intracelulares. La cepa USA300 de *S. aureus* se incubó con distintas dosis (100 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml o 0,1 ug/ml) de anticuerpo S4497 solo, tio–S4497 HC WT (v8), LC V205C–MC–vc–PAB–(dimetilpipBOR) AAC–192 o tio–S4497 HC v1–MP–LAFG–PABC–(piperazinoBOR) ("péptido central" divulgado como SEC. ID NRO.: 128) AAC–193 para permitir la unión de los AAC a las bacterias (Figura 31). Luego de 1 hora de incubación, las bacterias opsonizadas se alimentaron a macrófagos murinos y se incubaron a 37 ºC durante 2 horas para permitir la

fagocitosis. Luego de completada la fagocitosis, la mezcla de infección se reemplazó por medio de crecimiento normal suplementado con 50 ug/ml de gentamicina para matar toda bacteria extracelular remanente, y el número total de bacterias intracelulares sobrevivientes se determinó 2 días después por colocación de diluciones en serie de los lisados de macrófagos en placas de agar de soja tríptico. El AAC escindible por estafopaína fue capaz de matar USA300 intracelular con una potencia similar a la del AAC escindible por catepsina B. La línea de puntos gris indica el límite de detección del ensayo (10 CFU/cavidad).

La Figura 32 muestra los resultados del ensayo de macrófagos, que demuestra que el AAC escindible por estafopaína es capaz de matar bacterias intracelulares. Los AAC apuntan a la destrucción antibiótica de *S. aureus* a través de la unión específica de antígeno del anticuerpo. La cepa Wood46 de *S. aureus* se eligió para este experimento ya que no expresa la proteína A, una molécula que se une a la región Fc de los anticuerpos IgG. La cepa Wood46 de *S. aureus* se incubó con 10 µg/ml o 0,5 µg/ml de anticuerpo S4497, AAC de control de isotipo que contiene un ligador escindible de catepsina B tio–trastuzumab HC A118C–MC–vc–PAB–(dimetil–pipBOR) AAC–101, tio–S4497 HC WT (v8), LC V205C–MC–vc–PAB–(dimetilpipBOR) AAC–192, AAC de control de isotipo que contiene un ligador escindible de estafopaína tio–trastuzumab HC A118C–MP–LAFG–PABC–(piperazinoBOR) ("péptido central" divulgado como SEC. ID NRO.: 128), o tio–S4497 HC v1–MP–LAFG–PABC–(piperazinoBOR) ("péptido central" divulgado como SEC. ID NRO: 128) AAC–193 durante 1 hora para permitir la unión de los AAC a las bacterias. Para limitar la unión no específica de los AAC, las bacterias opsonizadas fueron centrifugadas, lavadas una vez y resuspendidas en búfer antes de ser alimentadas a macrófagos murinos. Luego de completada la fagocitosis, la mezcla de infección se reemplazó por medio de crecimiento normal suplementado con 50 µg/ml de gentamicina para matar toda bacteria extracelular

remanente, y el número total de bacterias intracelulares sobrevivientes se determinó 2 días después por colocación de diluciones en serie de los lisados de macrófagos en placas de agar de soja tríptico. El AAC 4497 que contenía un ligador escindible por estafopaína fue capaz de matar todas las bacterias intracelular detectables, mientras que el AAC de control de isotipo no mostró actividad.

Las Figuras 33 y 34 muestran que un AAC de estafopaína AAC es activo *in vivo* en un modelo de infección intravenosa murino. Los ratones CB17.SCID fueron reconstituidos con IgG humana usando un régimen de dosificación optimizado para obtener niveles constantes de al menos 10 mg/ml de IgG humana en suero. Los ratones fueron tratados con anticuerpo 4497 (50 mg/kg), AAC–215 con ligador escindible de estafopaína (50 mg/kg) o un control de isotipo, AAC anti–gD que contenía un ligador escindible de estafopaína (50 mg/kg). Los ratones recibieron una dosis única de AAC–215 el Día 1 post–infección por inyección intravenosa. El número total de bacterias sobrevivientes en 2 riñones (Figura 33) o en el corazón (Figura 34) se determinó por colocación en placas.

Las Figuras 35 y 36 muestran los resultados del ensayo de macrófagos *in vitro* para el AAC tio–S6078. En la Figura 35, el AAC tio–S6078.v4.HC–WT, LC–Cys–MC–vc–PAB–(dimetilpipBOR) fue efectivo para destruir bacterias intracelulares en dosis de 0,5 µg/ml o mayores, con una carga antibiótica de 2,0 (AAC–173) o 3,9 (AAC–171) de antibióticos dimetilpipBOR (LA–54) por antibiótico tio–S6078. En la Figura 36, tio–S6078.v4.HC–WT, LC–Cys–MC–vc–PAB–(piperazBOR) fue efectivo para destruir bacterias intracelulares en dosis de 0,5 µg/ml o superiores, con una carga antibiótica de 1,8 (AAC–174) o 3,9 (AAC–172) de antibióticos piperazBOR (LA–65) por antibiótico tio–S6078.

Las Figuras 37 y 38 muestran los resultados de la eficacia *in vivo* del AAC tio–S6078 en el modelo de infección intravenosa murino. Los ratones CB17.SCID

fueron reconstituidos con IgG humana usando un régimen de dosificación optimizado para obtener niveles constantes de al menos 10 mg/ml de IgG humana en suero. Los ratones fueron infectados con USA300 y tratados con vehículo de control (PBS), tio–S6078.v4.HC–WT, LC–Cys–MC–vc–PAB–(dimetilpipBOR) AAC con una carga antibiótica de 2,0 (AAC–173) o 3,9 (AAC–171) de antibióticos dimetilpipBOR (LA–54) por anticuerpo tio–S6078 (Figura 37) y tio–S6078.v4.HC–WT, LC–Cys–MC–vc–PAB–(piperazBOR) con una carga antibiótica de 1,8 (AAC–174) o 3,9 (AAC–172) de antibióticos piperazBOR (LA–65) por anticuerpo tio–S6078 (Figura 38). Los ratones recibieron una dosis única de AAC el Día 1 post–infección por inyección intravenosa y fueron sacrificados el Día 4 post–infección. El número total de bacterias sobrevivientes en 2 riñones se determinó por colocación en placas. El tratamiento con AAC que contenía una carga antibiótica menor redujo la carga bacteriana en aproximadamente 1.000 veces, y el tratamiento con el AAC que contenia una carga antibiótica mayor redujo la carga bacteriana en más de 10.000 veces.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS FORMAS DE REALIZACIÓN DE LA INVENCIÓN

A continuación se hará referencia en detalle a ciertas formas de realización de la invención, cuyos ejemplos se ilustran en las estructuras y fórmulas acompañantes. Aunque la invención se describirá en conjunto con las formas de realización enumeradas, incluyendo métodos, materiales y ejemplos, dicha descripción no es limitativa, y la invención cubre todas las alternativas, modificaciones y equivalentes, ya sean generalmente conocidos o incorporados en la presente. En caso de que una o varias de las publicaciones bibliográficas, patentes y materiales similares incorporados difieran o contradigan esta solicitud, incluyendo, aunque sin limitaciones, los términos definidos, el uso de los términos,

las técnicas descritas o similares, esta solicitud tendrá prevalencia. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado que comúnmente entiende el especialista en el arte al cual pertenece esta invención. El especialista en el arte reconocerá muchos métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos en la presente, que se podrían usar en la práctica de la presente invención. La presente invención no se limita en modo alguno a los métodos y materiales descritos.

Todas las publicaciones, solicitudes de patentes, patentes y demás referencias mencionadas en la presente se incorporan por referencia en su totalidad.

I. TÉCNICAS GENERALES

Las técnicas y los procedimientos que se describen o a los cuales se hace referencia en la presente generalmente son bien conocidos y comúnmente empleados usando la metodología convencional por el especialista en el arte, tal como, por ejemplo, las metodologías ampliamente utilizadas descritas en Sambrook *et al*., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual,* 3d edition (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel, *et al*. eds., (2003)); la serie *Métodos in Enzymology* (Academic Press, Inc.): *PCR 2: A Practical Approach* (M.J. MacPherson, B.D. Hames y G.R. Tailor eds. (1995)), Harlow y Lane, eds. (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, y *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney, ed. (1987)); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait, ed., 1984); *Métodos in Molecular Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J.E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney), ed., 1987); *Introduction to Cell and Tissue Culture* (J.P. Mather y P.E. Roberts, 1998) Plenum Press; *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doile, J.B. Griffiths, y D.G. Newell, eds., 1993–8) J. Wiley y Sons; *Handbook of Experimental*

Immunology (D.M. Weir y C.C. Blackwell, eds.); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J.M. Miller y M.P. Calos, eds., 1987); *PCR: The Polymerase Chain Reaction* (Mullis *et al*., eds., 1994); *Current Protocols in Immunology* (J.E. Coligan *et al*., eds., 1991); *Short Protocols in Molecular Biology* (Wiley and Sons, 1999); *Immunobiology* (C.A. Janeway y P. Travers, 1997); *Antibodies* (P. Finch, 1997); *Antibodies: A Practical Approach* (D. Catty., ed., IRL Press, 1988–1989); *Monoclonal Antibodies: A Practical Approach* (P. Shepherd y C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); *Using Antibodies: A Laboratory Manual* (E. Harlow y D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); *The Antibodies* (M. Zanetti y J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); y *Cancer: Principles and Practice of Oncology* (V.T. DeVita *et al*., eds., J.B. Lippincott Company, 1993).

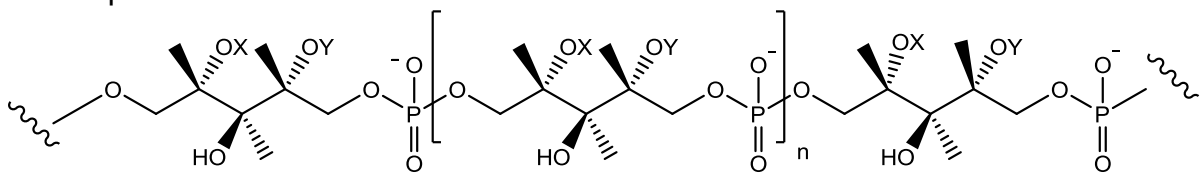
La nomenclatura usada en esta solicitud se basa en la nomenclatura sistemática IUPAC, a menos que se indique lo contrario. A menos que se definan de otro modo, los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado que comúnmente entiende el especialista en el arte al que pertenece esta invención, y son consistentes con: Singleton *et al* (1994) *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology*, 2nd Ed., J. Wiley & Sons, New York, NY; y Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) *Immunobiology*, 5th Ed., Garland Publishing, New York.

II. DEFINICIONES

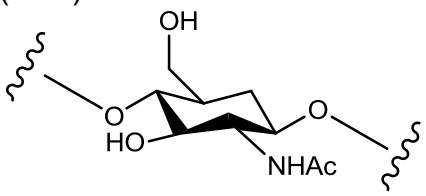
Cuando se indica el número de sustituyentes, el término "*uno o varios*" se refiere al rango desde un sustituyente hasta el mayor número posible de sustitución, es decir, el reemplazo de un hidrógeno hasta el reemplazo de todos los hidrógenos por sustituyentes. El término "*sustituyente*" denota un átomo o un grupo de átomos que reemplazan un átomo de hidrógeno en la molécula parental. El término "*sustituido*" denota que un grupo especificado tiene uno o varios

sustituyentes. Cuando cualquier grupo puede llevar múltiples sustituyentes y se proporciona una variedad de posibles sustituyentes, los sustituyentes se seleccionan independientemente y no es necesario que sean los mismos. El término "*insustituido*" significa que el grupo especificado no lleva sustituyentes. El término "*opcionalmente sustituido*" significa que el grupo especificado es insustituido o sustituido con uno o varios sustituyentes, independientemente seleccionados del grupo de posibles sustituyentes. Cuando se indica el número de sustituyentes, el término "*uno o varios*" significa desde un sustituyente hasta el mayor número posible de sustitución, es decir, el reemplazo de un hidrógeno hasta el reemplazo de todos los hidrógenos por sustituyentes.

El término "ácido teicoico de pared" (WTA) significa glucopolímeros aniónicos que están unidos en forma covalente con peptidoglicano a través de una unión de fosfodiéster al C6 hidroxilo de los azúcares del ácido N–acetil murámico. Aunque la estructura química precisa puede variar entre los organismos, en una forma de realización, WTA es un ácido ribitol teicoico con unidades de repetición de uniones de 1,5–fosfodiéster de D–ribitol y D–alanil éster en la posición 2 y sustituyentes glicosilo en la posición 4. Los grupos glicosilo pueden ser N–acetilglucosaminil α (alfa) o β (beta), como están presentes en *S. Aureus*. Los hidroxilos en las repeticiones de alditol/fosfato de alcohol de azúcar están sustituidos por ésteres de D–alanina catiónicos y monosacáridos, tales como N–acetilglucosamina. En un aspecto, los sustituyentes hidroxilo incluyen D–alanila y alfa (α) o beta (β) GlcNHAc. En un aspecto específico, WTA comprende un compuesto de fórmula:



donde las líneas onduladas indican unidades de unión de repetición o los sitios de unión de polialditol–P o el peptidoglicano, donde X es D–alanila o –H; e Y es α (alfa)–GlcNHAc o β (beta)–GlcNHAc.



GlcNHAc

En *S. aureus*, la WTA se une en forma covalente al 6–OH del ácido N–acetil murámico (MurNAc) a través de un disacárido compuesto por N–acetilglucosamina (GlcNAc)–1–P y N–acetilmanoseamina (ManNAc), al cual le siguen dos o tres unidades de glicerol–fosfatos. El polímero de WTA real está entonces compuesto por 11–40 unidades repetidoras de ribitol–fosfato (Rbo–P). La síntesis paso a paso de WTA es iniciada primero por la enzima denominada TagO, y las cepas de *S. aureus* que carecen del gen TagO (por deleción artificial del gen) no elaboran ningún WTA. Las unidades repetidoras se pueden adaptar adicionalmente con D–alanina (D–Ala) en C2–OH y/o con N–acetilglucosamina (GlcNAc) en la posición C4–OH a través de uniones α– (alfa) o β–(beta) glucosídicas. Dependiendo de la cepa de *S. aureus* o de la fase de crecimiento de las bacterias, las uniones glucosídicas podrían ser α –, β– o una mezcla de ambos anómeros.

El término “antibiótico” (abx o Abx) incluye cualquier molécula que inhiba específicamente el crecimiento o que destruya microorganismos tales como bacteria, pero que no sea letal para el huésped en la concentración y el intervalo de dosis empleados. En un aspecto específico, un antibiótico es no tóxico para el huésped en la concentración y los intervalos de dosis empleados. Los antibióticos efectivos contra las bacterias se pueden clasificar ampliamente como bactericidas (es decir, que matan directamente) o bacteriostáticos (es decir, que evitan la

división). Los antibióticos anti–bacterias se pueden clasificar además en antibióticos de reducido espectro o de amplio espectro. Un antibiótico de amplio espectro es aquél que es efectivo contra un amplio rango de bacterias, que incluyen bacterias tanto Gram–positivas como Gram–negativas, a diferencia de un antibiótico de espectro reducido, que es efectivo contra un rango menor o contra familias específicas de bacterias. Los ejemplos de antibióticos incluyen: (i) aminoglucósidos, por ejemplo, amikacina, gentamicina, kanamicina, neomicina, netilmicina, estreptomicina, tobramicina, paromicina, (ii) ansamicinas, por ejemplo, geldanamicina, herbimicina, (iii) carbacefems, por ejemplo, loracarbef, (iv), carbapenems, por ejemplo, ertapenum, doripenem, imipenem/cilastatina, meropenem, (v) cefalosporinas (primera generación), por ejemplo, cefadroxilo, cefazolina, cefalotina, cefalexina, (vi) cefalosporinas (segunda generación), por ejemplo, ceflaclor, cefamandol, cefoxitina, cefprozilo, cefuroxima, (vi) cefalosporinas (tercera generación), por ejemplo, cefixima, cefdinir, cefditoren, cefoperazona, cefotaxima, cefpodoxima, ceftazidima, ceftibuten, ceftizoxima, ceftriaxona, (vii) cefalosporinas (cuarta generación), por ejemplo, cefepima, (viii), cefalosporinas (quinta generación), por ejemplo, ceftobiprol, (ix) glucopéptidos, por ejemplo, teicoplanina, vancomicina, (x) macrólidos, por ejemplo, axitromicina, claritromicina, diritromicina, eritromicina, roxitromicina, troleandomicina, telitromicina, espectinomicina, (xi) monobactams, por ejemplo, axtreonam, (xii) penicilinas, por ejemplo, amoxicilina, ampicilina, axlocilina, carbenicilina, cloxacilina, dicloxacilina, flucloxacilina, mezlocilina, meticilina, nafcilina, oxacilina, penicilina, peperacilina, ticarcilina, (xiii) polipéptidos antibióticos, por ejemplo, bacitracina, colistina, polimixina B, (xiv) quinolonas, por ejemplo, ciprofloxacina, enoxacina, gatifloxacina, levofloxacina, lemefloxacina, moxifloxacina, norfloxacina, orfloxacina, trovafloxacina, (xv) sulfonamidas, por ejemplo, mafenida, prontosilo, sulfacetamida, sulfametizol, sulfanilamida, sulfasalazina, sulfisoxazol,

trimetoprima, trimetoprima–sulfametoxazol (TMP–SMX), (xvi) tetraciclinas, por ejemplo, demeclociclina, doxiciclina, minociclina, oxitetraciclina, tetraciclina y (xvii) otros, tales como arspenamina, cloranfenicol, clindamicina, lincomicina, etambutol, fosfomicina, ácido fusídico, furazolidona, isoniazid, linezolid, metronidazol, mupirocina, nitrofurantoína, platensimicina, pirazinamida, quinupristina/dalfopristina, rifampina/rifampicina o tinidazol.

Según se usa en la presente, el término “anticuerpo WTA” se refiere a cualquier anticuerpo que se une a WTA, ya sea WTA alfa o WTA beta. Los términos “anticuerpo anti–ácido teicoico de pared alfa” o “anticuerpo anti–WTA alfa” o “anti–αWTA” o “anticuerpo anti–αGlcNac WTA” se usan de manera indistinta para hacer referencia a un anticuerpo que se une específicamente al ácido teicoico de pared (WTA) alfa. De manera similar, los términos “anticuerpo anti–ácido teicoico de pared beta” o “anticuerpo anti–WTA beta” o “anti–βWTA” o “anticuerpo anti–βGlcNac WTA” se usan de manera indistinta para hacer referencia a un anticuerpo que se une específicamente al ácido teicoico de pared (WTA) beta. Los términos “anticuerpo anti–*Staph*” y “un anticuerpo que se une a *Staph*” se refieren a un anticuerpo que es capaz de unirse a un antígeno sobre *Staphilococcus aureus* (“*Staph*” o “*S. aureus*”) con suficiente afinidad para que el anticuerpo sea útil como agente de diagnóstico y/o tratamiento contra *Staph*. En una forma de realización, el grado de unión de un anticuerpo anti–*Staph* con una proteína no *Staph* no relacionada es de menos de aproximadamente 10% de la unión del anticuerpo a MRSA, según se mide, por ejemplo, a través de un radioinmunoensayo (RIA). En ciertas formas de realización, un anticuerpo que se une a *Staph* tiene una constante de disociación (Kd) ≤ 1 μM, ≤ 100 nM, ≤ 10 nM, ≤ 5 Nm, ≤ 4 nM, ≤ 3 nM, ≤ 2 nM, ≤ 1 nM, ≤ 0,1 nM, ≤ 0,01 nM ó ≤ 0,001 nM (por ejemplo, 10^{-8} M o menos, por ejemplo de 10^{-8} M a 10^{-13} M, por ejemplo, de 10^{-9} M

a 10^{-13} M). En ciertas formas de realización, un anticuerpo anti–*Staph* se une a un epítopo de *Staph* que se conserva entre *Staph* de diferentes especies.

El término "*Staphilococcus aureus* resistente a la meticilina*"* (MRSA), alternativamente conocido como *Staphilococcus aureus* resistente a múltiples fármacos o *Staphilococcus aureus* resistente a la oxacilina (ORSA), se refiere cualquier cepa de *Staphilococcus aureus* que es resistente a los antibióticos beta–lactámicos, los cuales incluyen a las penicilinas (por ejemplo, meticilina, dicloxacilina, nafcilina, oxacilina, etc.) y las cefalosporinas. "*Staphilococcus aureus* sensible a la meticilina*" (MSSA)* se refiere a cualquier cepa de *Staphilococcus aureus* que es sensible a los antibióticos beta–lactámicos.

El término "concentración inhibitoria mínima" ("MIC") se refiere a la concentración más baja de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo luego de la incubación hasta el día siguiente. Se conocen ensayos para determinar la MIC. Se describe un método en el Ejemplo 18 a continuación.

El término "anticuerpo" se usa en la presente en su sentido más amplio y abarca específicamente anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, dímeros, multímeros, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno de ellos (Miller *et al* (2003) J. of Immunology 170:4854–4861). Los anticuerpos pueden ser murinos, humanos, humanizados, quiméricos o derivados de otras especies. Un anticuerpo es una proteína generada por el sistema inmunológico, que es capaz de reconocer y unirse a un antígeno específico (Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) Immuno Biology, 5th Ed., Garland Publishing, New York). Un antígeno blanco generalmente tiene numerosos sitios de unión, también denominados epítopos, reconocidos por CDR en múltiples anticuerpos. Cada anticuerpo que se une específicamente con un epítopo diferente tiene una

estructura diferente. Así, un antígeno puede ser reconocido y enlazado por más de un correspondiente anticuerpo. Un anticuerpo incluye una molécula de inmunoglobulina de longitud completa o una porción inmunológicamente activa de una molécula de inmunoglobulina de longitud completa, es decir, una molécula que contiene un sitio de unión a antígeno que se une inmunoespecíficamente con un antígeno de un blanco de interés o una parte de éste, donde dichos blancos incluyen, aunque sin limitaciones, células cancerígenas o células que producen anticuerpos autoinmunes asociados con una enfermedad autoinmune, una célula infectada o un microorganismo, tal como una bacteria. La inmunoglobulina (Ig) divulgada en la presente puede ser de cualquier isotipo, excepto IgM (por ejemplo, IgG, IgE, IgD e IgA), y subclase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Las inmunoglobulinas se pueden derivar de cualquier especies. En un aspecto, la Ig es de origen humano, murino o de conejo. En una forma de realización específica, la Ig es de origen humano.

La “clase” de un anticuerpo se refiere al tipo de dominio constante o región constante que posee su cadena pesada. Existen cinco clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varios de ellos se pueden dividir además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgA_1 e IgA_2. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α, δ, ε, γ y μ, respectivamente.

Los “anticuerpos nativos” se refieren a moléculas de inmunoglobulina naturales con diversas estructuras. Por ejemplo, los anticuerpos de IgG nativos son glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltones, compuestas por dos cadenas livianas idénticas y dos cadenas pesadas idénticas que tienen enlaces de disulfuro. Del término N al término C, cada cadena pesada tiene una región variable (VH), también llamada dominio variable pesado o dominio variable de cadena pesada, seguido por tres dominios constantes (CH1,

CH2 y CH3). De manera similar, del término N al término C, cada cadena liviana tiene una región variable (VL), también llamada dominio variable liviano o dominio variable de cadena liviana, seguido por un dominio liviano constante (CL). La cadena liviana de un anticuerpo se puede asignar a uno de dos tipos, llamados kappa (κ) y lambda (λ), sobre la base de la secuencia de aminoácidos de su dominio constante.

El términos “anticuerpo de longitud completa”, “anticuerpo intacto” y “anticuerpo entero” se usan en la presente de manera indistinta para referirse a un anticuerpo que tiene una estructura sustancialmente similar a una estructura de anticuerpo nativo o que tiene cadenas pesadas que contienen una región Fc según se define en la presente.

Un "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo se refiere a una molécula distinta de un anticuerpo intacto, que comprende una porción de un anticuerpo intacto que se une al antígeno al cual se une el anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, aunque no a modo de limitación, Fv, Fab, Fab', Fab’–SH, $F(ab')_2$; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena única (por ejemplo, scFv); y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

El término "anticuerpo monoclonal", según se usa en la presente, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que componen la población son idénticos y/o se unen al mismo epítopo, excepto por posibles anticuerpos variantes, por ejemplo, que contienen mutaciones naturales o que surgen durante la producción de una preparación de anticuerpo monoclonal (por ejemplo, la variación natural en la glucosilación), donde tales variantes generalmente están presentes en cantidades menores. Una de dichas posibles variantes para anticuerpos IgG1 es la escisión de la lisina C–terminal (K) de la

región constante de cadena pesada. A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales, que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en un antígeno. De esta forma, el modificador “monoclonal” indica el carácter del anticuerpo como obtenido a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se debe interpretar como que requiere la producción del anticuerpo mediante ningún método en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se usan de acuerdo con la presente invención se pueden elaborar mediante varias técnicas, que incluyen, aunque sin limitaciones, el método de hibridoma, métodos de ADN recombinante, métodos de despliegue de fagos y métodos que utilizan animales transgénicos que contienen la totalidad o parte de los loci de inmunoglobulina humana, donde dichos métodos y demás métodos ilustrativos para preparar anticuerpos monoclonales se describen en la presente. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos ya que se pueden sintetizar sin que se contaminen con otros anticuerpos.

El término "anticuerpo quimérico” se refiere a un anticuerpo en el cual una porción de la cadena pesada y/o liviana se deriva de una fuente o especie particular, mientras que el resto de la cadena pesada y/o liviana se deriva de una fuente o especie diferente.

Un “anticuerpo humano” es aquel que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un humano o una célula humana, o derivada de una fuente no humana que utiliza repertorios de anticuerpos humanos u otras secuencias que codifican anticuerpos humanos. Esta definición de un anticuerpo humano específicamente excluye un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión a antígeno no humanos.

Un “anticuerpo humanizado” se refiere a un anticuerpo quimérico que comprende residuos de aminoácidos de HVR no humanas y residuos de aminoácidos de FR humanas. En ciertas formas de realización, un anticuerpo humanizado comprende sustancialmente todos o al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los cuales todos o sustancialmente todos los HVR (por ejemplo, CDR) corresponden a aquellos de un anticuerpo no humano, y todas o sustancialmente todas las FR corresponden a aquellos de un anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado puede comprender al menos una porción de una región constante de anticuerpo derivada de un anticuerpo humano. Una “forma humanizada” de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo no humano, se refiere a un anticuerpo que se ha sometido a humanización.

El término “región variable” o “dominio variable” se refiere al dominio de una cadena pesada o liviana de anticuerpo, que está involucrado en la unión del anticuerpo con el antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y cadena liviana (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo nativo generalmente tienen estructuras similares, y cada dominio comprende cuatro regiones de marco (FR) conservadas y tres regiones hipervariables (HVR) (véase, por ejemplo, Kindt *et al*. Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman y Co., página 91 (2007)). Un solo dominio VH o VL puede ser suficiente para conferir especificidad de unión a antígeno. Más aún, los anticuerpos que se unen a un antígeno en particular se pueden aislar usando un dominio VH o VL a partir de un anticuerpo que se une con el antígeno para revisar una biblioteca de dominios VL o VH complementarios, respectivamente. Véase, por ejemplo, Portolano *et al*., J. Immunol. 150:880–887 (1993); Clarkson *et al*., Nature 352:624–628 (1991).

El término “región hipervariable”, “HVR” o “HV”, cuando se usa en la presente, se refiere a las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en la secuencia (“regiones determinantes de complementariedad” o

"CDR") y/o formar bucles estructuralmente definidos y/o contienen los residuos de contacto con antígeno ("contactos con antígeno"). En general, los anticuerpos comprenden seis HVR: tres en el VH (H1, H2, H3) y tres en el VL (L1, L2, L3). En los anticuerpos nativos, H3 y L3 muestran la mayor diversidad de las seis HVR, y se cree que H3, en particular, juega un papel único al conferir una fina especificidad a los anticuerpos. Véase, por ejemplo, Xu *et al*., Immunity 13:37–45 (2000); Johnson y Wu, en Métodos in Molecular Biology 248:1–25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003). De hecho, los anticuerpos de camélidos naturales que consisten en una cadena pesada sólo son funcionales y estables en ausencia de una cadena liviana (Hamers–Casterman *et al*. (1993), Nature 363:446–448; Sheriff *et al*. (1996), Nature Struct. Biol. 3:733–736.

Varias delineaciones de HVR se usan y están comprendidas en la presente. Las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de Kabat se basan en la variabilidad de secuencia y son las más comúnmente usadas (Kabat *et al*., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Chotia se refiere en cambio a la ubicación de los bucles estructurales (Chotia y Lesk, (1987) J. Mol. Biol. 196:901–917). Para los contactos con antígenos, remítase a MacCallum *et al*. *J. Mol. Biol.* 262: 732–745 (1996). Las HVR de AbM representan un punto medio entre las HVR de Kabat y los bucles estructurales de Chotia, y son usadas por el software de modelaje de anticuerpos AbM de Oxford Molecular. Las HVR de "contacto" se basan en un análisis de las estructuras cristalinas complejas disponibles. Los residuos de cada una de estas HVR se señalan a continuación:

Bucle	Kabat	AbM	Chotia	Contacto
L1	L24–L34	L24–L34	L26–L32	L30–L36
L2	L50–L56	L50–L56	L50–L52	L46–L55

L3	L89–L97	L89–L97	L91–L96	L89–L96
H1	H31–H35B	H26–H35B	H26–H32	H30–H35B (numeración de Kabat)
H1	H31–H35	H26–H35	H26–H32	H30–H35 (numeración de Chotia)
H2	H50–H65	H50–H58	H53–H55	H47–H58
H3	H95–H102	H95–H102	H96–H101	H93–H101

Las HVR pueden comprender “HVR extendidas” de la siguiente manera: 24–36 o 24–34 (L1), 46–56 o 50–56 (L2) y 89–97 o 89–96 (L3) en el VL, y 26–35 (H1), 50–65 o 49–65 (H2) y 93–102, 94–102 o 95–102 (H3) en el VH. A menos que se indique lo contrario, los residuos de HVR, los residuos de CDR y otros residuos del dominio variable (por ejemplo, residuos de FR) se numeran en la presente de acuerdo con Kabat *et al*., *supra*.

La expresión “numeración de residuos de dominio variable según Kabat” o “numeración de posición de aminoácidos según Kabat”, y sus variaciones, se refiere al sistema de numeración usado para los dominios variables de cadena pesada o los dominios variables de cadena liviana de la compilación de anticuerpos en Kabat *et al*., *supra*. Usando este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineales real puede contener menos aminoácidos o aminoácidos adicionales correspondientes a un acortamiento de una FR o HVR del dominio variable, o a la inserción en ella. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir una única inserción de aminoácido (residuo 52a de acuerdo con Kabat) luego del residuo 52 de H2 y residuos insertados (por ejemplo, residuos 82a, 82b y 82c, etc., de acuerdo con Kabat) luego del residuo 82 de FR de cadena pesada. La numeración de Kabat de los residuos se puede determinar para un anticuerpo dado por alineación en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia “estándar” numerada por Kabat.

"Marco" o "FR" se refiere a residuos de dominio variable distintos de residuos de región hipervariable (HVR). La FR de un dominio variable generalmente consiste en cuatro dominios FR: FR1, FR2, FR3 y FR4. Por consiguiente, las secuencias de HVR y FR generalmente aparecen en la siguiente secuencia en VH (o VL): FR1–H1(L1)–FR2–H2(L2)–FR3–H3(L3)–FR4.

Un "marco humano aceptor", a los fines de la presente, es un marco que comprende la secuencia de aminoácidos de un marco de dominio variable de cadena liviana (VL) o un marco de dominio variable de cadena pesada (VH) derivado de un marco de inmunoglobulina humano o un marco de consenso humano, según se define a continuación. Un marco humano aceptor "derivado de" un marco de inmunoglobulina humano o un marco de consenso humano puede comprender la misma secuencia de aminoácidos de éste, o puede contener cambios en la secuencia de aminoácidos. En algunas formas de realización, el número de cambios de aminoácidos es de 10 o menos, 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos, o 2 o menos. En algunas formas de realización, el marco humano aceptor de VL es idéntico en secuencia a la secuencia de marco de inmunoglobulina humano de VL o la secuencia de marco de consenso humano.

Un "marco de consenso humano" es un marco que representa los residuos de aminoácidos más comunes en una selección de secuencias de marco VL o VH de inmunoglobulina humana. En general, la selección de secuencias VL o VH de inmunoglobulina humana se hace a partir de un subgrupo de secuencias de dominio variable. En general, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat *et al*., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91–3242, Bethesda MD (1991), vols. 1–3. En una forma de realización, para el VL, el subgrupo es un subgrupo kappa I como en Kabat *et al*.,

supra. En una forma de realización, para el VH, el subgrupo es un subgrupo III como en Kabat *et al*., *supra*.

"Afinidad" se refiere a la fuerza de la sumatoria total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su compañero de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique lo contrario, según se usa en la presente, "afinidad de unión" se refiere una afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre los miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su compañero Y generalmente se puede representar por la constante de disociación (Kd). La afinidad se puede medir mediante métodos comunes conocidos en el arte, incluidos aquellos divulgados en la presente.

Un "madurado por afinidad" se refiere a un anticuerpo con una o varias alteraciones en una o varias regiones hipervariables (HVR), en comparación con un anticuerpo parental que no posee dichas alteraciones, donde dichas alteraciones dan por resultado una mejora de la afinidad del anticuerpo por el antígeno.

El término "epítopo" se refiere al sitio particular en una molécula de antígeno al cual se une un anticuerpo.

Un "anticuerpo que se une al mismo epítopo" como anticuerpo de referencia se refiere a un anticuerpo que bloquea la unión del anticuerpo de referencia con su antígeno en un ensayo de competencia en un 50% o más y, por el contrario, el anticuerpo de referencia bloquea la unión del anticuerpo con su antígeno en un ensayo de competencia en un 50% o más. En la presente se proporciona un ejemplo de ensayo de competencia.

Un "anticuerpo simple" se refiere a un anticuerpo que no está conjugado a un resto heterólogo (por ejemplo, un resto citotóxico) o radiomarca. El anticuerpo simple puede estar presente en una formulación farmacéutica.

Las “funciones efectoras” se refieren a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc de un anticuerpo, las cuales varían con el isotipo del anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen: unión de C1q y citotoxicidad dependiente de complemento (CDC); unión de receptor de Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC); fagocitosis; sub–regulación de receptores de superficie celular (por ejemplo, receptores de células B); y activación de células B.

La “citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo”, o ADCC, se refiere a una forma de citotoxicidad en la cual la Ig secretada unida a receptores de Fc (FcRs) presentes en ciertas células citotóxicas (por ejemplo, células asesinas naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) permite que estas células efectoras citotóxicas se unan específicamente con una célula blanco que porta un antígeno y posteriormente maten la célula blanco con citotoxinas. Los anticuerpos “arman” las células citotóxicas y se requieren para matar la célula blanco mediante este mecanismo. Las células primarias para mediar ADCC, células NK, expresan Fcγ(gamma)RIII solamente, mientras que los monocitos expresan Fcγ(gamma)RI, Fcγ(gamma)RII y Fcγ(gamma)RIII. La expresión de Fc en células hematopoiéticas se sintetiza en la Tabla 3, página 464 de Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 457–92 (1991). Para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés, se puede realizar un ensayo de ADCC *in vitro*, tal como el que se describe en US 5.500.362 o US 5.821.337. Las células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células asesinas naturales (NK). En forma alternativa o adicional, la actividad de ADCC de la molécula de interés se puede evaluar *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el divulgado en Clynes *et al*., PNAS USA 95:652–656 (1998).

"Fagocitosis" se refiere a un proceso mediante el cual un patógeno es tragado o internalizado por una célula huésped (por ejemplo, macrófago o neutrófilo). Los fagocitos median la fagocitosis a través de tres vías: (i) receptores de superficie celular directos (por ejemplo, lectinas, integrinas y receptores depuradores) (ii) receptores mejorados por complemento – que usan complemento (incluidos CRI, receptor para C3b, CR3 y CR4) para unirse e ingerir patógenos opsonizados por complemento, y (iii) receptores de Fc mejorados por anticuerpo – que usan anticuerpo (incluidos FcγgammaRI, FcγgammaRIIA y FcγgammaRIIIA) para unir partículas opsonizadas por anticuerpo que luego son internalizadas y se funden con lisosomas para convertirse en fagolisosomas. En la presente invención, se cree que esta vía (iii) juega un papel significativo en la administración de los agentes terapéuticos de AAC anti–MRSA a los leucocitos infectados, por ejemplo, neutrófilos y macrófagos (Phagocytosis of Microbes: complexity in Action by D. Underhill and A Ozinsky. (2002) Annual Review of Immunology, Vol 20:825).

"Citotoxicidad dependiente de complemento", o "CDC", se refiere a la lisis de una célula blanco en presencia de un complemento. La activación de la vía de complemento clásica se inicia por la unión del primer componente del sistema de complemento (C1q) a los anticuerpos (de la correspondiente subclase), los cuales se unen a su antígeno cognado. Para evaluar la activación de complemento, se puede realizar un ensayo de CDC, por ejemplo, como se describe en Gazzano–Santoro *et al*., J. Immunol. Métodos 202: 163 (1996).

El término "región Fc" se usa en la presente para definir una región C–terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina. El término incluye regiones Fc de secuencia nativa y regiones Fc variantes. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina pueden variar, la región Fc de cadena pesada de IgG humana usualmente se define de modo que se extienda desde un

residuo de aminoácido en la posición Cys226, o desde Pro230, hasta su término carboxilo. La lisina C–terminal (residuo 447 de acuerdo con el sistema de numeración de EU, también llamado índice de EU, como se describe en Kabat *et al*., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991) de la región Fc se puede eliminar, por ejemplo, durante la producción o purificación del anticuerpo, o por ingeniería genética recombinante del ácido nucleico que codifica una cadena pesada del anticuerpo. Por consiguiente, una composición de anticuerpos intactos puede comprender poblaciones de anticuerpo con todos los residuos K447 removidos, poblaciones de anticuerpo sin ningún residuo K447 removido, y poblaciones de anticuerpo que tienen una mezcla de anticuerpos con y sin el residuo K447. El término “receptor de Fc” o “FcR” también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto. Guyer *et al*., J. Immunol. 117: 587 (1976) y Kim *et al*., J. Immunol. 24: 249 (1994). Los métodos para medir la unión a FcRn son conocidos (véase, por ejemplo, Ghetie y Ward, Immunol. Today 18: (12): 592–8 (1997); Ghetie *et al*., Nature Biotechnology 15 (7): 637–40 (1997); Hinton *et al*., J. Biol. Chem. 279(8): 6213–6 (2004); WO 2004/92219 (Hinton *et al*.). La unión a FcRn *in vivo* y la vida media sérica de polipéptidos de unión de alta afinidad FcRn humanos se puede someter a ensayo, por ejemplo, en líneas celulares de ratones transgénicos o humanas transfectadas que expresan FcRn humano, o en primates a los cuales se administran los polipéptidos que tienen una región Fc variante. WO 2004/42072 (Presta) describe variantes de anticuerpo que mejoran o disminuyen la unión a FcRs. Véase también, por ejemplo, Shields *et al*., J. Biol. Chem. 9(2): 6591–6604 (2001).

El carbohidrato unido a la región Fc se puede alterar. Los anticuerpos nativos producidos por células de mamífero típicamente comprenden un

oligosacárido biantenario ramificado que generalmente está unido por un enlace N a Asn297 del dominio CH2 de la región Fc. Véase, por ejemplo, Wright *et al*. (1997) TIBTECH 15:26–32. El oligosacárido puede incluir diversos carbohidratos, por ejemplo, manosa, N–acetil glucosamina (GIcNAc), galactosa y ácido siálico, así como una fucosa unida a un GIcNAc en la "raíz" de la estructura del polisacárido biantenario. En algunas formas de realización, se pueden hacer modificaciones del oligosacárido en una IgG a fin de crear IgG con determinadas propiedades adicionalmente mejoradas. Por ejemplo, se proporcionan modificaciones de anticuerpos que tienen una estructura de carbohidrato que carece de fucosa unida (directa o indirectamente) a una región Fc. Dichas modificaciones pueden tener una función ADCC mejorada. Véase, por ejemplo, US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Los ejemplos de publicaciones relacionadas con modificaciones de anticuerpos "defucosilados" o "deficientes en fucosa" incluyen: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki *et al*., J. Mol. Biol. 336: 1239–1249 (2004); Yamane–Ohnuki *et al*. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004). Los ejemplos de líneas celulares capaces de producir anticuerpos defucosilados incluyen células CHO Lee 13 deficientes en fucosilación de proteína (Ripka *et al*. Arch. Biochem. Biophys. 249:533–545 (1986); Publicación de Solicitud de Patente Estadounidense Nro. 2003/0157108 Al, Presta, L; y WO 2004/056312 Al, Adams *et al*., especialmente en el Ejemplo 11) y líneas celulares *knockout*, tales como el gel alfa–1,6–fucosiltransferasa, FUT8, células CHO *knockout* (véase, por ejemplo, Yamane–Ohnuki *et al*., Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004); Kanda, Y. *et al*, Biotechnol. Bioeng., 94(4):680–688 (2006); y WO2003/085107).

Un “anticuerpo aislado” es aquel que ha sido separado de un componente de su entorno natural. En algunas formas de realización, un anticuerpo se purifica hasta más del 95% o 99% de pureza, según se determina, por ejemplo, por técnicas electroforéticas (por ejemplo, SDS–PAGE, enfoque isoeléctrico (IEF), electroforesis capilar) o cromatográficas (por ejemplo, HPLC de intercambio iónico o HPLC de fase inversa). Para obtener una revisión de los métodos de evaluación de la pureza de anticuerpos, véase, por ejemplo, Flatman *et al*., J. Chromatogr. B 848:79–87 (2007).

Un “ácido nucleico aislado” se refiere a una molécula de ácido nucleico que ha sido separada de un componente de su entorno natural. Un ácido nucleico aislado incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que comúnmente contienen la molécula de ácido nucleico, pero la molécula de ácido nucleico está presente extracromosómicamente o en una ubicación cromosómica que es diferente de su ubicación cromosómica natural.

“Ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo anti–WTA beta” se refiere a una o varias moléculas de ácido nucleico que codifican cadenas pesadas y livianas de anticuerpo, incluidas aquellas moléculas de ácido nucleico en un único vector o en vectores separados, y aquellas moléculas de ácido nucleico presentes en una o varias ubicaciones en una célula huésped.

Según se usa en la presente, el término "se une específicamente con" o es "específico para" se refiere a interacciones medibles y reproducibles tales como la unión entre un blanco y un anticuerpo, lo que determina la presencia del blanco en presencia de una población heterogénea de moléculas, incluidas moléculas biológicas. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente con un blanco (que puede ser un epítopo) es un anticuerpo que se une a este blanco con mayor afinidad, avidez, facilidad y/o duración en comparación con otros blancos. En una forma de realización, el grado de unión de un anticuerpo a un blanco no

relacionado con WTA–beta es menor a aproximadamente 10% de la unión del anticuerpo al blanco, según se mide, por ejemplo, por un radioinmunoensayo (RIA). En ciertas formas de realización, un anticuerpo que se une específicamente con WTA beta tiene una constante de disociación (Kd) ≤ 1 μM, ≤ 100 nM, ≤ 10 nM, ≤ 1 nM o ≤ 0,1 nM. En ciertas formas de realización, un anticuerpo se une específicamente con un epítopo que se conserva de una especie diferente. En otra forma de realización, la unión específica puede incluir una unión exclusiva, aunque no la requiere.

"Afinidad de unión" generalmente se refiere a la fuerza de la sumatoria total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su compañero de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique lo contrario, según se usa en la presente, "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su compañero Y generalmente se puede representar mediante la constante de disociación (Kd). La afinidad se puede medir mediante métodos comunes conocidos en el arte, que incluyen aquellos descritos en la presente. Los anticuerpos de baja afinidad generalmente se unen al antígeno lentamente y tienden a disociarse con rapidez, mientras que los anticuerpos de alta afinidad generalmente se unen al antígeno más rápido y tienden a permanecer unidos durante más tiempo. Se conoce una variedad de métodos para medir la afinidad de unión en el arte, cualquiera de los cuales se puede usar a los fines de la presente invención. Las formas de realización ilustrativas y ejemplares específicas para medir la afinidad de unión se describen en lo que sigue.

En una forma de realización, el "Kd" o "valor Kd" de acuerdo con esta invención se mide mediante un ensayo de unión a antígeno radiomarcado (RIA)

realizado con la versión Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno, como describe el siguiente ensayo. La afinidad de unión en solución de Fab por el antígeno se mide equilibrando Fab con una concentración mínima de antígeno marcado con ^{125}I en presencia de una serie de titulación de antígeno no marcado, y capturando luego el antígeno unido con una placa recubierta con anticuerpo anti–Fab (véase, por ejemplo, Chen *et al*., (1999) J. Mol. Biol. 293:865–881). Para establecer las condiciones para el ensayo, las placas para microtitulación (DYNEX Technologies, Inc.) se recubren hasta el día siguiente con 5 µg/ml de un anticuerpo anti–Fab de captura (Cappel Labs) en 50 mM de carbonato de sodio (pH 9,6), y posteriormente se bloquean con 2% (p/v) de albúmina de suero bovino en PBS durante 2 a 5 horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23°C). En una placa no adsorbente (Nunc #269620), se mezcla 100 pM o 26 pM de [^{125}I]–antígeno con diluciones en serie de un Fab de interés (por ejemplo, consistente con la evaluación del anticuerpo anti–VEGF, Fab–12, en Presta *et al*., Cancer Res. 57:4593–4599 (1997)). El Fab de interés se incuba luego hasta el día siguiente; sin embargo, la incubación puede continuar durante un período más largo (por ejemplo, alrededor de 65 horas) para asegurar que se alcance el equilibrio. A continuación, las mezclas se transfieren a la placa de captura para su incubación a temperatura ambiente (por ejemplo, durante 1 hora). La solución luego se remueve, y la placa se lava 8 veces con surfactante 0,1% TWEEN–20™ en PBS. Cuando las placas se secan, se agrega 150 µl/cavidad de centellante (MICROSCINT–20™; Packard), y las placas se cuentan en un contador gamma TOPCOUNT™ (Packard) durante 10 minutos. Se eligen las concentraciones de cada Fab que den un porcentaje menor o igual al 20% de unión máxima para usar en los ensayos de unión competitiva.

De acuerdo con otra forma de realización, el Kd se mide usando ensayos de resonancia de plasmón en superficie usando un instrumento BIACORE®–2000

o BIACORE®–3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25°C con chips CM5 de antígeno inmovilizado a ~10 unidades de respuesta (RU). Brevemente, los chips biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore Inc.) se activan con clorhidrato de N–etil–N'–(3–dimetilaminopropil)–carbodiimida (EDC) y N–hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con 10 mM de acetato de sodio, pH 4,8, hasta 5 µg/ml (~0,2 µM) antes de la inyección a una velocidad de flujo de 5 µl/minuto para alcanzar aproximadamente 10 unidades de respuesta (RU) de proteína acoplada. Luego de la inyección del antígeno, se inyecta 1 M de etanolamina para bloquear los grupos no reaccionados. Para las mediciones de cinética, se inyectan diluciones en series de 2 veces del Fab (0,78 nM a 500 nM) en PBS con surfactante 0,05% TWEEN 20™ (PBST) a 25°C a una velocidad de flujo de aproximadamente 25 µl/min. Las velocidades de asociación (k_{on}) y las velocidades de disociación (k_{off}) se calculan usando un modelo de unión uno a uno simple de Langmuir (software de evaluación BIAcore®, versión 3.2) ajustando simultáneamente los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación de equilibrio (Kd) se calcula como la relación k_{off}/k_{on}. Véase, por ejemplo, Chen *et al*., J. Mol. Biol. 293:865–881 (1999). Si la velocidad de encendido excede 10^6 M^{-1} s^{-1} mediante el ensayo de resonancia de plasmón en superficie anterior, entonces la velocidad de encendido se puede determinar usando una técnica de extinción fluorescente que mide el aumento o el descenso de la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, 16 nm pase de banda) a 25°C de 20 nM de anticuerpo anti–antígeno (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de antígeno, según se mide en un espectrómetro, tal como un espectrómetro equipado con detención de flujo (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM–AMINCO™ serie 8000 (ThermoSpectronic) con cubeta de agitación.

La “velocidad de encendido”, “velocidad de asociación” o “k_{on}” de acuerdo con esta invención se puede determinar también como se describió antes, usando un sistema BIACORE®–2000 o BIACORE®–3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ).

Los términos “célula huésped”, “línea de célula huésped” y “cultivo de célula huésped” se usan de manera indistinta y se refieren a células en las cuales se ha introducido ácido nucleico exógeno, incluida la progenie de dichas células. Las células huésped incluyen "transformantes" y "células transformadas", las cuales incluyen la célula transformada primaria y la progenie derivada de ella, independientemente de la cantidad de pasajes. La progenie no puede ser completamente idéntica en el contenido de ácido nucleico a una célula parental, pero puede contener mutaciones. La progenie mutante que tiene la misma función o actividad biológica que fuera detectada o seleccionada en la célula originalmente transformada está incluida en la presente.

El término "vector", según se usa en la presente, se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de propagar otro ácido nucleico al cual está unida. El término incluye el vector como estructura de ácido nucleico auto–replicante, así como el vector incorporado en el genoma de una célula huésped en la cual se ha introducido. Ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de ácidos nucleicos a los cuales están operativamente unidos. Dichos vectores se denominan “vectores de expresión” en la presente.

“Porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácido” con respecto a una secuencia de polipéptido de referencia se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácidos en la secuencia de polipéptido de referencia, luego de alinear las secuencias e introducir brechas, si es necesario, para alcanzar el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. A los fines de

determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos, la alineación se puede lograr de distintas maneras que están dentro del conocimiento del arte, por ejemplo, usando software de computación públicamente disponible, tal como software BLAST, BLAST–2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). El especialista en el arte puede determinar los parámetros apropiados para alinear secuencias, incluido cualquier algoritmo necesario para alcanzar la máxima alineación en la longitud completa de las secuencias que se comparan. A los fines de la presente, sin embargo, el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos se genera usando el programa de computación de comparación de secuencias ALIGN–2. El programa de computación de comparación de secuencias ALIGN–2 fue creado por Genentech, Inc., y el código fuente ha sido presentado con la documentación para el usuario en la Oficina de Derechos de Autor de EE.UU., Washington D.C., 20559, donde está registrado bajo el Registro de Derechos de Autor de EE.UU. Nro. TXU510087. El programa ALIGN–2 está disponible públicamente de Genentech, Inc., South San Francisco, California, o se puede compilar a partir del código fuente. El programa ALIGN–2 se debe compilar para usar en un sistema operativo UNIX, que incluye UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias son establecidos por el programa ALIGN–2 y no varían.

En situaciones en las cuales se emplea ALIGN–2 para las comparaciones de secuencias de aminoácidos, el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos dada A respecto, con o contra una secuencia de aminoácidos dada B (lo que alternativamente se puede expresar como una secuencia de aminoácidos dada A que tiene o comprende un determinado porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos respecto de, con o contra una secuencia de aminoácidos dada B) se calcula de la siguiente manera: 100 veces la fracción X/Y, donde X es el número de residuos de

aminoácidos marcados como coincidencias idénticas por el programa de alineación de secuencias ALIGN–2 en la alineación de dicho programa de A y B, y donde Y es el número total de residuos de aminoácidos en B. Se apreciará que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos de A a B no será igual al porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos de B a A. A menos que se indique específicamente lo contrario, todos los porcentajes de identidad de secuencia de aminoácidos usados en la presente se obtienen como se describió.

El término "antibiótico tipo rifamicina" significa la clase o el grupo de antibióticos que tiene la estructura de la rifamicina, o una estructura similar.

El término "antibiótico tipo rifalazilo" significa la clase o el grupo de antibióticos que tiene la estructura del rifalazilo, o una estructura similar.

Cuando se indica el número de sustituyentes, el término “uno o varios” se refiere al rango desde un sustituyente hasta el mayor número posible de sustitución, es decir, el reemplazo de un hidrógeno hasta el reemplazo de todos los hidrógenos por sustituyentes. El término “sustituyente” denota un átomo o un grupo de átomos que reemplazan un átomo de hidrógeno en la molécula parental. El término “sustituido” denota que un grupo especificado tiene uno o varios sustituyentes. Cuando cualquier grupo puede llevar múltiples sustituyentes y se proporciona una variedad de posibles sustituyentes, los sustituyentes se seleccionan independientemente y no es necesario que sean los mismos. El término “insustituido” significa que el grupo especificado no lleva sustituyentes. El término “opcionalmente sustituido” significa que el grupo especificado es insustituido o sustituido con uno o varios sustituyentes, independientemente seleccionados del grupo de posibles sustituyentes. Cuando se indica el número de sustituyentes, el término “uno o varios” significa desde un sustituyente hasta el

mayor número posible de sustitución, es decir, el reemplazo de un hidrógeno hasta el reemplazo de todos los hidrógenos por sustituyentes.

El término “alquilo”, según se usa en la presente, se refiere a un radical hidrocarburo monovalente saturado de cadena lineal o ramificada de 1 a 12 átomos de carbono (C_1–C_{12}), en donde el radical alquilo puede estar opcionalmente sustituido de manera independiente con uno o varios sustituyentes descritos a continuación. En otra forma de realización, un radical alquilo tiene de 1 a 8 átomos de carbono (C_1–C_8), o de 1 a 6 átomos de carbono (C_1–C_6). Los ejemplos de grupos alquilo incluyen, aunque no a modo de limitación, metilo (Me, –CH_3), etilo (Et, –CH_2CH_3), 1–propilo (n–Pr, n–propilo, –$CH_2CH_2CH_3$), 2–propilo (i–Pr, i–propilo, –$CH(CH_3)_2$), 1–butilo (n–Bu, n–butilo, –$CH_2CH_2CH_2CH_3$), 2–metil–1–propilo (i–Bu, i–butilo, –$CH_2CH(CH_3)_2$), 2–butilo (s–Bu, s–butilo, –$CH(CH_3)CH_2CH_3$), 2–metil–2–propilo (t–Bu, t–butilo, –$C(CH_3)_3$), 1–pentilo (n–pentilo, –$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$), 2–pentilo (–$CH(CH_3)CH_2CH_2CH_3$), 3–pentilo (–$CH(CH_2CH_3)_2$), 2–metil–2–butilo (–$C(CH_3)_2CH_2CH_3$), 3–metil–2–butilo (–$CH(CH_3)CH(CH_3)_2$), 3–metil–1–butilo (–$CH_2CH_2CH(CH_3)_2$), 2–metil–1–butilo (–$CH_2CH(CH_3)CH_2CH_3$), 1–hexilo (–$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$), 2–hexilo (–$CH(CH_3)CH_2CH_2CH_2CH_3$), 3–hexilo (–$CH(CH_2CH_3)(CH_2CH_2CH_3)$), 2–metil–2–pentilo (–$C(CH_3)_2CH_2CH_2CH_3$), 3–metil–2–pentilo (–$CH(CH_3)CH(CH_3)CH_2CH_3$), 4–metil–2–pentilo (–$CH(CH_3)CH_2CH(CH_3)_2$), 3–metil–3–pentilo (–$C(CH_3)(CH_2CH_3)_2$), 2–metil–3–pentilo (–$CH(CH_2CH_3)CH(CH_3)_2$), 2,3–dimetil–2–butilo (–$C(CH_3)_2CH(CH_3)_2$), 3,3–dimetil–2–butilo (–$CH(CH_3)C(CH_3)_3$, 1–heptilo, 1–octilo y similares.

El término “alquileno”, según se usa en la presente, se refiere a un radical hidrocarburo divalente saturado de cadena lineal o ramificada de 1 a 12 átomos de carbono (C_1–C_{12}), en donde el radical alquileno puede estar opcionalmente sustituido de manera independiente con uno o varios sustituyentes descritos a

continuación. En otra forma de realización, un radical alquileno tiene de 1 a 8 átomos de carbono (C_1–C_8), o de 1 a 6 átomos de carbono (C_1–C_6). Los ejemplos de grupos alquileno incluyen, aunque no a modo de limitación, metileno (–CH_2–), etileno (–CH_2CH_2–), propileno (–$CH_2CH_2CH_2$–) y similares.

El término “alquenilo” se refiere a un radical hidrocarburo monovalente de cadena lineal o ramificada de 2 a 8 átomos de carbono (C_2–C_8) con al menos un sitio de insaturación, es decir, un enlace doble sp^2 carbono–carbono, en donde el radical alquenilo puede estar opcionalmente sustituido de manera independiente con uno o varios sustituyentes descritos en la presente e incluye radicales que tienen orientaciones “cis” y “trans”, o alternativamente orientaciones “E” y “Z”. los ejemplos incluyen, aunque no a modo de limitación, etilenilo o vinilo (–CH=CH_2), alilo (–CH_2CH=CH_2) y similares.

El término “alquenileno” se refiere un radical hidrocarburo divalente de cadena lineal o ramificada de 2 a 8 átomos de carbono (C_2–C_8) con al menos un sitio de insaturación, es decir, un doble enlace sp^2 carbono–carbono, en donde el radical alquenileno puede estar opcionalmente sustituido de manera independiente con uno o varios sustituyentes descritos en la presente, e incluye radicales que tienen orientaciones “cis” y “trans”, o alternativamente orientaciones “E” y “Z”. Los ejemplos incluyen, aunque no a modo de limitación, etilenileno o vinileno (–CH=CH–), alilo (–CH_2CH=CH–) y similares.

El término “alquinilo” se refiere a un radical hidrocarburo monovalente de cadena lineal o ramificada de 2 a 8 átomos de carbono (C_2–C_8), con al menos un sitio de insaturación, es decir, un triple enlace sp carbono–carbono, en donde el radical alquinilo puede estar opcionalmente sustituido de manera independiente con uno o varios sustituyentes descritos en la presente. Los ejemplos incluyen, aunque no a modo de limitación, etinilo (–C≡CH), propinilo (propargilo, –CH_2C≡CH) y similares.

El término “alquinileno” se refiere a un radical hidrocarburo divalente de cadena lineal o ramificada de 2 a 8 átomos de carbono (C_2–C_8), con al menos un sitio de insaturación, es decir, un enlace triple sp carbono–carbono, en donde el radical alquinileno puede estar opcionalmente sustituido de manera independiente con uno o varios sustituyentes descritos en la presente. Los ejemplos incluyen, aunque no a modo de limitación, etinileno (–C≡C–), propinileno (propargileno, –CH_2C≡C–) y similares.

Los términos “carbociclo”, “carbociclilo”, “anillo carbocíclico” y “cicloalquilo” se refieren a un anillo monovalente, no aromático, saturado o parcialmente insaturado, que tiene de 3 a 12 átomos de carbono (C_3–C_{12}) como anillo monocíclico, o de 7 a 12 átomos de carbono como anillo bicíclico. Los carbociclos bicíclicos que tienen de 7 a 12 átomos se pueden disponer, por ejemplo, como un sistema biciclo [4,5], [5,5], [5,6] o [6,6], y los carbociclos bicíclicos que tienen 9 ó 10 átomos anulares se pueden disponer como un sistema biciclo [5,6] o [6,6], o como sistemas puenteados tales como biciclo[2.2.1]heptano, biciclo[2.2.2]octano y biciclo[3.2.2]nonano. Los restos spiro también están incluidos dentro del alcance de esta definición. Los ejemplos de carbociclos monocíclicos incluyen, aunque no a modo de limitación, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, 1–ciclopent–1–enilo, 1–ciclopent–2–enilo, 1–ciclopent–3–enilo, ciclohexilo, 1–ciclohex–1–enilo, 1–ciclohex–2–enilo, 1–ciclohex–3–enilo, ciclohexadienilo, cicloheptilo, ciclooctilo, ciclononilo, ciclodecilo, cicloundecilo, ciclododecilo y similares. Los grupos carbociclilo están opcionalmente sustituidos de manera independiente con uno o varios sustituyentes descritos en la presente.

“Arilo” significa un radical hidrocarburo aromático monovalente de 6–20 átomos de carbono (C_6–C_{20}) derivado por la remoción de un átomo de hidrógeno desde un único átomo de carbono de un sistema anular aromático parental. Algunos grupos arilo están representados en las estructuras ilustrativas como

"Ar". Arilo incluye radicales bicíclicos que comprenden un anillo aromático fusionado con un anillo saturado, parcialmente insaturado, o un anillo carbocíclico aromático. Los grupos arilo típicos incluyen, aunque no a modo de limitación, radicales derivados de benceno (fenilo), bencenos sustituidos, naftaleno, antraceno, bifenilo, indenilo, indanilo, 1,2–dihidronaftaleno, 1,2,3,4–tetrahidronaftilo y similares. Los grupos arilo están opcionalmente sustituidos de manera independiente con uno o varios sustituyentes descritos en la presente.

"Arileno" significa un radical hidrocarburo aromático divalente de 6–20 átomos de carbono (C_6–C_{20}) derivado por la remoción de 2 átomos de hidrógeno a partir de 2 átomos de carbono de un sistema anular aromático parental. Algunos grupos arileno están representados en las estructuras ilustrativas como "Ar". Arileno incluye radicales bicíclicos que comprenden un anillo aromático fusionado con un anillo saturado, parcialmente insaturado, o un anillo carbocíclico aromático. Los grupos arileno típicos incluyen, aunque no a modo de limitación, radicales derivados de benceno (fenileno), bencenos sustituidos, naftaleno, antraceno, bifenileno, indenileno, indanileno, 1,2–dihidronaftaleno, 1,2,3,4–tetrahidronaftilo y similares. Los grupos arileno están opcionalmente sustituidos con uno o varios sustituyentes descritos en la presente.

Los términos "heterocico", "heterociclilo" y "anillo heterocíclico" se usan de manera indistinta en la presente y se refieren a un radical carbocíclico saturado o parcialmente insaturado (es decir, que tiene uno o varios enlaces dobles y/o triples dentro del anillo) de 3 a aproximadamente 20 átomos anulares en el cual al menos un átomo anular es un heteroátomo seleccionado de nitrógeno, oxígeno, fósforo y azufre, y los átomos anulares restantes son C, donde uno o varios átomos anulares están opcionalmente sustituidos de manera independiente con uno o varios sustituyentes descritos a continuación. Un heterociclo puede ser un monociclo que tiene de 3 a 7 miembros anulares (de 2 a 6 átomos de carbono y

de 1 a 4 heteroátomos seleccionados de N, O, P y S) o un biciclo que tiene de 7 a 10 miembros anulares (de 4 a 9 átomos de carbono y de 1 a 6 heteroátomos seleccionados de N, O, P y S), por ejemplo: un sistema biciclo [4,5], [5,5], [5,6] o [6,6]. Los heterociclos se describen en Paquette, Leo A.; "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W.A. Benjamin, New York, 1968), en particular los Capítulos 1, 3, 4, 6, 7 y 9; "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, New York, 1950 hasta la actualidad), en particular los Volúmenes 13, 14, 16, 19 y 28; y J. Am. Chem. Soc. (1960) 82:5566. "Heterociclilo" también incluye radicales donde los radicales heterociclo están fusionados con un anillo saturado, parcialmente insaturado, o un anillo carbocíclico o heterocíclico aromático. Los ejemplos de anillos heterocíclicos incluyen, aunque no a modo de limitación, morfolin–4–ilo, piperidin–1–ilo, piperazinilo, piperazin–4–il–2–ona, piperazin–4–il–3–ona, pirrolidin–1–ilo, tiomorfolin–4–ilo, S–dioxotiomorfolin–4–ilo, azocan–1–ilo, azetidin–1–ilo, octahidropirido[1,2–a]pirazin–2–ilo, [1,4]diazepan–1–ilo, pirrolidinilo, tetrahidrofuranilo, dihidrofuranilo, tetrahidrotienilo, tetrahidropiranilo, dihidropiranilo, tetrahidrotiopiranilo, piperidino, morfolino, tiomorfolino, tioxanilo, piperazinilo, homopiperazinilo, azetidinilo, oxetanilo, tietanilo, homopiperidinilo, oxepanilo, tiepanilo, oxazepinilo, diazepinilo, tiazepinilo, 2–pirrolinilo, 3–pirrolinilo, indolinilo, 2H–piranilo, 4H–piranilo, dioxanilo, 1,3–dioxolanilo, pirazolinilo, ditianilo, ditiolanilo, dihidropiranilo, dihidrotienilo, dihidrofuranilo, pirazolidinilimidazolinilo, imidazolidinilo, 3–azabiciclo[3.1.0]hexanilo, 3–azabiciclo[4.1.0]heptanilo, azabiciclo[2.2.2]hexanilo, 3H–indolil quinolizinilo y N–piridilo ureas. Los restos spiro también están incluidos dentro del alcance de esta definición. Los ejemplos de un grupo heterocíclico en donde 2 átomos anulares están sustituidos con restos oxo (=O) son pirimidinonilo y 1,1–dioxo–tiomorfolinilo. Los grupos

heterocico de la presente están opcionalmente sustituidos de manera independiente con uno o varios sustituyentes descritos en la presente.

El término “heteroarilo” se refiere a un radical aromático monovalente de 5, 6 o 7 miembros anulares e incluye sistemas anulares fusionados (al menos uno de los cuales es aromático) de 5–20 átomos, que contienen uno o varios heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno y azufre. Los ejemplos de grupos heteroarilo son piridinilo (incluido, por ejemplo, 2–hidroxipiridinilo), imidazolilo, imidazopiridinilo, pirimidinilo (incluido, por ejemplo, 4–hidroxipirimidinilo), pirazolilo, triazolilo, pirazinilo, tetrazolilo, furilo, tienilo, isoxazolilo, tiazolilo, oxadiazolilo, oxazolilo, isotiazolilo, pirrolilo, quinolinilo, isoquinolinilo, tetrahidroisoquinolinilo, indolilo, benzimidazolilo, benzofuranilo, cinolinilo, indazolilo, indolizinilo, ftalazinilo, piridazinilo, triazinilo, isoindolilo, pteridinilo, purinilo, oxadiazolilo, triazolilo, tiadiazolilo, tiadiazolilo, furazanilo, benzofurazanilo, benzotiofenilo, benzotiazolilo, benzoxazolilo, quinazolinilo, quinoxalinilo, naftiridinilo y furopiridinilo. Los grupos heteroarilo están opcionalmente sustituidos de manera independiente con uno o varios sustituyentes descritos en la presente.

Los grupos heterociclo o heteroarilo pueden tener enlaces carbono (unión a carbono) o nitrógeno (unión a nitrógeno), cuando esto sea posible. A modo de ejemplo y sin limitaciones, los heterociclos o heteroarilos unidos a carbono están unidos en la posición 2, 3, 4, 5 ó 6 de una piridina, la posición 3, 4, 5 ó 6 de una piridazina, la posición 2, 4, 5 ó 6 de una pirimidina, la posición 2, 3, 5 ó 6 de una pirazina, la posición 2, 3, 4 ó 5 de un furano, tetrahidrofurano, tiofurano, tiofeno, pirrol o tetrahidropirrol, la posición 2, 4 ó 5 de un oxazol, imidazol o tiazol, la posición 3, 4 ó 5 de un isoxazol, pirazol o isotiazol, la posición 2 ó 3 de una aziridina, la posición 2, 3 ó 4 de una azetidina, la posición 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 de una quinolina, o la posición 1, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 de una isoquinolina.

A modo de ejemplo y sin limitaciones, los heterociclos o heteroarilos unidos a nitrógeno están unidos en la posición 1 de una aziridina, azetidina, pirrol, pirrolidina, 2–pirrolina, 3–pirrolina, imidazol, imidazolidina, 2–imidazolina, 3–imidazolina, pirazol, pirazolina, 2–pirazolina, 3–pirazolina, piperidina, piperazina, indol, indolina, 1H–indazol, en la posición 2 de un isoindol o isoindolina, en la posición 4 de una morfolina, y en la posición 9 de un carbazol o β–carbolina.

Un “metabolito” es un producto generado a través del metabolismo en el cuerpop de un compuesto especificado o una sal de éste. Los metabolitos de un compuesto se pueden identificar usando técnicas de rutina conocidas en el arte, y sus actividades se pueden determinar usando pruebas tales como aquellas descritas en la presente. Dichos productos pueden resultar, por ejemplo, de la oxidación, reducción, hidrólisis, amidación, desamidación, esterificación, desesterificación, escisión enzimática y similares, del compuesto administrado. Por consiguiente, la invención incluye metabolitos de compuestos de la invención, incluidos compuestos producidos mediante un proceso que comprende poner en contacto un compuesto de Fórmula I de esta invención con un mamífero durante un período de tiempo suficiente para obtener un producto metabólico de éste.

El término “formulación farmacéutica” se refiere a una preparación que está en una forma tal de permitir que la actividad biológica de un ingrediente activo contenido en ella sea efectivo, y que no contiene no componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto al cual se le administra la formulación.

Una formulación “estéril” es aséptica o libre de todo microorganismo vivo y sus esporas.

Una formulación “estable” es aquella en la cual la proteína contenida conserva esencialmente su estabilidad física y química, y su integridad durante el almacenamiento. En el arte se dispone de diversas técnicas analíticas para medir

la estabilidad de las proteínas, las cuales se analizan en Peptide and Protein Drug Delivery, 247–301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, New York, Pubs. (1991) y Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29–90 (1993). La estabilidad se puede medir a una temperatura seleccionada durante un período de tiempo seleccionado. Para una rápida evaluación, la formulación se puede mantener a 40°C durante 2 semanas a 1 mes, tras lo cual se mide la estabilidad. Cuando la formulación debe almacenarse a 2–8°C, generalmente debe ser estable a 30°C o 40°C durante al menos 1 mes y/o estable a 2–8°C durante al menos 2 años. Cuando la formulación debe almacenarse a 30°C, generalmente debe ser estable durante al menos 2 años a 30°C y/o estable a 40°C durante al menos 6 meses. Por ejemplo, el grado de agregación durante el almacenamiento se puede usar como un indicador de la estabilidad de la proteína. Así, una formulación “estable” puede ser aquella en la cual menos de aproximadamente 10% y preferentemente menos de aproximadamente 5% de la proteína esté presente como agregado en la formulación. En otras formas de realización, se puede determinar cualquier aumento en la formación de agregados durante el almacenamiento de la formulación.

Una formulación “isotónica” es aquella que tiene esencialmente la misma presión osmótica que la sangre humana. Las formulaciones isotónicas generalmente tienen una presión osmótica de aproximadamente 250 a 350 mOsm. El término “hipotónica” describe a una formulación con una presión osmótica por debajo de la sangre humana. Correspondientemente, el término “hipertónica” se usa para describir una formulación con una presión osmótica superior a la sangre humana. La isotonicidad se puede medir usando un osmómetro de presión de vapor o congelamiento por hielo, por ejemplo. Las formulaciones de la presente invención son hipertónicas como resultado de la adición de sal y/o búfer.

Los “portadores”, según se usa en la presente, incluyen portadores, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables que son no tóxicos para la célula o el mamífero expuesto a ellos en las dosis y concentraciones empleadas. A menudo, el portador fisiológicamente aceptable es una solución amortiguadora del pH acuosa. Los ejemplos de portadores fisiológicamente aceptables incluyen búfers tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluido ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamine, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos, incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcares, tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; y/o surfactantes no iónicos tales como TWEEN®, polietilenglicol (PEG) y PLURONICS™.

Un “portador farmacéuticamente aceptable” se refiere a un ingrediente de una formulación farmacéutica, distinto del ingrediente activo, que es no tóxico para un sujeto. Un portador farmacéuticamente aceptable incluye, aunque sin limitaciones, un búfer, excipiente, estabilizante o conservante.

Un “ácido farmacéuticamente aceptable” incluye ácidos inorgánicos y orgánicos que son no tóxicos en la concentración y la manera en que se formulan. Por ejemplo, los ácidos inorgánicos adecuados incluyen clorhídrico, perclórico, bromhídrico, iodhídrico, nítrico, sulfúrico, sulfónico, sulfínico, sulfanílico, fosfórico, carbónico, etc. Los ácidos orgánicos adecuados incluyen alquilo de cadena recta y ramificada, aromático, cíclico, cicloalifático, arilalifático, heterocíclico, saturado, insaturado, mono, di– y tri–carboxílico, incluyendo, por ejemplo, fórmico, acético, 2–hidroxiacético, trifluoroacético, fenilacético, trimetilacético, t–butilacético,

antranílico, propanoico, 2–hidroxipropanoico, 2–oxopropanoico, propandioico, ciclopentanpropiónico, ciclopentan propiónico, 3–fenilpropiónico, butanoico, butandioico, benzoico, 3–(4–hidroxibenzoil)benzoico, 2–acetoxi–benzoico, ascórbico, cinámico, lauril sulfúrico, esteárico, mucónico, mandélico, succínico, embónico, fumárico, málico, maleico, hidroximaleico, malónico, láctico, cítrico, tartárico, glicólico, glicónico, glucónico, pirúvico, glioxálico, oxálico, mesílico, succínico, salicílico, ftálico, palmoico, palmeico, tiociánico, metanosulfónico, etanosulfónico, 1,2–etanodisulfónico, 2–hidroxietanosulfónico, bencenesulfónico, 4–chorobencenosulfónico, naftalen–2–sulfónico, p–toluensulfónico, alcanforsulfónico, 4–metilbiciclo[2.2.2]–oct–2–en–1–carboxílico, glucoheptonico, 4,4'–metilenbis–3–(hidroxi–2–en–1–carboxílico) e hidroxinaftoico.

Las "bases farmacéuticamente aceptables" incluyen bases inorgánicas y orgánicas que son no tóxicas en la concentración y la manera en que se formulan. Por ejemplo, las bases adecuadas incluyen aquellas formadas a partir de metales formadores de bases inorgánicas, tales como litio, sodio, potasio, magnesio, calcio, amonio, hierro, zinc, cobre, manganeso, alumini, N–metilglucamina, morfolina, piperidina, y bases orgánicas no tóxicas, que incluyen aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas, aminas cíclicas y resinas de intercambio iónico básicas [por ejemplo, $N(R')_4^+$ (donde R' es independientemente H o alquilo$C_{1–4}$, por ejemplo, amonio, Tris)], por ejemplo, isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina, etanolamina, 2–dietilaminoetanol, trimetamina, diciclohexilamina, lisina, arginina, histidina, cafeína, procaína, hidrabamina, colina, betaína, etilendiamina, glucosamina, metilglucamina, teobromina, purinas, piperazina, piperidina, N–etilpiperidina, resinas de poliamina y similares. Se prefieren particularmente las bases orgánicas no tóxicas isopropilamina, dietilamina, etanolamina, trimetamina, diciclohexilamina, colina y cafeína.

Los ácidos y bases farmacéuticamente aceptables adicionales útiles con la presente invención incluyen aquellos derivados de los aminoácidos, por ejemplo, histidina, glicina, fenilalanina, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina y asparagina.

Los búfers y las sales “farmacéuticamente aceptables” incluyen aquellos derivados de sales de adición de ácidos y bases, de los ácidos y bases antes indicados. Los búfers y/o sales específicas incluyen histidina, succinato y acetato.

Un “azúcar farmacéuticamente aceptable” es una molécula que, cuando se combina con una proteína de interés, previene significativamente o reduce la inestabblidad química y/o física de la proteína tras el almacenamiento. Cuando la formulación va a ser liofilizada y luego reconstituida, los “azúcares farmacéuticamente aceptables” también se pueden conocer como “lioprotectores”. Los ejemplos de azúcares y sus correspondientes alcoholes de azúcares incluyen: un aminoácido tal como glutamato monosódico o histidina; una metilamina tal como betaína; una sal liotrópica tal como sulfato de magnesio; un poliol tal como alcoholes de azúcares trihídricos o de mayor peso molecular, por ejemplo glicerina, dextrano, eritritol, glicerol, arabitol, xilitol, sorbitol y manitol; propilenglicol; polietilenglicol; PLURONICS®; y combinaciones de ellos. Los lioprotectores ilustrativos adicionales incluyen glicerina y gelatina, y los azúcares melibiosa, melezitosa, rafinosa, manotriosa y estaquiosa. Los ejemplos de azúcares reductores incluyen glucosa, maltosa, lactosa, maltulosa, iso–maltulosa y lactulosa. Los ejemplos de azúcares no reductores incluyen glucósidos no reductores de compuestos polihidroxi seleccionados de alcoholes de azúcares y otros polialcoholes de cadena recta. Los alcoholes de azúcares preferidos son monoglucósidos, en especial aquellos compuestos obtenidos por reducción de disacáridos tales como lactosa, maltosa, lactulosa y maltulosa. El grupo lateral glicosídico puede ser glucosídico o galactosídico. Los ejemplos adicionales de alcoholes de azúcares son glucitol, maltitol, lactitol e iso–maltulosa. Los azúcares

farmacéuticamente aceptables preferidos son los azúcares no reductores trehalosa o sacarosa. Los azúcares farmacéuticamente aceptables se agregan a la formulación en una “cantidad protectora” (por ejemplo, pre–liofilización), lo cual significa que la proteína conserva esencialmente su estabilidad física y química y su integridad durante el almacenamiento (por ejemplo, tras la reconstitución y el almacenamiento).

El “diluyente” de interés en la presente es uno que es farmacéuticamente aceptable (seguro y no tóxico para su administración a un humano) y es útil para la preparación de una formulación líquida, tal como una formulación reconstituida luego de la liofilización. Los ejemplos de diluyentes incluyen agua estéril, agua bacteriostática para uso inyectable (BWFI), una solución con pH amortiguado (por ejemplo, solución salina con búfer de fosfato), solución salina estéril, solución de Ringer o solución de dextrosa. En una forma de realización alternativa, los diluyentes pueden incluir soluciones acuosas de sales y/o búfers.

Un “conservante” es un compuesto que se puede agregar a las formulaciones de la presente para reducir la actividad bacteriana. La adición de un conservante puede, por ejemplo, facilitar la producción de una formulación multiuso (múltiples dosis). Los ejemplos de potenciales conservantes incluyen cloruro de octadecildimetilbencil amonio, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio (una mezcla de cloruros de alquilbencildimetilamonio en la cual los gurpos alquilo son compuestos de cadena larga) y cloruro de benzetonio. Otros tipos de conservantes incluyen alcoholes aromáticos tales como fenol, butilo y alcohol bencílico, alquil parabenos tales como metil o propil parabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3–pentanol y m–cresol. El conservante más preferido en la presente es el alcohol bencílico.

Un “individuo” o “sujeto” o “paciente” es un mamífero. Los mamíferos incluyen, aunque no a modo de limitación, animales domésticos (por ejemplo,

vacas, ovejas, gatos, perros y caballos), primates (por ejemplo, humanos y primates no humanos, tales como monos), conejos y roedores (por ejemplo, ratones y ratas). En ciertas formas de realización, el individuo o sujeto es un humano.

Según se usa en la presente, “tratamiento” (y sus variaciones gramaticales, tales como “tratar” o “tratando”) se refiere a la intervención clínica designada para alterar el curso natural del individuo, tejido o célula que está siendo tratado durante el transcurso de la patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen, aunque no a modo de limitación, disminuir la velocidad de progresión de la enfermedad, mejorar o paliar el estado de enfermedad, y remitir o mejorar el pronóstico, todo ello medible por el especialista en el arte, tal como un médico. En una forma de realización, el tratamiento puede significar el alivio de los síntomas, la disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, la disminución de la velocidad de progresión de la enfermedad infecciosa, la mejora o paliación del estado de enfermedad, y la remisión o mejora del pronóstico. En algunas formas de realización, los anticuerpos de la invención se isan para demorar el desarrollo de una enfermedad o para retardar la progresión de una enfermedad infecciosa.

Según se usa en la presente, “en conjunto con” se refiere a la administración de una modalidad de tratamiento además de otra modalidad de tratamiento. Como tal, “en conjunto con” se refiere a la administración de una modalidad de tratamiento antes, durante o después de la administración de la otra modalidad de tratamiento al individuo.

El término “fagosoma” se refiere a un vaso endocítico internalizado, envuelto en membrana, de una célula fagocítica. Se puede iniciar por fagocitosis directa, mejorada por anticuerpo o mejorada por complemento. El término

“fagolisosoma” se refiere a un vaso celular internalizado que se ha fusionado con uno o varios lizosomas.

Las bacterias tradicionalmente se dividen en dos grupos principales: Gram–positivas (Gm+) y Gram–negativas (Gm–), sobre la base de su retención de la tinción Gram. Las bacterias Gram–positivas son unidas por una membrana lipídica de unidad única y generalmente contienen una capa gruesa (20–80 nm) de peptidoglicano, responsable de retener la tinción Gram. Las bacterias Gram–positivas son aquellas que se tiñen de azul oscuro o violeta con la tinción Gram. Por el contrario, las bacterias Gram–negativas no pueden retener la tinción violeta cristalina, y en cambio adoptan la contra–tinción (safranina o fucsina) y aparecen de color rojo o rosa. Las paredes celulares Gram–positivas típicamente carecen de la membrana externa hallada en las bacterias Gram–negativas.

El término “bacteremia” se refiere a la presencia de bacterias en el torrente sanguíneo, que muy comúnmente se detecta por medio de un cultivo de sangre. Las bacterias pueden ingresar en el torrente sanguíneo como una complicación severa de las infecciones (como neumonía o meningitis), durante una cirugía (especialmente cuando se involucran las membranas mucosas, tales como el tracto gastrointestinal), o debido a catéteres y otros cuerpos extraños que ingresan en las arterias o venas. La bacteremia puede tener varias consecuencias. La respuesta inmune a las bacterias puede causar sepsis y shock séotico, el cual tiene una tasa de mortalidad relativamente alta. Las bacterias también pueden usar la sangre para extenderse a otras partes del cuerpo, lo cual causa infecciones lejos del sitio de infección original. Los ejemplos incluyen endocarditis u osteomielitis.

Una “cantidad terapéuticamente efectiva” es la concentración mínima requerida para lograr una mejoría medible de un trastorno en particular. Una cantidad terapéuticamente efectiva en la presente puede variar según factores

tales como el estadio de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del paciente, y la capacidad del anticuerpo para generar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente efectiva también es aquella en la cual cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo es superado por los efectos terapéuticamente beneficiosos. En una forma de realización, una cantidad terapéuticamente efectiva es una cantidad efectiva para reducir la bacteremia en una infección *in vivo*. En un aspecto, una "cantidad terapéuticamente efectiva" es al menos la cantidad efectiva para reducir la carga bacteriana o las unidades formadoras de colonias (CFU) aisladas de una muestra del paciente, tal como sangre, en al menos un log respecto del estado previo a la administración del fármaco. En un aspecto más específico, la reducción es de al menos 2 logs. En otro aspecto, la reducción es de 3, 4, 5 logs. En incluso otro aspecto, la reducción está por debajo de los niveles detectables. En otra forma de realización, una cantidad terapéuticamente efectiva es la cantidad de un AAC en una o varias dosis, administradas durante el transcurso del período de tratamiento, que logra un cultivo de sangre negativo (es decir, no deja crecer la bacteria que es el blanco del AAC) en comparación con el cultivo de sangre positivo antes o al inidio del tratamiento del paciente infectado.

Una "cantidad profilácticamente efectiva" se refiere a una cantidad efectiva, en las dosis y durante los períodos de tiempo necesarios, para alcanzar el resultado profiláctico deseado. Típicamente, aunque no necesariamente, dado que se usa una dosis profiláctica en los sujetos antes, en una etapa más temprana de la enfermedad, o incluso previo a la exposición a condiciones en las cuales el riesgo de infección es elevado, la cantidad profilácticamente efectiva puede ser menor que la cantidad terapéuticamente efectiva. En una forma de realización, una cantidad profilácticamente efectiva es al menos una cantidad

efectiva para reducir, prevenir la ocurrencia o la diseminación de la infección de una célula a otra.

La administración “crónica” se refiere la administración del medicamento en forma continua, a diferencia del modo agudo, de manera de mantener el efecto terapéutico inicial (actividad) durante un período de tiempo prolongado. La administración “intermitente” es el tratamiento que no se administra consecutivamente sin interrupción, sino que es de naturaleza algo cíclica.

El término “prospecto” se usa para referirse a las instrucciones que comúnmente se incluyen en los envases comerciales de los productos terapéuticos, que contienen información sobre indicaciones, uso, dosis, administración, terapia combinada, contraindicaciones y/o adevertencias respecto del uso de dichos productos terapéuticos.

El término “quiral” se refiere a moléculas que tienen la propiedad de no superposición del par de imagen especular, mientras que el término “aquiral” se refiere a moléculas que se pueden superponer con su par de imagen especular.

El término “estereoisómeros” se refiere a compuestos que tienen una constitución química idéntica, pero que difieren con respecto a la disposición de los átomos o grupos en el espacio.

“Diastereómero” se refiere a un estereoisómero con dos o más centros de quiralidad y cuyas moléculas no son imágenes especulares unas de otras. Los diastereómeros tienen diferentes propiedades físicas, por ejemplo punto de fusión, punto de ebullición, propiedades espectrales y reactividades. Las mezclas de diastereómeros se pueden separar mediante procedimientos analíticos de alta resolución, tales como electroforesis y cromatografía.

“Enantiómeros” se refiere a dos estereoisómeros de un compuesto que no son imágenes especulares que se puedan superponer entre sí.

Las definiciones y convenciones estereoquímicas usadas en la presente en general siguen a S. P. Parker, Ed., McGraw–Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw–Hill Book Company, New York; y Eliel, E. y Wilen, S., Stereochemistry of Organic Compounds (1994) John Wiley & Sons, Inc., New York. Muchos compuestos orgánicos existen en formas ópticamente activas, es decir, tienen la capacidad de rotar el plano de la luz polarizada en plano. Al describir un compuesto ópticamente activo, se usan los prefijos D y L, o R y S para denotar la configuración absoluta de la molécula respecto de su centro quiral. Los prefijos d y l o (+) y (–) se emplean para designar el signo de rotación de la luz polarizada en plano por el compuesto, donde (–) o 1 significa que el compuesto es levorrotatorio. Un compuesto con prefijo (+) o d es dextrorrotatorio. Para una estructura química dada, estos estereoisómeros son idénticos, excepto que son imágenes especulares uno de otro. Un estereoisómero específico también se puede denominar enantiómero, y una mezcla de dichos isómeros se suele llamar mezcla enantiomérica. Una mezcla 50:50 de enantiómeros se denomina mezcla racémica o racemato, la cual se puede producir cuando no ha habido estereoselección o estereoespecificidad en una reacción o proceso químico. Los términos "mezcla racémica" y "racemato" se refieren a una mezcla equimolar de dos especies enantioméricas, desprovistas de actividad óptica.

El término “grupo protector” se refiere a un sustituyente que comúnmente se emplea para bloquear o proteger una funcionalidad particular, mientras que otros grupos funcionales reaccionan en el compuesto. Por ejemplo, un “grupo protector de amino” es un sustituyente unido a un grupo amino que bloquea o proteje la funcionalidad amino en el compuesto. Los grupo protectores de amino adecuados incluyen, aunque no a modo de limitación, acetilo, trifluoroacetilo, t–butoxicarbonilo (BOC), benciloxicarbonilo (CBZ) y 9–fluorenilmetilenoxicarbonilo (Fmoc). Para una descripción general de grupos protectores y su uso, véase T.

W. Greene, Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley & Sons, New York, 1991, o una edición posterior.

El término “aproximadamente”, según se usa en la presente, se refiere al rango de error usual para el respectivo valor que bien conoce el especialista en este campo técnico. La referencia a “aproximadamente” un valor o parámetro en la presente incluye (y describe) formas de realización que se dirigen a ese valor o parámetro *per se*.

Según se usa en la presente y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular “un”, “una”, “el” y “la” incluyen la referencia en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, la referencia a un “anticuerpo” es una referencia desde uno hasta muchos anticuerpos, tales como cantidades molares, e incluye equivalentes de ellos conocidos por el especialista en el arte, y demás.

III. COMPOSICIONES Y MÉTODOS

CONJUGADOS DE ANTICUERPO–ANTIBIÓTICO (AAC)

Los compuestos de AAC de la invención incluyen aquellos con actividad antibacteriana, efectivos contra un número de patógenos humanos y veterinarios Gram–positivos y Gram–negativos, incluidos los *Staphilococci*. En una forma de realización ilustrativa, los compuestos AAC incluyen un anticuerpo con cisteína modificada conjugado, es decir, unido covalentemente por un ligador, a un resto de antibiótico tipo rifamicina. La actividad biológica del resto de antibiótico tipo rifamicina es modulada por la conjugación a un anticuerpo. Los conjugados de anticuerpo–antibiótico (AAC) de la invención entregan selectivamente una dosis efectiva de un agente antibacteriano a un sitio de infección, con lo cual se puede alcanzar mayor selectividad, es decir una dosis eficaz menor, mientras se aumenta el índice terapéutico (“ventana terapéutica”).

La invención proporciona una nueva terapia antibacteriana que apunta a prevenir el escape antibiótico apuntando a poblaciones de bacterias que evaden la terapia antibiótica convencional. La nueva terapia antibacteriana se logra con un Conjugado de Anticuerpo–Antibiótico (AAC) en el cual un anticuerpo específico para componentes de la pared celular hallados en *S. aureus* (incluidas MRSA) se une químciamente a un potente antibiótico (un derivado de la rifamicina). El antibiótico se une al anticuerpo a través de un ligador peptídico escindible en proteasa, que está diseñado para ser escindido por catepsina B, una proteasa lisosomal hallada en la mayoría de los tipos celulares de mamíferos (Dubowchik *et al* (2002) Bioconj. Chem. 13:855–869). El AAC actúa como profármaco dado que el antibiótico es inactivo (debido al gran tamaño del anticuerpo) hasta que el ligador es escindido. Debido a que una significativa proporción de *S. aureus* hallada en una infección natural es tomada por células huésped, principalmente neutrófilos y macrófagos, en algún punto durante el transcurso de la infección en el huésped, y que el tiempo pasado dentro de las células huésped proporciona una significativa oportunidad para que la bacteria evada la actividad antibiótica. Los AAC de la invención están diseñados para unirse a *S. aureus* y liberar el antibiótico dentro del fagolisosoma después de que las bacterias son tomadas por las células huésped. Mediante este mecanismo, los AAC son capaces de concentrar el antibiótico activo específicamente en una ubicación donde *S. aureus* es pobremente tratado mediante antibióticos convencionales. Aunque la invención no está limitada ni definida por un mecanismo de acción particular, los AAC mejoran la actividad antibiótica a través de tres potenciales mecanismos: (1) el AAC entrega el antibiótico dentro de las células de mamífero que toman las bacterias, con lo cual aumentan la potencia de los antibióticos que se difunden pobremente en los fagolisosomas donde se secuestran las bacterias; (2) los AAC opsonizan las bacterias, con lo cual aumentan la captación de bacterias libres por

parte de las células fagocíticas y liberan el antibiótico localmente para matar las bacterias mientras son secuestradas en el fagolisosoma; (3) los AAC mejoran la vida media de los antibióticos *in vivo* (farmacocinética mejorada) al unir el antibiótico con un anticuerpo. La mejor farmacocinética del AAC permite la entrega de suficiente antibiótico en regiones donde *S. aureus* está concentrada, mientras que limita la dosis general de antibiótico que se necesita administrar sistémicamente. Esta propiedad debe permitir que la terapia a largo plazo con AAC apunte a la infección persistente con mínimos efectos secundarios del antibiótico.

La presente solicitud describe la generación de nuevos agentes terpáuticos de anticuerpo anti–WTA conjugado y su uso en el tratamiento de infecciones con bacterias Gram–positivas (Gm+), incluidas infecciones por *S. aureus*. Estos anticuerpos son capaces de apuntar a poblaciones de bacterias Gm+ que evaden la terapia antibiótica convencional.

Un compuesto conjugado de anticuerpo–antibiótico de la invención comprende un anticuerpo anti–ácido teicoico de pared beta (WTA beta) unido en forma covalente por un ligador peptídico a un antibiótico tipo rifamicina.

En una forma de realización, el conjugado de anticuerpo–antibiótico tiene la fórmula:

$$Ab–(L–abx)_p$$

en donde:

Ab es el anticuerpo anti–ácido teicoico de pared;

L es el ligador peptídico que tiene la fórmula:

$$–Str–Pep–Y–$$

donde Str es una unidad extensora; Pep es un péptido de 2 a 12 residuos de aminoácidos, e Y es una unidad espaciadora;

abx es el antibiótico tipo rifamicina; y

p es un número entero de 1 a 8.

El número de restos de antibiótico que se pueden conjugar a través de un resto de ligador reactivo a una molécula de anticuerpo puede estar limitado por el número de residuos de cisteína libre, los cuales son introducidos mediante los métodos descritos en la presente. Los AAC ilustrativos de Fórmula **I** por lo tanto comprenden anticuerpos que tienen 1, 2, 3 ó 4 aminoácidos de cisteína modificada por ingeniería genética (Lyon, R. *et al* (2012) *Métodos in Enzym*. 502:123–138).

ANTICUERPOS ANTI–ÁCIDO TEICOICO DE PARED (WTA)

En la presente se divulgan ciertos Ab anti–WTA y anticuerpos anti–WTA conjugados que se unen a WTA expresado en varias bacterias Gm+, incluida *Staphilococcus aureus*. Los anticuerpos anti–WTA se pueden seleccionar y producir mediante los métodos enseñados en US 8283294; Meijer PJ *et al* (2006) J Mol Biol. 358(3):764–72; Lantto J, *et al* (2011) J Virol. 85(4):1820–33, y en el Ejemplo 21 a continuación. La invención proporciona composiciones de estos Ab anti–WTA.

La pared celular de las bacterias Gram–positivas está compuesta por una capa gruesa de vainas de múltiples peptidoglicanos (PGN) que no sólo estabilizan la membrana celular, sino que también proporcionan muchos sitios a los cuales se pueden unir otras moléculas (Figura 3). Una clase principal de estas glucoproteínas de superficie celular son los ácidos teicoicos (“TA”), que son moléculas ricas en fosfato halaldas en mchas proteínas de unión a glicano (GPB). Los TA son de dos tipos: (1) ácido lipo teicoico (“LTA”), que son anclados a la membrana plasmática y se extienden desde la superficie celular hacia la capa de peptidoglicano; y (2) TA de pared (WTA), que se unen en forma covalente a peptidoglicano y se extienden a través y más allá de la pared celular (Figura 3).

WTA puede representar hasta un 60% de la masa de pared celular total en GPB. Como resultado, presenta un antígeno en superficie celular altamente expresado.

Las estructuras químicas de los WTA varían entre los organismos. En *S. aureus*, el WTA se une en forma covalente al 6–OH del ácido N–acetil murámico (MurNAc) a través de un disacárido compuesto por N–acetilglicosamina (GlcNAc)–1–P y N–acetilmanoseamina (ManNAc), a lo cual le siguen aproximadamente dos o tres unidades de glicerol–fosfatos (Figura 4). El polímero de WTA real esrá compuesto entonces por aproximadamente 11–40 unidades repetidoras de ribitol–fosfato (Rbo–P). La síntesis paso a paso de WTA es iniciada primero por la enzima denominada TagO, y las cepas de *S. aureus* que carecen del gen TagO (por deleción del gen) no elaboran ningún WTA. Las unidades repetidoras se pueden adaptar adicionalmente con D–alanina (D–Ala) en C2–OH y/o con N–acetilglucosamina (GlcNAc) en la posición C4–OH a través de uniones α– (alfa) o β–(beta) glucosídicas. Dependiendo de la cepa de *S. aureus* o de la fase de crecimiento de las bacterias, las uniones glucosídicas podrían ser α –, β– o una mezcla de ambos anómeros. Estas modificaciones de azúcares GlcNAc se adaptan mediante dos glicosiltransferasas (Gtfs) derivadas de *S. aureus* específicas: TarM Gtf media uniones α–glucosídicas, mientras que TarS Gtfs media uniones β–(beta)glucosídicas.

Dada la significativa evidencia de que los almacenamientos intracelulares de MRSA están protegidos de los antibióticos, las nuevas composiciones terapéuticas de la invención fueron desarrolladas para prevenir este método de evasión de antibiótico usando un anticuerpo específico para *S. aureus* para unir un antibiótico con la bacteria de modo tal que cuando la bacteria es tragada o de otra manera internalizada por una célula huésped *in vivo*, lleve consigo el antibiótico dentro de la célula huésped.

En un aspecto, la invención proporciona anticuerpos anti–WTA que son anti–WTAα o anti–WTAβ. En otro aspecto, la invención proporciona Ab anti–*Staph aureus*. Los Ab ilustrativos fueron clonados a partir de células B de pacientes infectados con *S. aureus* (como se enseña en el Ejemplo 21). En una forma de realización, los Ab anti–WTA y anti–*Staph aureus* son anticuerpos monoclonales humanos. La invención abarca Ab quiméricos y Ab humanizados que comprenden las CDR de los presentes Ab anti–WTA.

Para uso terapéutico, los Ab anti–WTA de la invención para conjugación con antibióticos para generar AAC pueden ser de cualquier isotipo, excepto IgM. En una forma de realización, los Ab anti–WTA son de isotipo IgG humano. En formas de realización más específicas, los Ab anti–WTA son IgG1 humana.

Las Figuras 6A y 6B enumeran los Ab que son anti–WTAα o anti–WTAβ. En toda la memoria descriptiva y las figuras, los Ab designados por un número de 4 dígitos (por ejemplo, 4497) también se pueden denominar con una “S” precedente, por ejemplo, S4497; ambos nombres se refieren al mismo anticuerpo, que es la secuencia de tipo salvaje (WT) no modificada del anticuerpo. Las variantes del anticuerpo se indican con una “v” luego del número de anticuerpo, por ejemplo, 4497.v8. A menos que se especifique (por ejemplo, por el número de variante), las secuencias de aminoácidos mostradas son las originales, no modificadas ni alteradas. Estos Ab se pueden alterar en uno o varios residuos, por ejemplo para mejorar la PK, estabilidad, expresión, manufacturabilidad (por ejemplo, como se describe en los Ejemplos a continuación), mientras que se mantiene sustancialmente la misma afinidad de unión, o una mejor, con el antígeno en comparación con el anticuerpo no modificado de tipo salvaje. Las variantes de los presentes anticuerpos WTA que tienen sustituciones de aminoácidos conservadoras están comprendidas por la invención. A continuación, a menos que se especifique lo contrario, la numeración de CDR es de acuerdo

con Kabat y la numeración de dominio constante es de acuerdo con la numeración de EU.

La Figura 13A y la Figura 13B proporcionan la alineación de secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena liviana (VL) y la región variable de cadena pesada (VH), respectivamente, de cuatro anticuerpos anti–WTA alfa humanos. Las secuencias de CDR, CDR L1, L2, L3 y CDR H1, H2, H3 de acuerdo con la numeración de Kabat se encuentran subrayadas.

Tabla 6A: Secuencias de CDR de cadena liviana del anti–WTAα.

Anticuerpo	CDR L1	CDR L2	CDR L3
4461	KSSQSVLSRANNNYYVA (SEC. ID NRO.1)	WASTREF (SEC. ID NRO.2)	QQYYTSRRT (SEC. ID NRO.3)
4624	RSNQNLLSSSNNNILA (SEC. ID NRO.7)	WASTRES (SEC. ID NRO.8)	QQYYANPRT (SEC. ID NRO.9)
4399	KSNQNVLASSNDKNILA (SEC. ID NRO.13)	WASIRES (SEC. ID NRO.14)	QQYYTNPRT (SEC. ID NRO.15)
6267	KSSQNVLYSSNNKNILA (SEC. ID NRO.19)	WASTRES (SEC. ID NRO.20)	QQYYTSPPYT (SEC. ID NRO.21)

Tabla 6B: Secuencias de CDR de cadena pesada del anti–WTAα.

Anticuerpo	CDR H1	CDR H2	CDR H3

4461	DYYMH (SEC. ID NRO.4)	WINPKSGGTNYAQRFQG (SEC. ID NRO.5)	DCGSGGLRDF (SEC. ID NRO.6)
4624	DYYIH (SEC. ID NRO.10)	WINPNTGGTYYAQKFRD (SEC. ID NRO.11)	DCGRGGLRDI (SEC. ID NRO.12)
4399	DYYIH (SEC. ID NRO.16)	WINPNTGGTNYAQKFQG (SEC. ID NRO.17)	DCGNAGLRDI (SEC. ID NRO.18)
6267	SYWIG (SEC. ID NRO.22)	IIHPGDSKTRYSPSFQG (SEC. ID NRO.23)	LYCSGGSCYSDRAFSSLGAGGYYYYGMGV (SEC. ID NRO.24)

Las secuencias de cada par de VL y VH son las siguientes:

4461 Región variable de cadena liviana

DIQMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLSRANNNYYVAWYQHKPGQPPKLLI
YWASTREFGVPDRFSGSGSGTDFTLTINSLQAEDVAVYYCQQYYTSRRTFGQG
TKVEIK (SEC. ID NRO. 25)

4461 Región variable de cadena pesada

QVQLVQSGAEVRKPGASVKVSCKASGYSFTDYYMHWVRQAPGQGLEWMGWI
NPKSGGTNYAQRFQGRVTMTGDTSISAAYMDLASLTSDDTAVYYCVKDCGSGG
LRDFWGQGTTVTVSS (SEC. ID NRO. 26)

4624 Región variable de cadena liviana

DIQMTQSPDSLSVSLGERATINCRSNQNLLSSSNNNILAWYQQKPGQPLKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYANPRTFGQGTKVEIK (SEC. ID NRO. 27)

4624 Región variable de cadena pesada

QVQLQQSRVEVKRPGTSVKVSCKTSGYTFSDYYIHWVRLAPGQGLELMGWINPNTGGTYYAQKFRDRVTMTRDTSIATAILEMSSLTSDDTAVYYCAKDCGRGGLRDIWGPGTMVTVSS (SEC. ID NRO. 28)

4399 Región variable de cadena liviana

EIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKSNQNVLASSNDKNILAWFQHKPGQPLKLLIYWASIRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLRAEDVAVYYCQQYYTNPRTFGQGTKVEFN (SEC. ID NRO. 29)

4399 Región variable de cadena pesada

EVQLVQSGAEVKKPGTSVKVSCKASGYTFTDYYIHWVRLAPGQGLELMGWINPNTGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSIATAYMELSSLTSDDTAVYYCAKDCGNAGLRDIWGQGTTVTVSS (SEC. ID NRO. 30)

6267 Región variable de cadena liviana

DIQLTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQNVLYSSNNKNILAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYTSPPYTFGQGTKLEIE (SEC. ID NRO. 31)

6267 Región variable de cadena pesada

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIHPGDSKTRYSPSFQGQVTISADKSISTAILQWNSLKASDTAMYYCARLYCSGGSCYSDRAFSSLGAGGYYYYGMGVWGQGTTVTVSS (SEC. ID NRO. 32).

La invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado que se une al ácido teicoico de pared (WTA), que comprende una cadena L y una cadena H, donde la cadena L comprende CDR L1, L2 y L3, y la cadena H comprende CDR

H1, H2 y H3, en donde CDR L1, L2, L3 y H1, H2, H3 comprenden las secuencias de aminoácidos de las CDR de cada uno de los Ab 4461 (SEC. ID NRO. 1–6), 4624 (SEC. ID NRO. 7–12), 4399 (SEC. ID NRO. 13–18) y 6267 (SEC. ID NRO. 19–24), respectivamente, como se muestra en las Tablas 6A y 6B.

En otra forma de realización, el Ab monoclonal aislado que se une a WTA comprende una región variable de cadena H (VH) y una región variable de cadena L (VL), en donde la VH comprende al menos un 95% de identidad de secuencia respecto de la longitud de la secuencia de región VH de cada uno de los anticuerpos 4461, 4624, 4399 y 6267, respectivamente. En incluso otro aspecto específico, la identidad de secuencia es del 96%, 97%, 98%, 99% ó 100%.

La presente invención también proporciona Ab anti–WTA beta que comprenden las secuencias CDR de cadena L y H como se muestra en la Figura 14. En una forma de realización, los Ab monoclonales anti–WTA beta aislados comprenden las CDR L1, L2, L3 y H1, H2, H3 seleccionadas del grupo que consiste en las CDR de cada uno de los 13 Ab de la Figura 14. En otra forma de realización, la invención proporciona un Ab anti–WTA beta aislado que comprende al menos un 95% de identidad de secuencia respecto de la longitud de los dominios de la región V de cada uno de los 13 anticuerpos. En incluso otro aspecto específico, la identidad de secuencia es del 96%, 97%, 98%, 99% ó 100%.

De los 13 Ab anti–WTA beta, 6078 y 4497 fueron modificados para crear variantes i) que tienen un Cys modificada por ingeniería genética en una o ambas cadenas L y H para su conjugación con intermediarios ligador–antibiótico; y ii) en donde el primer residuo de la cadena H, Q, se altera a E (v2), o los dos primeros residuos, QM, se cambian a EI o EV (v3 y v4).

Las Figuras 15A–1 y 15A–2 proporcionan la secuencia de aminoácidos de la cadena L de longitud completa del Ab anti–WTA beta 6078 (no modificado) y

sus variantes, v2, v3, v4. Las variantes de cadena L que contienen una Cys modificada por ingeniería genética se indican con la C en el recuadro negro al final de la región constante (en el residuo de EU Nro. 205 en este caso). La designación de variante, por ejemplo, v2LC–Cys, significa la variante 2 que contiene una Cys modificada por ingeniería genética en la cadena L. HCLC–Cys significa que las cadenas tanto H como L del anticuerpo contienen una Cys modificada por ingeniería genética. Las Figuras 15B–1 a 15B–4 muestran una alineación de la cadena H de longitud completa de Ab anti–WTA beta 6078 (no modificado) y sus variantes, v2, v3, v4, las cuales tienen cambios en el primer residuo o en los 2 primeros residuos de la cadena H. Las variantes de cadena H que contienen una Cys modificada por ingeniería genética se indican con la C en el recuadro negro al final de la región constante (en el residuo de EU Nro. 118).

6078 Región variable de cadena liviana (VL)

DIVMTQSPSILSASVGDRVTITCRASQTISGWLAWYQQKPAEAPKLLIYKASTLES GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFGIYYCQQYKSYSFNFGQGTKVEIK (SEC. ID NRO.111)

6078 Región variable de cadena pesada (VH)

XX_1QLVQSGAEVKKPGASVKVSCEASGYTLTSYDINWVRQATGQGPEWMGWM NANSGNTGYAQKFQGRVTLTGDTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSSILVRGA LGRYFDLWGRGTLVTVSS (SEC. ID NRO.112) en donde X es Q o E; y X_1 es M, I o V.

6078 Cadena liviana

DIVMTQSPSILSASVGDRVTITCRASQTISGWLAWYQQKPAEAPKLLIYKASTLES GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFGIYYCQQYKSYSFNFGQGTKVEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEC. ID NRO.113)

6078 Cadena liviana con cisteína modificada por ingeniería genética

DIVMTQSPSILSASVGDRVTITCRASQTISGWLAWYQQKPAEAPKLLIYKASTLES
GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFGIYYCQQYKSYSFNFGQGTKVEIKRTVA
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP**C**TKSFNRGEC (SEC. ID NRO.115)

6078 Cadena pesada de longitud completa WT

QMQLVQSGAEVKKPGASVKVSCEASGYTLTSYDINWVRQATGQGPEWMGWM
NANSGNTGYAQKFQGRVTLTGDTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSSILVRGA
LGRYFDLWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP
VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEC. ID NRO.114)

6078 variante (v2, v3, o v4) cadena pesada de longitud completa

E**X**QLVQSGAEVKKPGASVKVSCEASGYTLTSYDINWVRQATGQGPEWMGWMN
ANSGNTGYAQKFQGRVTLTGDTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSSILVRGAL
GRYFDLWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV
TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN
TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS

CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEC. ID NRO.116), en donde X puede ser M, I o V.

6078 variante (v2, v3 o v4), Cadena pesada con Cys modificada por ingeniería genética

E**X**QLVQSGAEVKKPGASVKVSCEASGYTLTSYDINWVRQATGQGPEWMGWMN
ANSGNTGYAQKFQGRVTLTGDTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSSILVRGAL
GRYFDLWGRGTLVTVSS**C**STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV
TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN
TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEC. ID NRO.117), en donde X es M, I o V.

En una forma de realización, la invención proporciona un anticuerpo aislado anti–WTA beta que comprende una cadena pesada y una cadena liviana, en donde la cadena pesada comprende una VH que tiene al menos un 95% de identidad de secuencia con SEC. ID NRO. 112. En una forma de realización adicional, este anticuerpo además comprende una VL que tiene al menos un 95% de identidad de secuencia con SEC. ID NRO. 111. En una forma de realización específica, el anticuerpo anti–WTA beta comprende una cadena liviana y una cadena pesada, en donde la cadena L comprende una VL de SEC. ID NRO. 111 y la cadena H comprende una VH de SEC. ID NRO. 112. En una forma de realización incluso más específica, el anticuerpo aislado anti–WTA beta comprende una cadena L de SEC. ID NRO. 113 y una cadena H de SEC. ID NRO. 114.

Las variantes de cadena H y L 6078 con Cys modificada se pueden aparear en cualquiera de las siguientes combinaciones para formar Ab completos

para conjugarse con intermediarios de ligador–Abx, a fin de generar AAC anti–WTA de la invención. La cadena L no modificada (SEC. ID NRO.113) se puede aparear con una variante de cadena H con Cys modificada de SEC. ID NRO. 117; la variante puede ser una en la cual X es M, I o V. La cadena L con Cys modificada de SEC. ID NRO. 115 se puede aparear con: la cadena H de SEC. ID NRO.114; una variante de cadena H de SEC. ID NRO.116; o una variante de cadena H con Cys modificada de SEC. ID NRO.117 (en esta versión, ambas cadenas H y L tienen Cys modificada por ingeniería genética). En una forma de realización particular, el anticuerpo anti–WTA beta y el AAC anti–WTA beta de la invención comprenden una cadena L de SEC. ID NRO. 115 y una cadena H de SEC. ID NRO.116.

Las Figuras 16A–1 y 16A–2 proporcionan la cadena L de longitud completa del Ab anti–WTA beta 4497 (no modificado) y sus variantes v8. Las variantes de cadena L que contienen una Cys modificada por ingeniería genética se indican con la C en el recuadro negro al final de la región constante (en el residuo de EU Nro. 205). Las Figuras 16B–1, 16B–2, 16B–3 muestran una alineación de la cadena H de longitud completa de Ab anti–WTA beta 4497 (no modificado) y su variante v8, con D alterada a E en la posición CDR H3 96, con o sin la Cys modificada por ingeniería genética. Las variantes de cadena H que contienen una Cys modificada por ingeniería genética se indican con la C en el recuadro negro al final de la región constante (en el residuo de EU Nro. 118 en este caso). La CDR H3 no modificada es GDGGLDD (SEC. ID NRO.104); 4497v8 CDR H3 es GEGGLDD (SEC. ID NRO.118).

4497 Región variable de cadena liviana

DIQLTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSIFRTSRNKNLLNWYQQRPGQPPRLLIH
WASTRKSGVPDRFSGSGFGTDFTLTITSLQAEDVAIYYCQQYFSPPYTFGQGTKL
EIK (SEC. ID NRO. 119)

4497 Región variable de cadena pesada

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGFSFNSFWMHWVRQVPGKGLVWISFTN
NEGTTTAYADSVRGRFIISRDNAKNTLILEMNNLRGEDTAVYYCARGDGGLDDW
GQGTLVTVSS (SEC. ID NRO. 120)

4497.v8 Región variable de cadena pesada

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGFSFNSFWMHWVRQVPGKGLVWISFTN
NEGTTTAYADSVRGRFIISRDNAKNTLILEMNNLRGEDTAVYYCARG**E**GGLDDW
GQGTLVTVSS (SEC. ID NRO. 156)

4497 Cadena liviana

DIQLTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSIFRTSRNKNLLNWYQQRPGQPPRLLIH
WASTRKSGVPDRFSGSGFGTDFTLTITSLQAEDVAIYYCQQYFSPPYTFGQGTKL
EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE
C (SEC. ID NRO. 121)

4497 v.8 Cadena pesada

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGFSFNSFWMHWVRQVPGKGLVWISFTN
NEGTTTAYADSVRGRFIISRDNAKNTLILEMNNLRGEDTAVYYCARG**E**GGLDDW
GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE
PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE

WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH
NHYTQKSLSLSPG (SEC. ID NRO. 122)

4497 –Cys Cadena liviana

DIQLTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSIFRTSRNKNLLNWYQQRPGQPPRLLIH
WASTRKSGVPDRFSGSGFGTDFTLTITSLQAEDVAIYYCQQYFSPPYTFGQGTKL
EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE
C (SEC. ID NRO. 123)

4497.v8– Cadena pesada

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGFSFNSFWMHWVRQVPGKGLVWISFTN
NEGTTTAYADSVRGRFIISRDNAKNTLILEMNNLRGEDTAVYYCARG**E**GGLDDW
GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE
PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH
NHYTQKSLSLSPG (SEC. ID NRO. 157; lo mismo que SEC. ID NRO. 122)

4497.v8 –Cys Cadena pesada

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGFSFNSFWMHWVRQVPGKGLVWISFTN
NEGTTTAYADSVRGRFIISRDNAKNTLILEMNNLRGEDTAVYYCARG**E**GGLDDW
GQGTLVTVSSCSTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE
PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE

WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG (SEC. ID NRO. 124)

Otro anticuerpo aislado anti–WTA beta proporcionado por la invención comprende una cadena pesada y una cadena liviana, en donde la cadena pesada comprende una VH que tiene al menos un 95% de identidad de secuencia con SEC. ID NRO. 120. En una forma de realización adicional, este anticuerpo además comprende una VL que tiene al menos un 95% de identidad de secuencia con SEC. ID NRO. 119. En una forma de realización específica, el anticuerpo anti–WTA beta comprende una cadena liviana y una cadena pesada, en donde la cadena L comprende una VL de SEC. ID NRO. 119 y la cadena H comprende una VH de SEC. ID NRO. 120. En una forma de realización incluso más específica, el anticuerpo aislado anti–WTA beta comprende una cadena L de SEC. ID NRO. 121 y una cadena H de SEC. ID NRO. 122.

Las variantes de cadena H y L 4497 con Cys modificada se pueden aparear en cualquiera de las siguientes combinaciones para formar Ab completos para conjugar con intermediarios de ligador–Abx, a fin de generar AAC anti–WTA de la invención. La cadena L no modificada (SEC. ID NRO.121) se puede aparear con una variante de cadena H con Cys modificada de SEC. ID NRO. 124. La cadena L con Cys modificada de SEC. ID NRO. 123 se puede aparear con: la variante de cadena H de SEC. ID NRO.157; o una variante de cadena H con Cys modificada de SEC. ID NRO.124 (en esta versión, ambas cadenas H y L tienen Cys modificada por ingeniería genética). En una forma de realización particular, el anticuerpo anti–WTA beta y el AAC anti–WTA beta de la invención comprenden una cadena L de SEC. ID NRO. 123.

Incluso otra forma de realización es un anticuerpo que se une al mismo epítopo que cada uno de los Ab anti–WTA alfa de la Figura 13A y la Figura 13B. También se proporciona un anticuerpo que se une al mismo epítopo que cada uno

de los Ab anti–WTA beta de la Figura 14, las Figuras 15A y 15B, y las Figuras 16A y 16B.

La unión de anticuerpos anti–WTA a WTA está influenciada por la orientación anomérica de las modificaciones de GlcNAc–azúcar en WTA. Los WTA son modificados por modificaciones del azúcar N–acetilglucosamina (GlcNAc) en la posición C4–OH a través de enlaces α– o β–glucosídicos, por TarM glucosiltransferasa o TarS glucosiltransferasa, respectivamente. Por consiguiente, las preparaciones de pared celular a partir de cepas mutantes de glucosiltransferasa que carecen de TarM(ΔTarM), TarS (ΔTarS), o tanto TarM como TarS (ΔTarM/ΔTarS) se sometieron a análisis por inmunoblotting con anticuerpos contra WTA. El anticuerpo contra WTA (S7574) específico para modificaciones de α–GlcNAc en WTA no se une a la preparación de pared celular a partir de la cepa ΔTarM. Viceversa, un anticuerpo WTA (S4462) específico para modificaciones de β–GlcNAc en WTA no se une bien a la preparación de pared celular de cepa ΔTarS. Como se esperaba, estos dos anticuerpos no se unen a las preparaciones de pared celular de una cepa de deleción que carece de ambas glucosiltransferasas (ΔTarM/ΔTarS) y también la cepa que carece de cualquier WTA (ΔTagO). De acuerdo con dicho análisis, los anticuerpos se han caracterizado como mAb anti–α–GlcNAc WTA, o como mAb anti–β–GlcNAc WTA, según se enumera en la Tabla de las Figuras 6A y 6B.

Los aminoácidos de cisteína se pueden modificar por ingeniería genética en sitios reactivos en un anticuerpo y no forman enlaces de disulfuro intracatenarios o intermoleculares (Junutula, *et al*., 2008b Nature Biotech., 26(8):925–932; Dornan *et al* (2009) Blood 114(13):2721–2729; US 7521541; US 7723485; WO2009/052249, Shen *et al* (2012) Nature Biotech., 30(2):184–191; Junutula *et al* (2008) Jour of Immun. Métodos 332:41–52). Los tioles de cisteína modificada por ingeniería genética pueden reaccionar con reactivos ligadores o

los intermediarios de ligador–antibiótico de la presente invención que tienen grupos electrofílicos reactivos al thiol, tales como maleimida o alfa–halo amidas, para formar AAC con anticuerpos con cisteína modificada por ingeniería genética (tioMabs) y los restos de antibiótico (abx). La ubicación del resto de antibiótico de esta forma se puede diseñar, controlar y conocer. La carga de antibiótico se puede controlar, ya que los grupos de thiol cisteína modificados por ingeniería genética típicamente reaccionan con reactivos ligadores que reaccionan con thiol o intermediarios de ligador–antibiótico con un alto rendimiento. La modificación por ingeniería genética de un anticuerpo anti–WTA para introducir un aminoácido de cisteína por sustitución en un solo sitio de la cadena pesada o liviana proporciona dos nuevas cisteínas en el anticuerpo tetrámero simétrico. Se puede lograr una carga de antibiótico cercana a 2 y la casi homogeneidad del producto de conjugación AAC.

En ciertas formas de realización, se puede desear crear anticuerpos anti–WTA con cisteína modificada, por ejemplo, “tioMAb”, en los cuales uno o varios residuos de un anticuerpo son sustituidos con residuos de cisteína. En formas de realización particulares, los residuos sustuidos se producen en sitios accesibles del anticuerpo. Al sustituir estos residuos con cisteína, los grupos de thiol reactivos se posicionan así en sitios accesibles del anticuerpo y se pueden usar para conjugar el anticuerpo con otros restos, tales como restos de antibióticos o restos de ligador–antibiótico, para crear un inmunoconjugado, como se describe adicionalmente en la presente. En ciertas formas de realización, uno o varios cualesquiera de los siguientes residuos se pueden sustituir con cisteína, incluido V205 (numeración de Kabat) de la cadena liviana; A118 (numeración de EU) de la cadena pesada; y S400 (numeración de EU) de la región Fc de cadena pesada. Se muestran ejemplos no limitativos de mutantes de cadena pesada con cisteína modificada A118C (SEC. ID NRO.: 149) y cadena liviana V205C (SEC. ID

NRO.:151) de un anticuerpo anti–WTA. Los anticuerpos anti–WTA con cisteína modificada se pueden generar como se describe (Junutula, *et al*., 2008b Nature Biotech., 26(8):925–932; US 7521541; US–2011/0301334.

En otra forma de realización, la invención se refiere a un anticuerpo aislado anti–WTA que comprende una cadena pesada y una cadena liviana, en donde la cadena pesada comprende un mutante de secuencia de región constante de cadena pesada de tipo salvaje o con cisteína modificada (TioMab) y la cadena liviana comprende un mutante de secuencia de región constante de cadena liviana de tipo salvaje o con cisteína modificada (TioMab). En un aspecto, la cadena pesada tiene al menos un 95% de identidad de secuencia con:

Región constante de cadena pesada (IgG1), tipo salvaje

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE
PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEC. ID NRO.:148)

Región constante de cadena pesada (IgG1), A118C "TioMab"

CSTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE
PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS

LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEC. ID NRO.:149)

y la cadena liviana tiene al menos un 95% de identidad de secuencia con:

Región constante de cadena liviana (kappa), tipo salvaje

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG
NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK
SFNRGEC

(SEC. ID NRO.:150)

Región constante de cadena liviana (kappa), V205C "TioMab"

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG
NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPCTK
SFNRGEC

(SEC. ID NRO.:151)

Los AAC de la invención incluyen anticuerpos anti–WTA con cisteína modificada, donde uno o varios aminoácidos de un anticuerpo anti–WTA de tipo salvaje o parental son reemplazados por un aminoácido de cisteína. Toda forma de anticuerpo puede ser modificada de esta manera, o sea, mutada. Por ejemplo, un fragmento de anticuerpo Fab parental se puede modificar para formar un Fab con cisteína modificada, denominado “TioFab” en la presente. De igual modo, un anticuerpo monoclonal parental se puede modificar por ingeniería genética para formar un “TioMab”. Se debe notar que una mutación de único sitio proporciona un único residuo de cisteína modificado por ingeniería genética en un TioFab, mientras que una mutación de único sitio proporciona dos residuos de cistenía

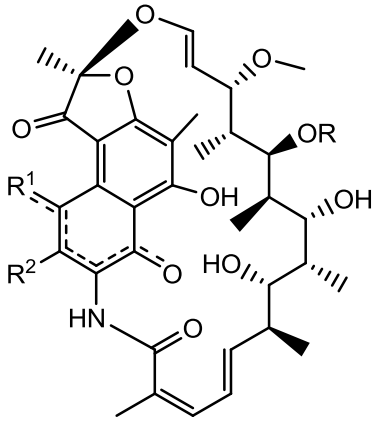
modificados por ingeniería genética en un TioMab, debido a la naturaleza dimérica del anticuerpo de IgG. Los mutantes con residuos de cisteína (Cys) reemplazados (“modificados por ingeniería genética”) son evaluados para determinar la reactividad de los grupos tiol de cisteína modificados por ingeniería genéticate recientemente introducidos.

RESTOS DE ANTIBIÓTICO TIPO RIFAMICINA

El resto de antibiótico (abx) de los conjugados de anticuerpo–antibiótico (AAC) de la invención es un antibiótico tipo rifamicina o grupo que tiene un efecto citotóxico o citostático. Las rifamicinas son un grupo de antibióticos que se obtienen ya sea naturalmente por las bacterias *Nocardia mediterranei, Amycolatopsis mediterranei,* o artificialmente. Son una subclase de la familia más grande de ansamicinas, que inhiben la polimerasa de ARN bacteriana (Fujii *et al* (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39:1489–1492; Feklistov, *et al* (2008) Proc Natl Acad Sci USA, 105(39): 14820–5) y tienen potencia contra bacterias Gram–positivas y Gram–negativas selectivas. Las rifamicinas son particularmente efectivas contra micobacterias, y por lo tanto se usan para tratar la tuberculosis, la lepra y las infecciones por el complejo *mycobacterium avium* (MAC). El grupo tipo rifamicina incluye las "clásicas" drogas de rifamicina, así como los derivados de rifamicina, rifampicina (rifampina, CA Reg. Nro. 13292–46–1), rifabutina (CA Reg. Nro. 72559–06–9; US 2011/0178001), rifapentina y rifalazilo (CA Reg. Nro. 129791–92–0, Rothstein *et al* (2003) Expert Opin. Investig. Drugs 12(2):255–271; Fujii *et al* (1994) Antimicrob. Agents Chemother. 38:1118–1122. Muchos antibióticos tipo rifamicina comparten la propiedad perjudicial de desarrollo de resistencia (Wichelhaus *et al* (2001) J. Antimicrob. Chemother. 47:153–156). Las rifamicinas fueron aisladas por primera vez en 1957 a partir de un cultivo de fermentación de *Streptomyces mediterranei*. Se descubrieron alrededor de siete rifamicinas, denominadas rifamicina A, B, C, D, E, S y SV (US 3150046). La

rifamicina B fue introducida por primera vez en el mercado y resultó útil en el tratamiento de la tuberculosis resistente a los fármacos en la década de 1960. Las rifamicinas se han utilizado para el tratamiento de numerosas enfermedades, entre las cuales la más importante es la tuberculosis relacionada con el VIH. Debido a la gran cantidad de análogos y derivados disponibles, las rifamicinas han sido ampliamente utilizadas en la eliminación de bacterias patogénicas que se han vuelto resistentes a los antibióticos usados comúnmente. Por ejemplo, la rifampicina es conocida por su potente efecto y su capacidad para prevenir la resistencia a los fármacos. Destruye rápidamente las cepas de bacilos de rápida división, así como las células “persistentes”, que permanecen biológicamente inactivas durante largos períodos de tiempo, que les permiten evadir la actividad antibiótica. Asimismo, la rifabutina y la rifapentina han sido usadas ambas contra la tuberculosis adquirida en pacientes VIH–positivos.

Los restos de antibióticos (abx) de los conjugados anticuerpo–antibiótico de Fórmula I son restos tipo rifamicina que tienen la siguiente estructura:



en donde:

las líneas punteadas indican un enlace opcional;

R es H, alquiloC_1–C_{12} o $C(O)CH_3$;

R^1 es OH;

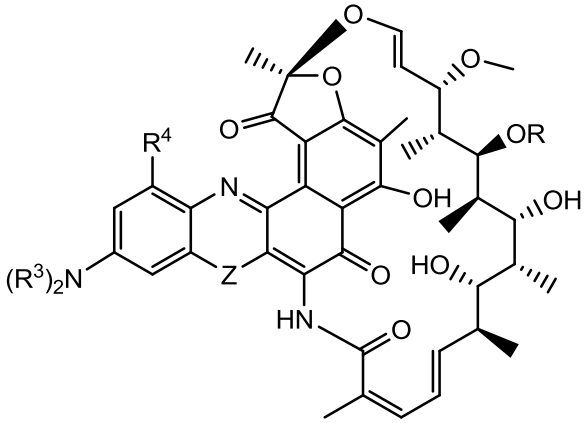
R^2 es CH=N–(heterociclilo), en donde el heterociclilo está opcionalmente sustituido con uno o varios grupos seleccionados independientemente de

$C(O)CH_3$, alquiloC_1–C_{12}, heteroariloC_1–C_{12}, heterocicliloC_2–C_{20}, ariloC_6–C_{20} y carbocicliloC_3–C_{12};

o R^1 y R^2 forman un heteroarilo o heterociclilo fusionado de 5 ó 6 miembros, y formando opcionalmente un anillo heteroarilo, heterociclilo, arilo o carbociclilo spiro o fusionado de 6 miembros, en donde el anillo heteroarilo, heterociclilo, arilo o carbociclilo spiro o fusionado de 6 miembros está opcionalmente sustituido con H, F, Cl, Br, I, alquiloC_1–C_{12} o OH; y

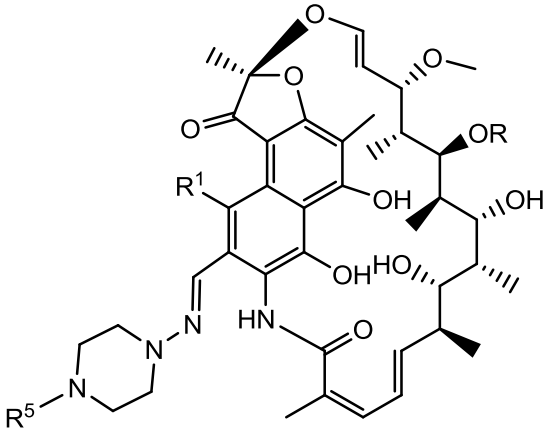
donde el ligador peptídico L está unido en forma covalente con R^2.

Una forma de realización de un resto tipo rifamicina es:



en donde R^3 se selecciona independientemente de H y alquiloC_1–C_{12}; R^4 se selecciona de H, F, Cl, Br, I, alquiloC_1–C_{12} y OH; y Z se selecciona de NH, N(alquiloC_1–C_{12}), O y S; y donde the ligador peptídico L está unido en forma covalente con el átomo de nitrógeno de $N(R^3)_2$.

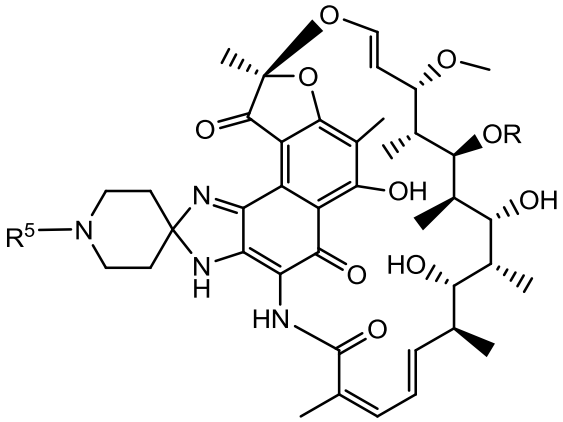
Una forma de realización de un resto tipo rifampicina es:



en donde

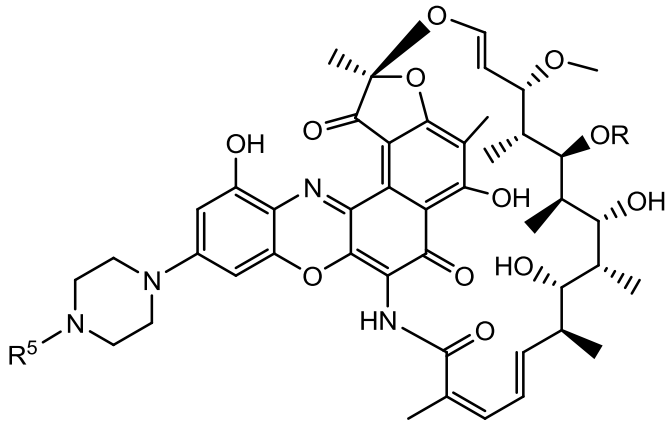
R^5 se selecciona de H y alquiloC_1–C_{12}; y donde el ligador peptídico L está unido en forma covalente con el átomo de nitrógeno de NR^5.

Una forma de realización de un resto tipo rifabutina es:



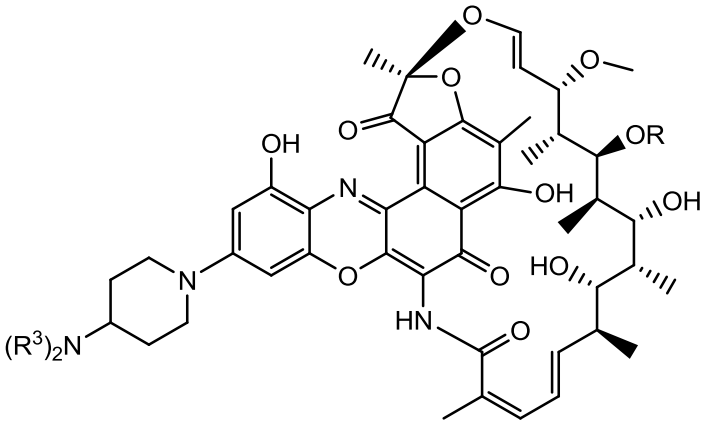
en donde R^5 se selecciona de H y alquiloC_1–C_{12}; y donde el ligador peptídico L está unido en forma covalente con el átomo de nitrógeno de NR^5.

Una forma de realización de un resto tipo benzoxazinorifamicina es:



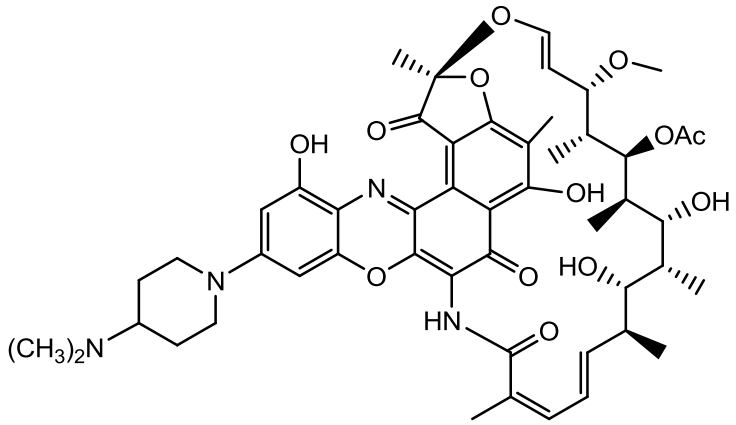
en donde R^5 se selecciona de H y alquiloC_1–C_{12}; y donde el ligador peptídico L está unido en forma covalente con el átomo de nitrógeno de NR^5.

Una forma de realización de un resto tipo benzoxazinorrifamicina, denominado pipBOR en la presente, es:



en donde R^3 se selecciona independientemente de H y alquiloC_1–C_{12}; y donde el ligador peptídico L está unido en forma covalente con el átomo de nitrógeno de $N(R^3)_2$.

Una forma de realización de un resto tipo benzoxazinorrifamicina, denominado dimetil pipBOR en la presente, es:

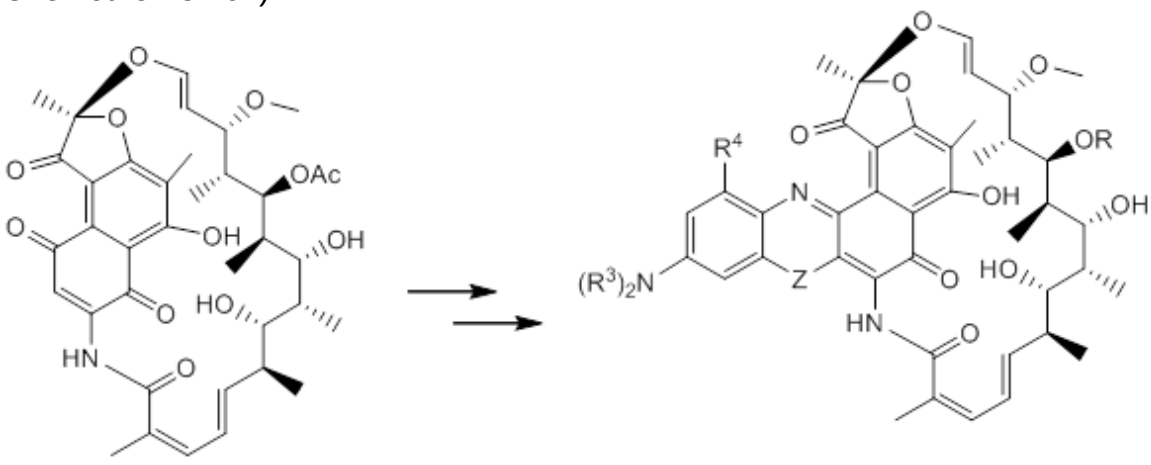


donde el ligador peptídico L está unido en forma covalente con el átomo de nitrógeno de $N(CH_3)_2$.

El derivado semisintético rifamicina S, o la forma de sal de sodio reducida rifamicina SV, se puede convertir en antibióticos tipo rifalazilo en varios pasos, donde R es H, o Ac, R^3 se selecciona independientemente de H y alquiloC_1–C_{12}; R^4 se selecciona de H, F, Cl, Br, I, alquiloC_1–C_{12} y OH; y Z se selecciona de NH, N(alquiloC_1–C_{12}), O y S, según se ejemplifica en las Figuras 9–11. Se pueden preparar benzoxazino (Z = O), benztiazino (Z = S), benzdiazino (Z = NH, N(alquilC_1–C_{12}) rifamicinas (US 7271165). Los análogos de

benzoxazinorrifamicina (BOR), benztiazinorrifamicina (BTR) y benzdiazinorrifamicina (BDR) que contienen sustituyentes se numeran de acuerdo con el esquema de numeración provisto en la fórmula A, columna 28, de US 7271165, que se incorpora por referencia con este fin. Por "25–O–deacetil" rifamicina se entiene un análogo de rifamicina en el cual se ha eliminado el grupo acetilo en la posición 25. Los análogos en los cuales esta posición está adicionalmente derivada se denominan “25–O–deacetil–25–(sustituyente)rifamicina”, en la cual la nomenclatura para el grupo derivador reemplaza “sustituyente” en el nombre completo del compuesto.

Los restos de antibióticos tipo rifamicina se pueden sintetizar mediante métodos análogos a aquellos divulgados en US 4610919; US 4983602; US 5786349; US5981522; US 4859661; US 7271165; US 2011/0178001; Seligson, *et al*., (2001) Anti–Cancer Drugs 12:305–13; Chem. Pharm. Bull., (1993) 41:148, cada uno de los cuales se incorpora a la presente por referencia. Los restos de antibióticos tipo rifamicina se pueden seleccionar en cuanto a su actividad antimicrobiana midiendo su concentración inhibitoria mínima (MIC) a través de ensayos estándar de MIC *in vitro* (Tomioka *et al*., (1993) Antimicrob. Agents Chemother. 37:67).



rifamicina–S benzoxazinorrifamicina

LIGADORES PEPTÍDICOS

Un “ligador peptídico” (L) es un resto bifuncional o multifuncional que está unido en forma covalente con uno o varios restos de antibiótico (abx) y una unidad de anticuerpo (Ab) para formar conjugados de anticuerpo–antibiótico (AAC) de Fórmula I. Los ligadores peptídicos de AAC son sustratos para la escisión por proteasas intracelulares, incluidas condiciones lisosomales. Las proteasas incluyen distintas catepsinas y caspasas. La escisión del ligador peptídico de un AAC dentro de una célula puede liberar el antibiótico tipo rifamicina con efectos antibacterianos.

La cantidad de antibiótico activo liberado a partir de la escisión de AAC se puede medir mediante el ensayo de liberación de caspasa del Ejemplo 20.

Los conjugados de anticuerpo–antibiótico (AAC) se pueden preparar convenientemente usando un reactivo ligador o un intermediario de ligador–antibiótico que tenga una funcionalidad reactiva para unirse con el antibiótico (abx) y con el anticuerpo (Ab). En una forma de realización ilustrativa, un tiol de cisteína de un anticuerpo (Ab) con cisteína modificada puede formar un enlace con un grupo funcional de un reactivo ligador, un resto de antibiótico o un intermediario de antibiótico–ligador.

El resto de ligador peptídico de un AAC, en un aspecto, un reactivo ligador o intermediario de ligador–antibiótico tiene un sitio reactivo que posee un grupo electrofílico que es reactivo con una cisteína nucleofílica presente en un anticuerpo. El tiol de cisteína del anticuerpo es reactivo con un grupo electrofílico de un reactivo ligador o ligador–antibiótico, lo cual forma un enlace covalente. Los grupos electrofílicos útiles incluyen, aunque no a modo de limitación, grupos maleimida y haloacetamida.

Los anticuerpos con cisteína modificada reaccionan con reactivos ligadores o intermediarios de ligador–antibiótico, con grupos funcionales electrofílicos tales como maleimida o α–halo carbonilo, de acuerdo con el método de conjugación de

la página 766 de Klussman *et al* (2004), *Bioconjugate Chemistry* 15(4):765–773, y de acuerdo con el protocolo del Ejemplo 19.

En otra forma de realización, el grupo reactivo de un reactivo ligador o intermediario de ligador–antibiótico contiene un grupo funcional reactivo con tiol que puede formar un enlace con un tiol de cisteína libre de un anticuerpo. Los ejemplos de grupos funcionales reactivos con tiol incluyen, aunque no a modo de limitación, maleimida, α–haloacetilo, ésteres activados tales como ésteres de succinimida, ésteres de 4–nitrofenilo, ésteres de pentafluorofenilo, ésteres de tetrafluorofenilo, anhídridos, cloruros de ácidos, cloruros de sulfonilo, isocianatos e isotiocianatos.

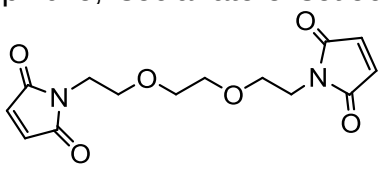
En otra forma de realización, un reactivo ligador o intermediario de antibiótico–ligador tiene un grupo funcional reactivo que tiene un grupo nucleofílico que es reactivo con un grupo electrofílico presente en un anticuerpo. Los grupos electrofílicos útiles en un anticuerpo incluyen, aunque no a modo de limitación, grupos de disulfuro de piridilo, aldehído y cetona carbonilo. El heteroátomo de un grupo nucleofílico de un reactivo ligador o intermediario de antibiótico–ligador puede reaccionar con un grupo electrofílico en un anticuerpo y formar un enlace covalente con una unidad del anticuerpo. Los grupos nucleofílicos útiles en un reactivo ligador o intermediario de antibiótico–ligador incluyen, aunque no a modo de limitación, hidrazida, oxima, amino, tiol, hidrazina, tiosemicarbazona, hidrazina carboxilato y arilhidrazida. El grupo electrofílico en un anticuerpo proporciona un sitio conveniente para la unión con un reactivo ligador o intermediario de antibiótico–ligador.

Un ligador peptídico puede comprender uno o varios componentes ligadores. Los componentes ligadores ilustrativos incluyen una unidad peptídica, 6–maleimidocaproílo (“MC”), maleimidopropanoílo (“MP”), valina–citrulina (“val–cit” o “vc”), alanina–fenilalanina (“ala–phe”) y p–aminobenciloxicarbonilo (“PAB”),

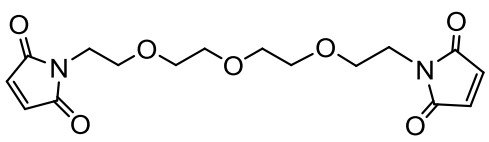
N–succinimidil 4–(2–piridiltio) pentanoato (“SPP”) y 4–(N–maleimidometil) ciclohexano–1 carboxilato (“MCC”). Se conocen diversos componentes ligadores en el arte, algunos de los cuales se describen a continuación.

En otra forma de realización, el ligador puede estar sustituido con grupos que modulan la solubilidad o reactividad. Por ejemplo, un sustituyente cargado, tal como sulfonato ($–SO_3^–$) o amonio, puede aumentar la hidrosolubilidad del reactivo y facilitar la reacción de acoplamiento del reactivo ligador con el resto de anticuerpo o antibiótico, o facilitar la reacción de acoplamiento de Ab–L (intermediario de anticuerpo–ligador) con abx, o abx–L (intermediario de antibiótico–ligador) con Ab, dependiendo de la vía de síntesis empleada para preparar el AAC.

Los AAC de la invención expresamente contemplan, aunque no a modo de limitación, aquellos preparados con reactivos ligadores: BMPEO, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC–SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo–EMCS, sulfo–GMBS, sulfo–KMUS, sulfo–MBS, sulfo–SIAB, sulfo–SMCC, sulfo–SMPB, SVSB (succinimidil–(4–vinilsulfona)benzoato), y reactivos de bis–maleimida tales como DTME, BMB, BMDB, BMH, BMOE, $BM(PEG)_2$ y $BM(PEG)_3$. Los reactivos de bis–maleimida permiten la unión del grupo tiol de un anticuerpo con cisteína modificada a un resto de antibiótico que contiene tiol, etiqueta o intermediario de ligador, de manera secuencial o convergente. Otros grupos funcionales además de la maleimida, que son reactivos con un grupo tiol de un anticuerpo con cisteína modificada, resto de antibiótico o intermediario de ligador–antibiótico, incluyen iodoacetamida, bromoacetamida, vinil piridina, disulfuro, disulfuro de piridilo, isocianato e isotiocianato.



$BM(PEG)_2$



$BM(PEG)_3$

Los reactivos ligadores útiles también se pueden obtener a través de otras fuentes comerciales, tales como Molecular Biosciences Inc. (Boulder, CO), o se pueden sintetizar de acuerdo con los procedimientos descritos en Toki *et al* (2002) J. Org. Chem. 67:1866–1872; Dubowchik, *et al*. (1997) Tetrahedron Letters, 38:5257–60; Walker, M.A. (1995) J. Org. Chem. 60:5352–5355; Frisch *et al* (1996) Bioconjugate Chem. 7:180–186; US 6214345; WO 02/088172; US 2003130189; US2003096743; WO 03/026577; WO 03/043583; y WO 04/032828.

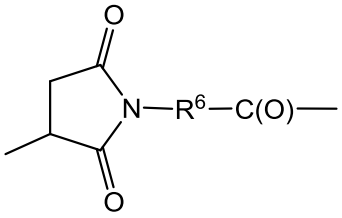
En otra forma de realización, el resto de ligador peptídico de un AAC comprende un ligador de tipo dendrítico para la unión covalente de más de un resto de antibiótico a través de un resto de ligador multifuncional ramificado a un anticuerpo (Sun *et al* (2002) *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 12:2213–2215; Sun *et al* (2003) *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 11:1761–1768). Los ligadores dendríticos pueden aumentar la relación molar de antibiótico a anticuerpo, es decir, la carga, lo cual se relaciona con la potencia del AAC. De esta forma, cuando un anticuerpo con cisteína modificada tiene un solo grupo tiol de cisteína reactivo, se puede unir una multitud de restos de antibiótico a través de un ligador dendrítico.

En ciertas formas de realización del AAC de Fórmula I, el ligador peptídico tiene la fórmula:

$$-Str-Pep-Y-$$

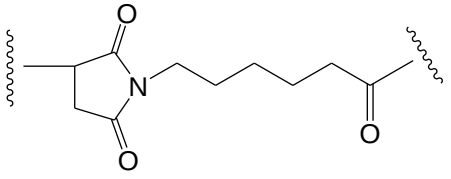
donde Str es una unidad extensora unida en forma covalente con el anticuerpo anti–ácido teicoico de pared (WTA); Pep es un péptido de 2 a 12 residuos de aminoácidos, e Y es una unidad espaciadora unida en forma covalente con el antibiótico tipo rifamicina. Las formas de realización ilustrativas de dichos ligadores se describen en US 7498298, expresamente incorporado a la presente por referencia.

En una forma de realización, una unidad extensora "Str" tiene la fórmula:

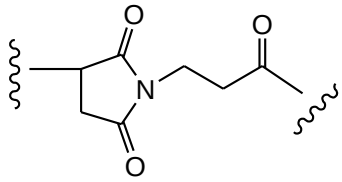


en donde R^6 se selecciona del grupo que consiste en alquilenC_1–C_{10}–, –carbocicloC$_3$–C$_8$, –O–(alquiloC$_1$–C$_8$)–, –arileno–, –alquilenC$_1$–C$_{10}$–arileno–, –arilen–alquilenoC$_1$–C$_{10}$–, –alquilenC$_1$–C$_{10}$–(carbocicloC$_3$–C$_8$)–, –(carbocicloC$_3$–C$_8$)–alquilenoC$_1$–C$_{10}$–, –heterocicloC$_3$–C$_8$–, –alquilenC$_1$–C$_{10}$–(heterocicloC$_3$–C$_8$)–, –(heterocicloC$_3$–C$_8$)–alquilenoC$_1$–C$_{10}$–, –$(CH_2CH_2O)_r$– y –$(CH_2CH_2O)_r$–CH_2–; y r es un número entero que va de 1 a 10.

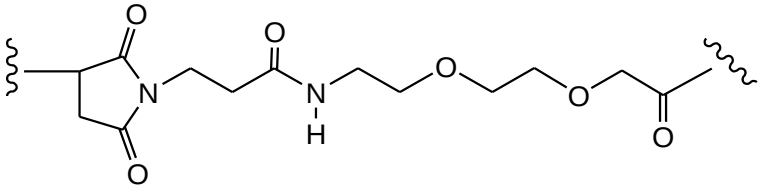
Los ejemplos de unidades extensoras se muestran a continuación (en donde la línea ondulada indica sitios de unión covalente a un anticuerpo):

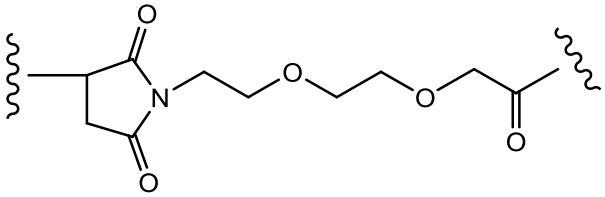


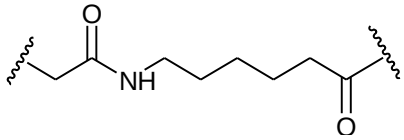
MC



MP







.

Una unidad peptídica "Pep" comprende dos o más residuos de aminoácidos que se producen naturalmente, incluidos los 20 aminoácidos

principales, así como aminoácidos menores tales como citrulina, los cuales son bien conocidos en el campo de la bioquímica. Los aminoácidos se distinguen por su cadena lateral. La unidad peptídica así comprende dos o más cadenas laterales de aminoácidos, incluyendo, sin limitaciones, $-CH_3$ (alanina), $-CH_2CH_2CH_2NHC(NH)NH_2$ (arginina), $-CH_2C(O)NH_2$ (asparagina), $-CH_2CO_2H$ (ácido aspártico), $-CH_2CH_2CH_2NHC(O)NH_2$ (citrulina), $-CH_2SH$ (cisteína), $-CH_2CH_2CO_2H$ (ácido glutámico), $-CH_2CH_2C(O)NH_2$ (glutamina), $-H$ (glicina), $-CH_2$(imidazolil) (histidina), $-CH(CH_3)CH_2CH_3$ (isoleucina), $-CH_2CH(CH_3)CH_3$ (leucina), $-CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2$ (lisina), $-CH_2CH_2SCH_3$ (metionina), $-CH_2(C_6H_5)$ (fenilalanina), $-CH_2CH_2CH_2-$ (prolina), $-CH_2OH$ (serina), $-CH(OH)CH_3$ (treonina), $-CH_2$(indol) (triptofano), $-CH_2(p-C_6H_4OH)$ (tirosina), $-CHCH(CH_3)CH_3$ (valina). Véase la página 1076–1077, "Organic Chemistry" 5th Ed. John McMurry, Brooks/Cole pub. (2000). Los residuos de aminoácidos de la unidad peptídica incluyen todos los estereoisómeros, y pueden tener las configuraciones D o L. En una forma de realización, Pep comprende de 2 a 12 residuos de aminoácidos independientemente seleccionados de glicina, alanina, fenilalanina, lisina, arginina, valina y citrulina. En dicha forma de realización, la unidad de aminoácido permite la escisión del ligador por una proteasa, con lo cual facilita la liberación del antibiótico desde el AAC tras la exposición a proteasas intracelulares, tales como enzimas lisosomales (Doronina *et al*. (2003) *Nat. Biotechnol.* 21:778–784). Los ejemplos de unidades de aminoácidos incluyen, aunque no a modo de limitación, un dipéptido, un tripéptido, un tetrapéptido, un pentapéptido y un hexapéptido. Los ejemplos de dipéptidos incluyen: valina–citrulina (vc o val–cit), alanina–fenilalanina (af o ala–phe); fenilalanina–lisina (fk o phe–lys); o N–metil–valina–citrulina (me–val–cit). Los ejemplos de tripéptidos incluyen: glicina–valina–citrulina (gly–val–cit) y glicina–glicina–glicina (gly–gly–gly). Los ligadores peptídicos se pueden preparar formando un enlace peptídico entre dos o más

aminoácidos y/o fragmentos de péptidos. Dichos enlaces peptídicos se pueden preparar, por ejemplo, de acuerdo con el método de síntesis en fase líquida (E. Schröder y K. Lübke (1965) “The Peptides”, volumen 1, pp 76–136, Academic Press), que es bien conocido en el campo de la química de péptidos. Las unidades de aminoácidos se pueden designar y optimizar en su selectividad para la escisión enzimática por parte de una enzima particular, por ejemplo, una proteasa asociada al tumor, catepsina B, C y D, o una proteasa plasmina.

En una forma de realización, la unidad espaciadora Y comprende para–aminobencilo o para–aminobenciloxicarbonilo. Una unidad espaciadora “no auto–inmolativa” es una en la cual una parte o toda la unidad espaciadora permanece unida al resto de antibiótico tras la escisión enzimática (por ejemplo, proteolítica) del AAC. Los ejemplos de unidades espaciadoras no auto–inmolativas incluyen, aunque no a modo de limitación, una unidad espaciadora de glicina y una unidad espaciadora de glicina–glicina. También se contemplan otras combinaciones de espaciadores peptídicos susceptibles de escisión enzimática específica de secuencia. Por ejemplo, la escisión enzimática de un AAC que contiene una unidad espaciadora de glicina–glicina por parte de una proteada asociada con células tumorales daría por resultado la liberación de un resto de antibiótico de glicina–glicina desde la parte restante del AAC. En dicha forma de realización, el resto de antibiótico de glicina–glicina se somete luego a un paso de hidrólisis separado en la célula tumoral, con lo que escinde la unidad espaciadora de glicina–glicina desde el resto de antibiótico.

Una unidad espaciadora permite la liberación del resto de antibiótico sin un paso de hidrólsis separado. Una unidad espaciadora puede ser “auto–inmolativa” o “no auto–inmolativa”. En ciertas formas de realización, una unidad espaciadora de un ligador comprende una unidad de p–aminobencilo (PAB). En dicha forma de realización, un alcohol p–aminobencílico se une a una unidad de aminoácido a

través de un enlace amida, un carbamato, metilcarbamato o carbonato entre el grupo p–aminobencilo y el resto de antibiótico (Hamann *et al*. (2005) *Expert Opin. Ther. Patents* (2005) 15:1087–1103). En una forma de realización, la unidad espaciadora es p–aminobenciloxicarbonilo (PAB).

En una forma de realización, el antibiótico forma una amina cuaternaria, tal como el grupo de dimetilaminopiperidilo, cuando se une a la unidad espaciadora PAB del ligador peptídico. Los ejemplos de dichas aminas cuaternarias son los intermediarios de ligador–antibiótico (LA) **54, 61, 66, 67, 73, 74, 76, 78, 79, 83, 84** de la Tabla 2. El grupo de amina cuaternaria puede modular la escisión del resto de antibiótico para optimizar los efectos antibacterianos del AAC. En otra forma de realización, el antibiótico se une a la unidad espaciadora PABC del ligador peptídico, con lo cual forma un grupo funcional carbamato en el AAC. Dicho grupo funcional carbamato también puede optimizar los efectos antibacterianos del AAC. Los ejemplos de intermediarios de ligador–antibiótico (LA) de PABC carbamato son **51, 52, 53, 55, 56, 57, 58, 62, 63, 64, 65, 72, 75, 80, 81, 87** de la Tabla 2. Otros intermediarios de ligador–antibiótico (LA) emplean grupos amida (**59, 69, 70, 71, 77, 82, 85**) o fenólicos (**60, 68, 86**).

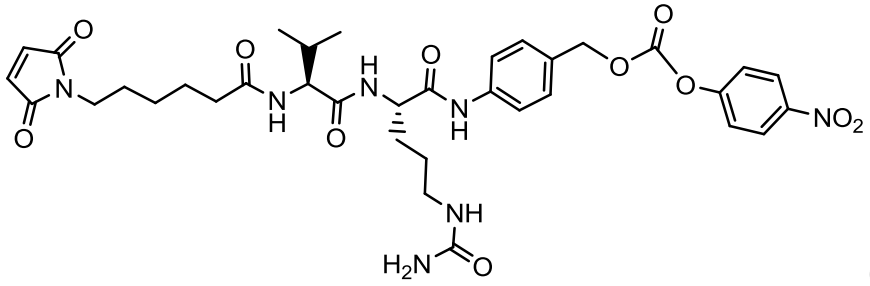
Otros ejemplos de espaciadores auto–inmolativos incluyen, aunque no a modo de limitación, compuestos aromáticos que son electrónicamente similares al grupo PAB, tales como derivados de 2–aminoimidazol–5–metanol (US 7375078; Hay *et al*. (1999) *Bioorg. Med. Chem. Lett*. 9:2237) y orto– o para–aminobencilacetales. Se pueden usar espaciadores que sufran ciclización tras la hidrólisis del enlace amida, tales como amidas del ácido 4–aminobutírico sustituidas y no sustituidas (Rodrigues *et al* (1995) Chemistry Biology 2:223), sistemas anulares de biciclo[2.2.1] y biciclo[2.2.2] apropiadamente sustituidos (Storm *et al* (1972) *J. Amer. Chem. Soc*. 94:5815) y amidas del ácido 2–aminofenilpropiónico (Amsberry, *et al* (1990) *J. Org. Chem*. 55:5867). La

eliminación de fármacos que contienen amina que son sustituidos en la glicina (Kingsbury *et al* (1984) *J. Med. Chem*. 27:1447) también es un ejemplo de los espaciadores auto–inmolativos útiles en los AAC.

INTERMEDIARIOS DE LIGADOR–ANTIBIÓTICO ÚTILES PARA LOS AAC

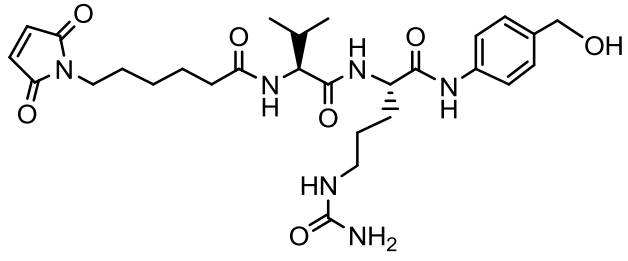
Los intermediarios de ligador–antibiótico (LA) de Fórmula II y Tabla 2 se prepararon por acoplamiento de un resto de antibiótico tipo rifamicina con un reactivo de péptido–ligador, como se ejemplifica en las Figuras 23–25 y los Ejemplos 1–17. Los reactivos ligadores se prepararon mediante los métodos descritos en WO 2012/113847; US 7659241; US 7498298; US 20090111756; US 2009/0018086; US 6214345; Dubowchik *et al* (2002) Bioconjugate Chem. 13(4):855–869, e incluyen:

4–nitrolfenilcarbonato de 4–((S)–2–((S)–2–(6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanamido)–3–metilbutanamido)–5–ureidopentanamido)bencilo **6**



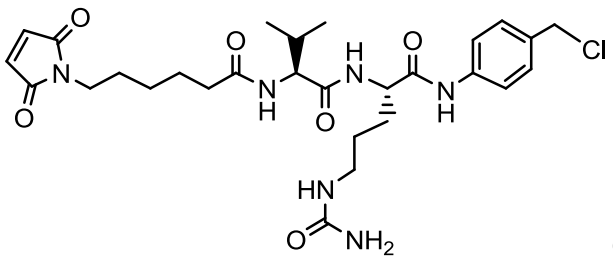
6

6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)–N–((S)–1–((S)–1–(4–(hidroximetil)fenilamino)–1–oxo–5–ureidopentan–2–ilamino)–3–metil–1–oxobutan–2–il)hexanamida **8**



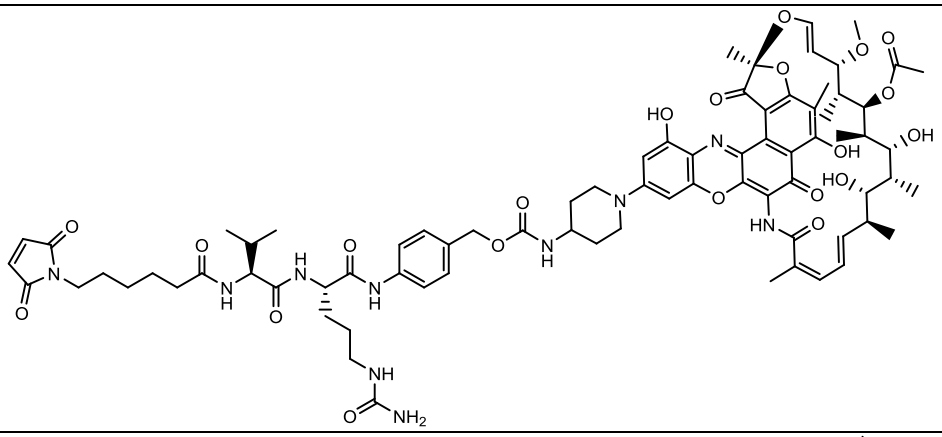
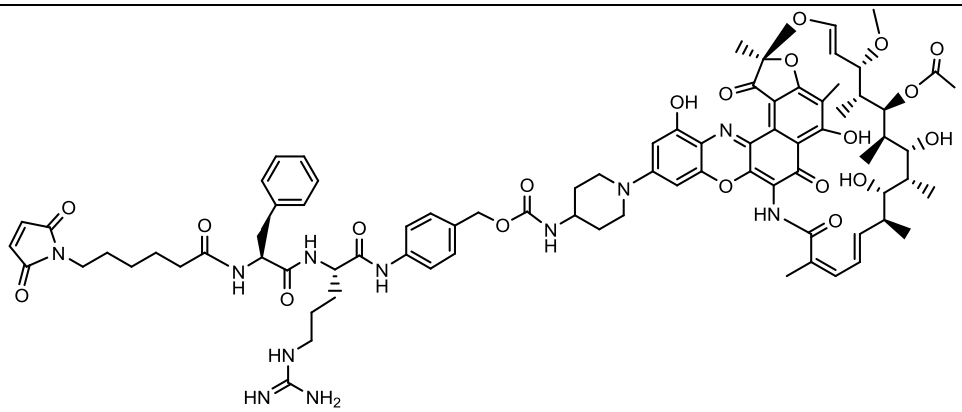
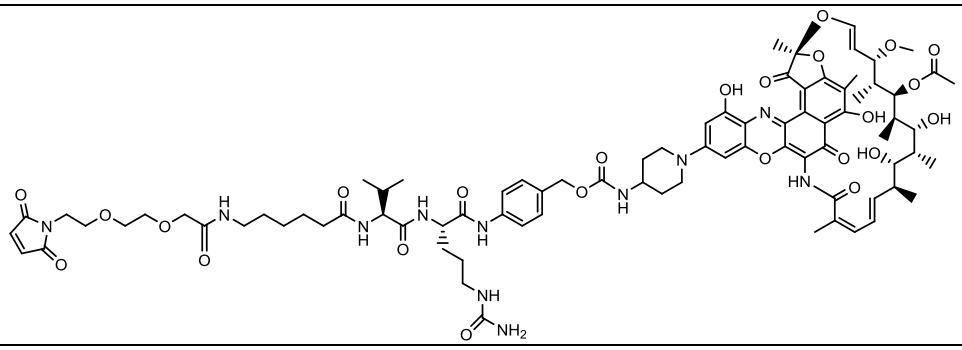
8

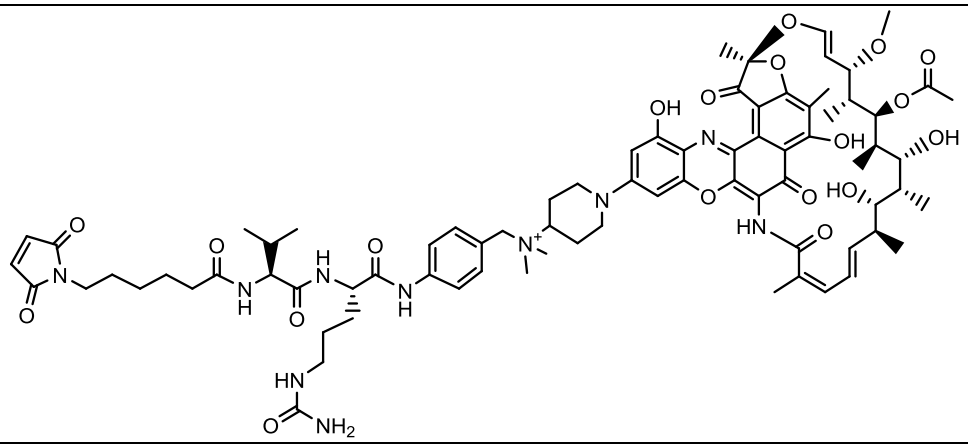
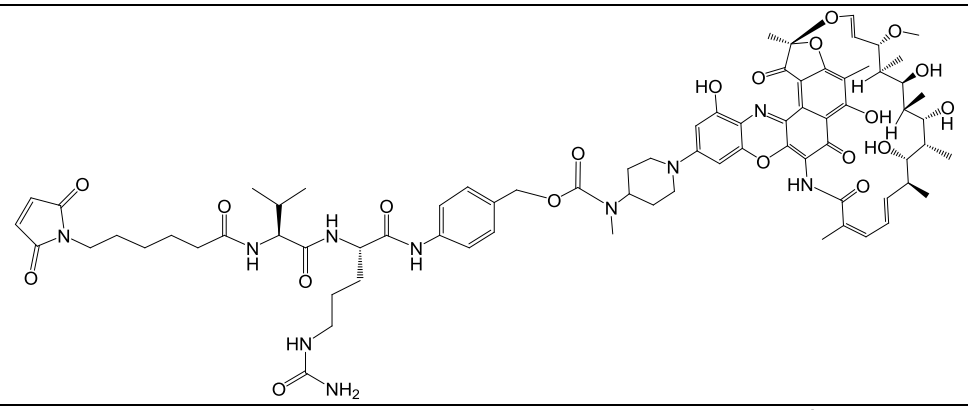
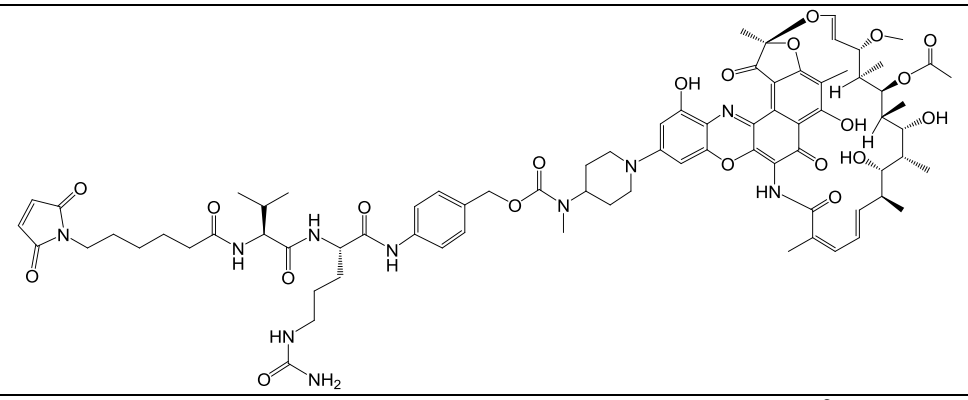
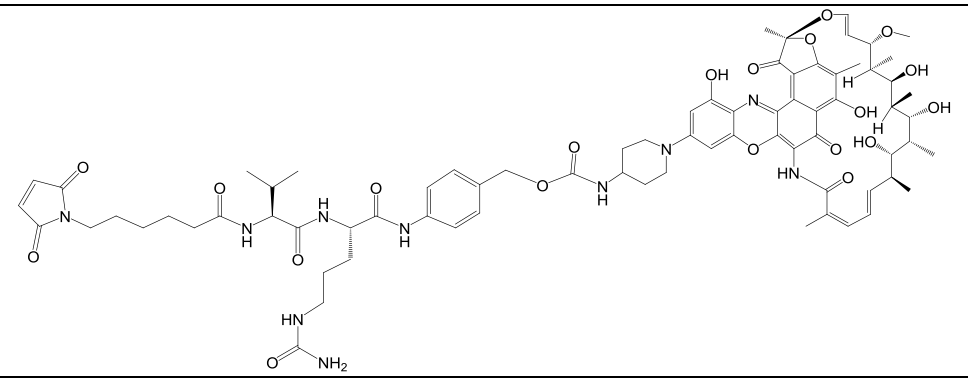
N–((S)–1–((S)–1–(4–(clorometil)fenilamino)–1–oxo–5–ureidopentan–2–ilamino)–3–metil–1–oxobutan–2–il)–6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanamida **9**

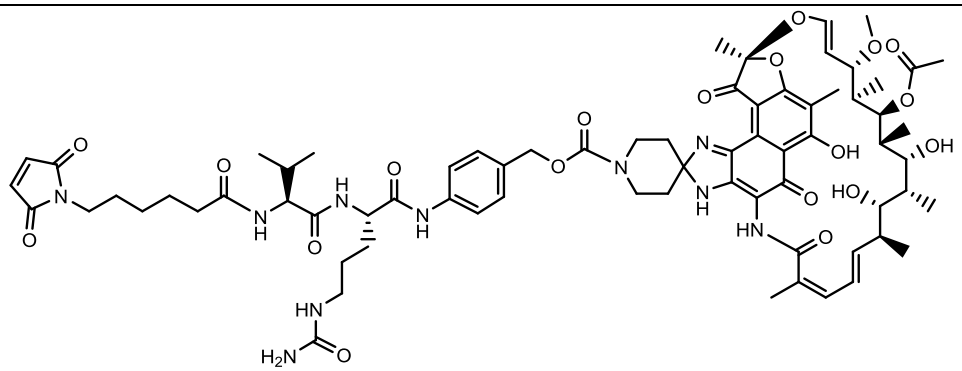
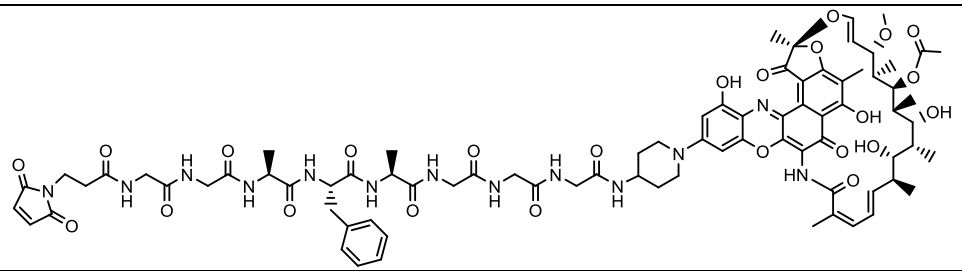
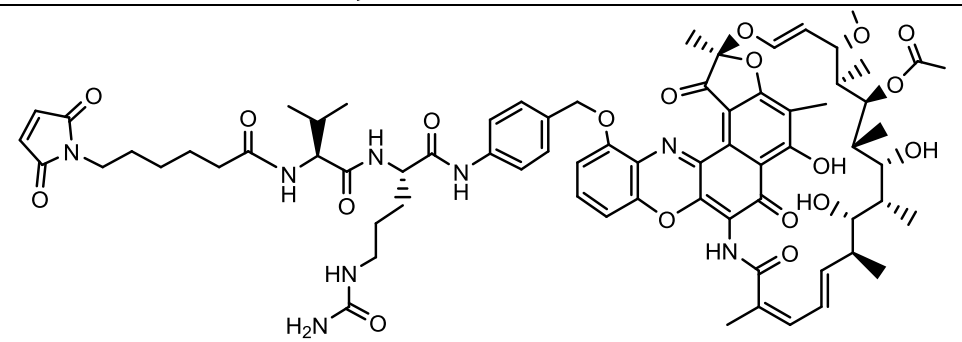
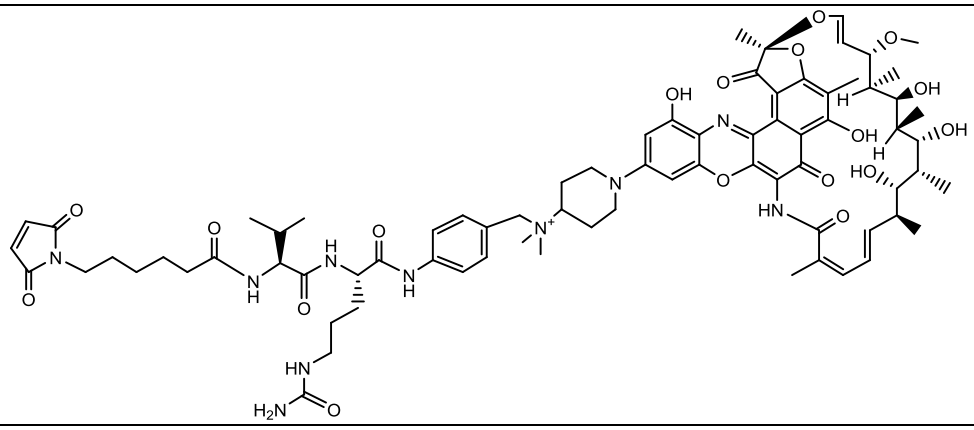


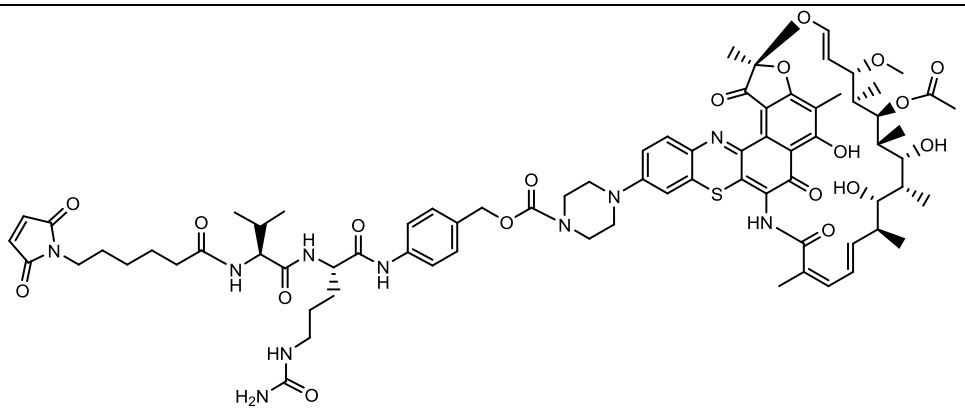
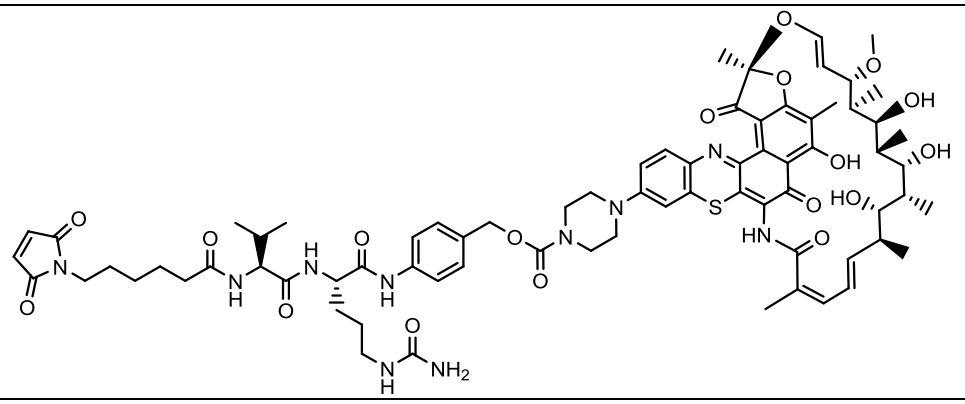
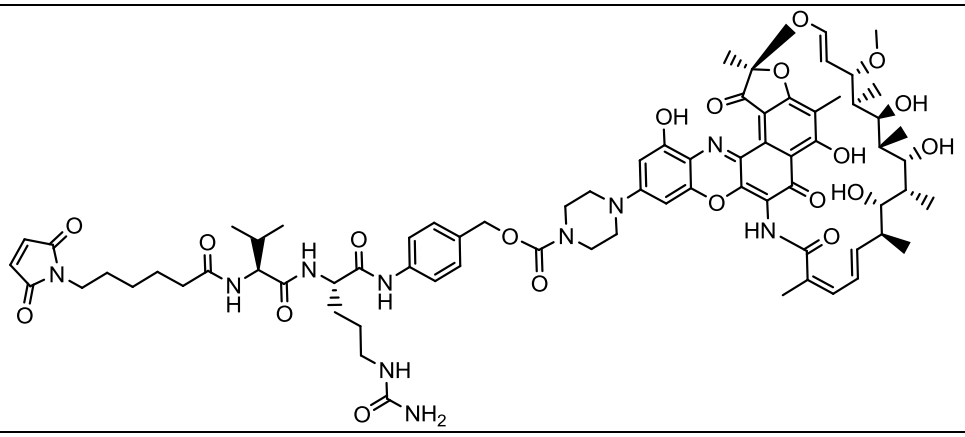
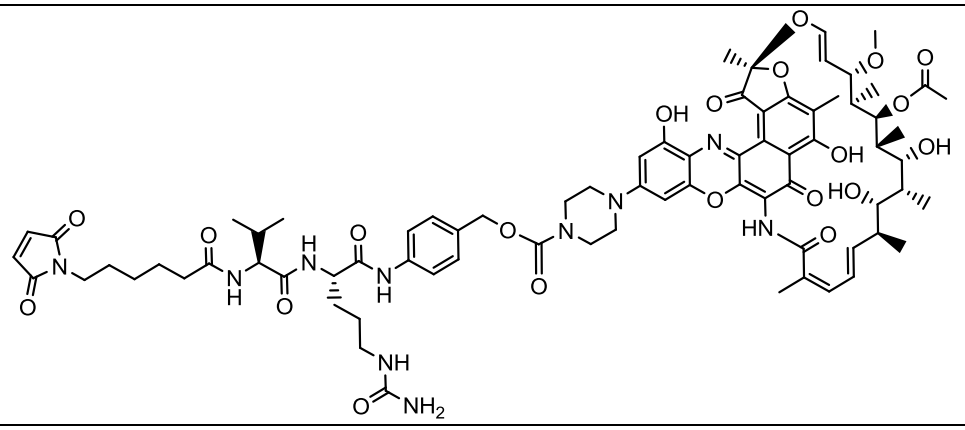
9

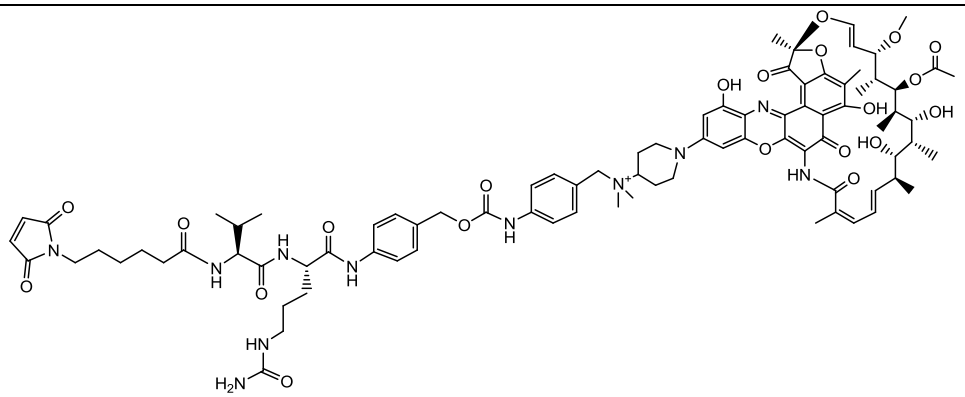
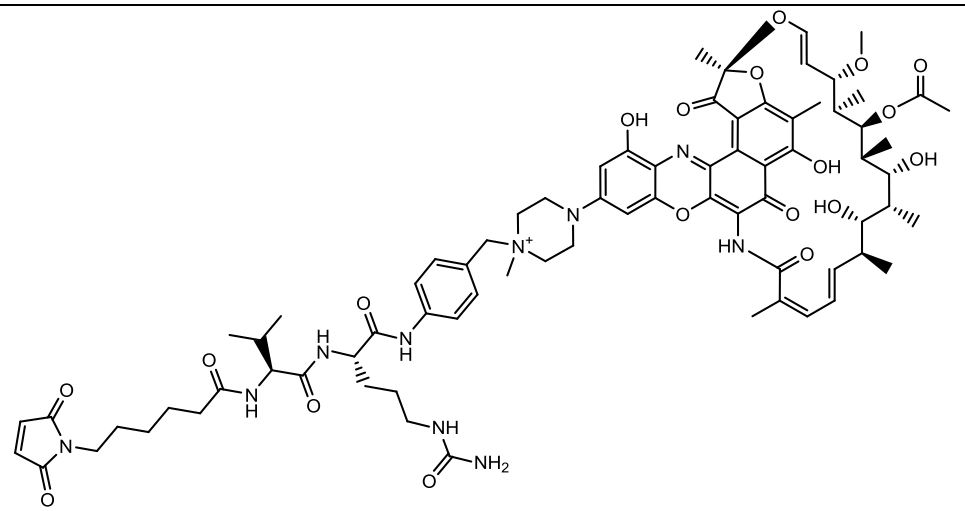
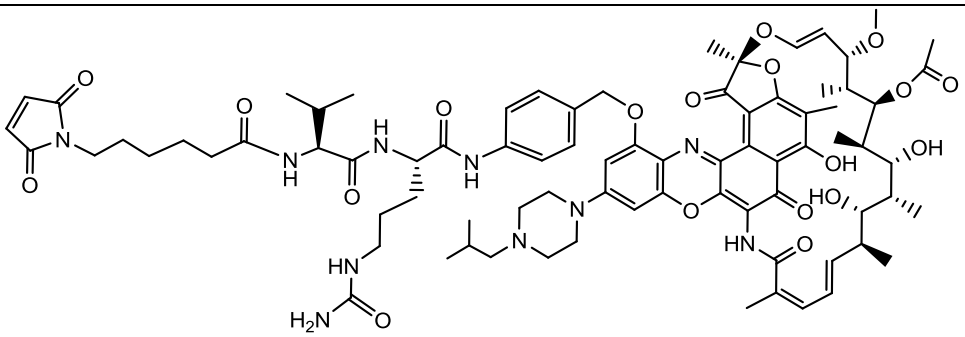
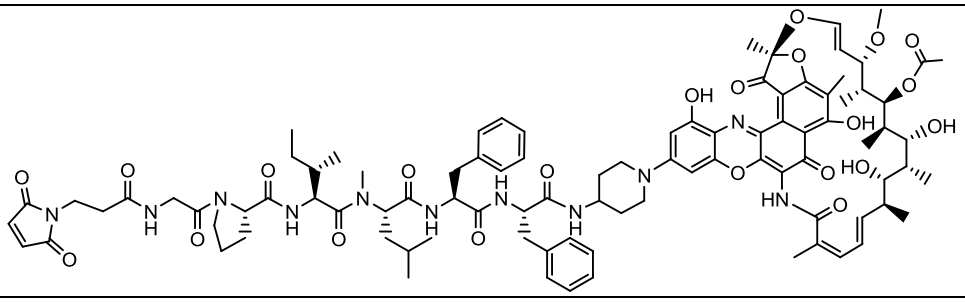
Tabla 2 Intermediarios de ligador–antibiótico (LA)

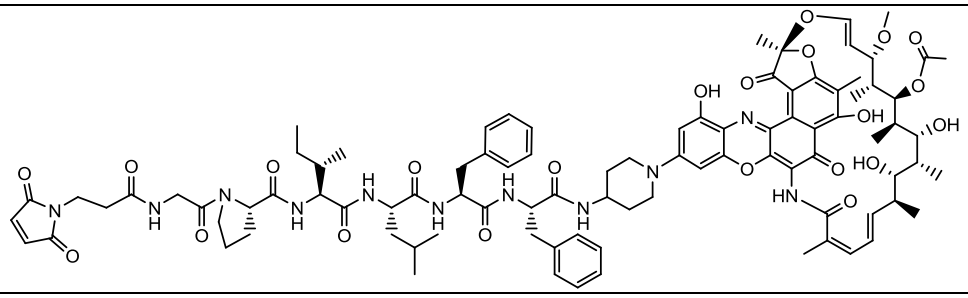
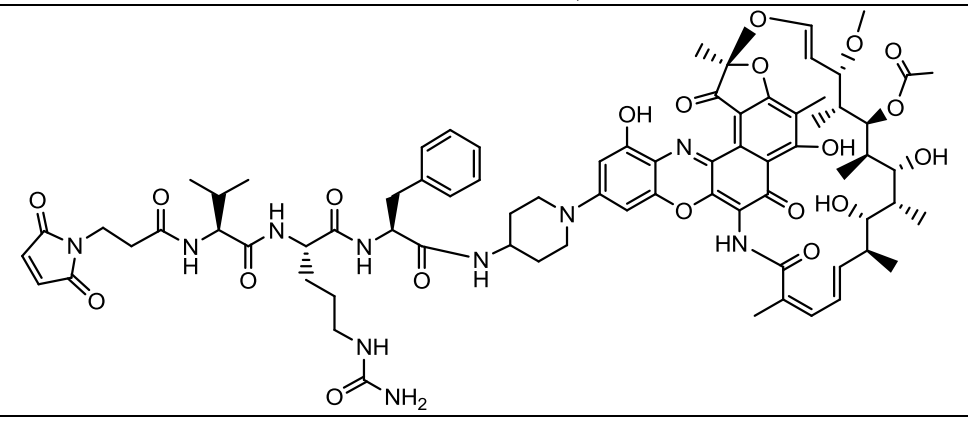
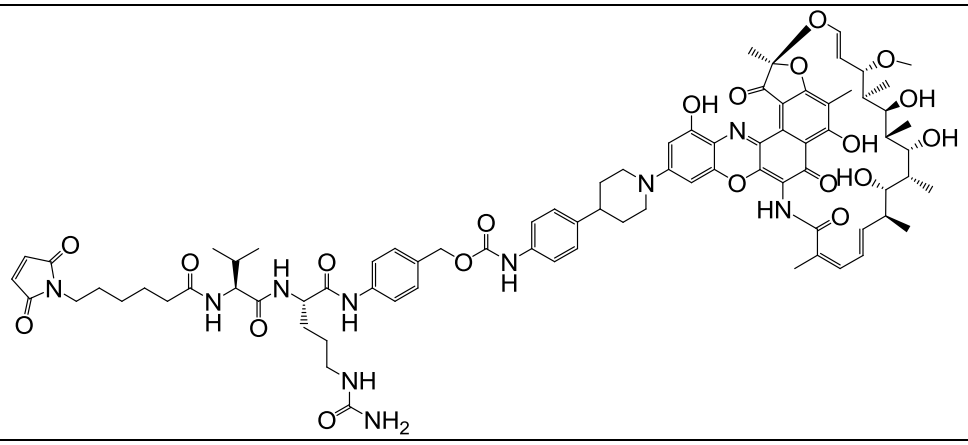
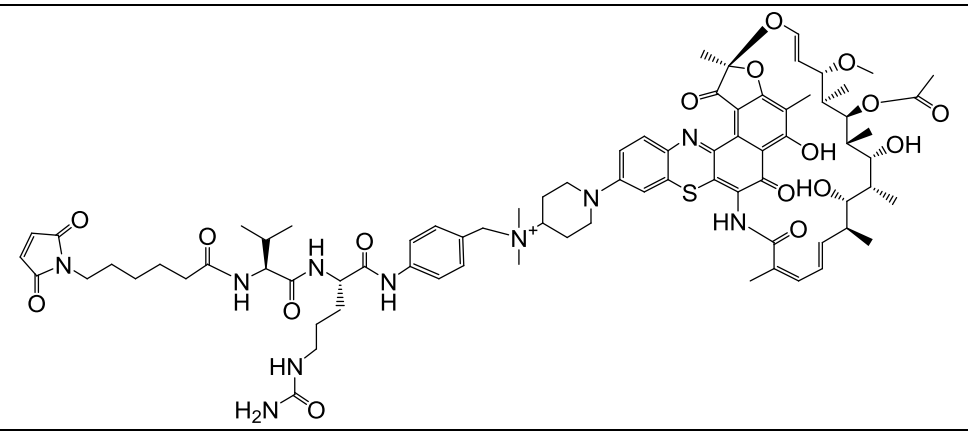
LA Nro.	Estructura
51	
	
	

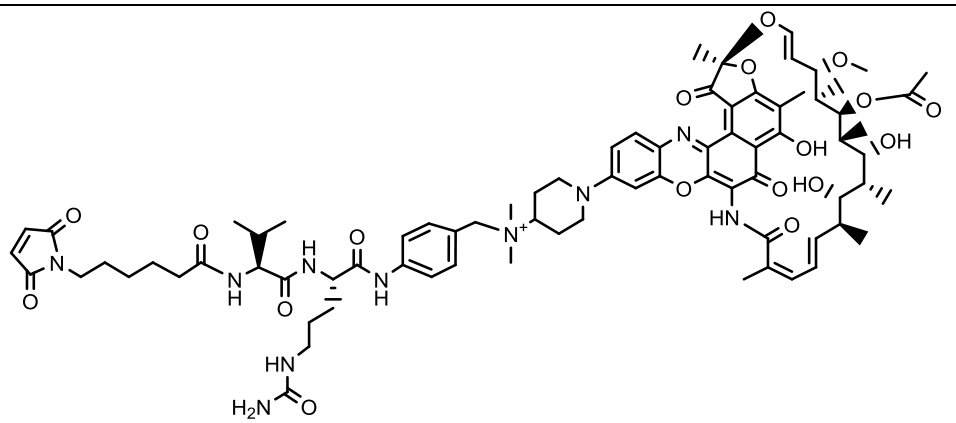
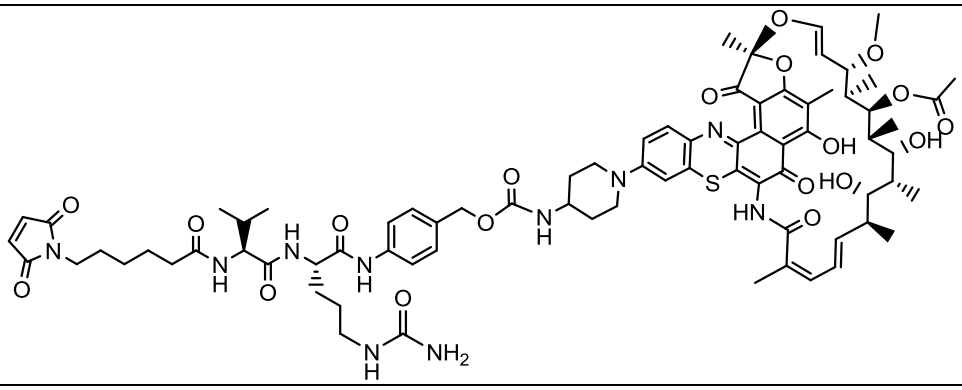
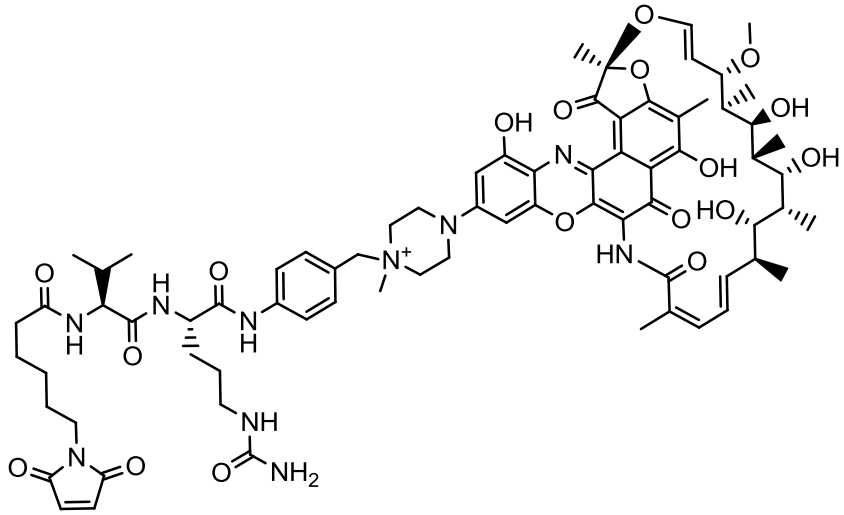
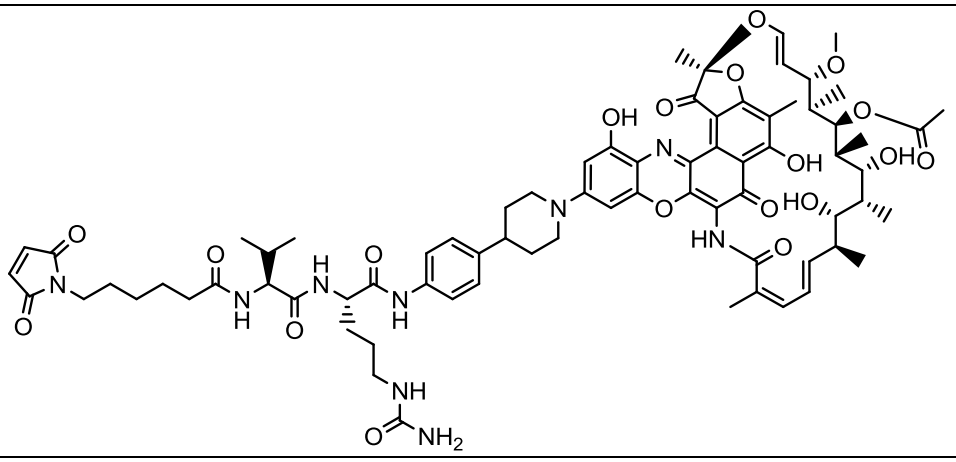
	
	
	
	

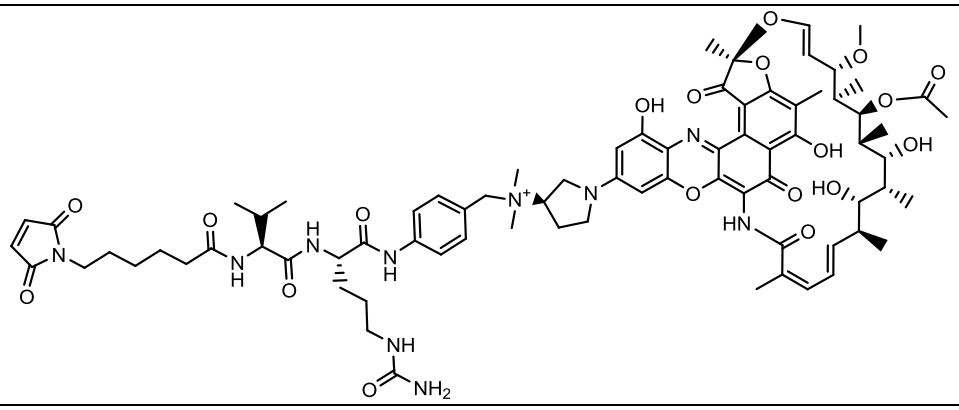
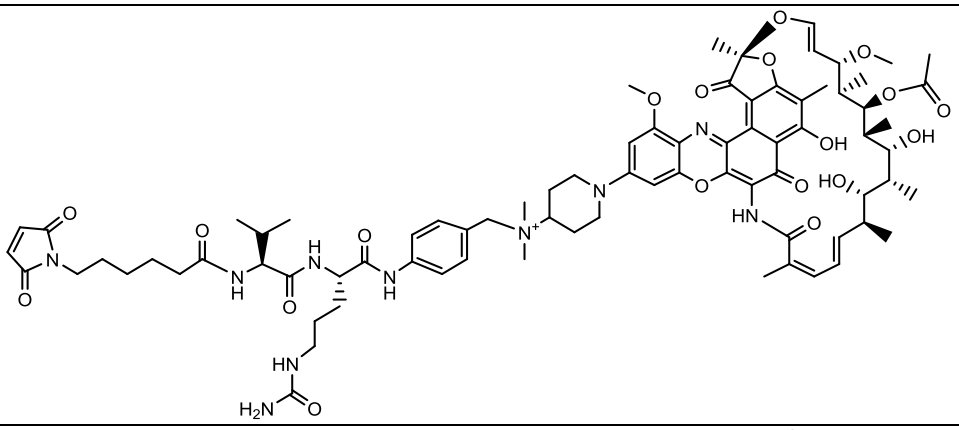
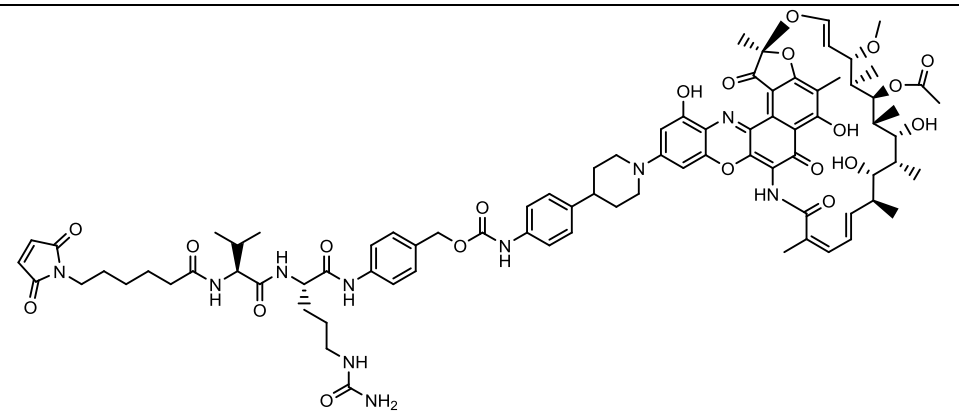
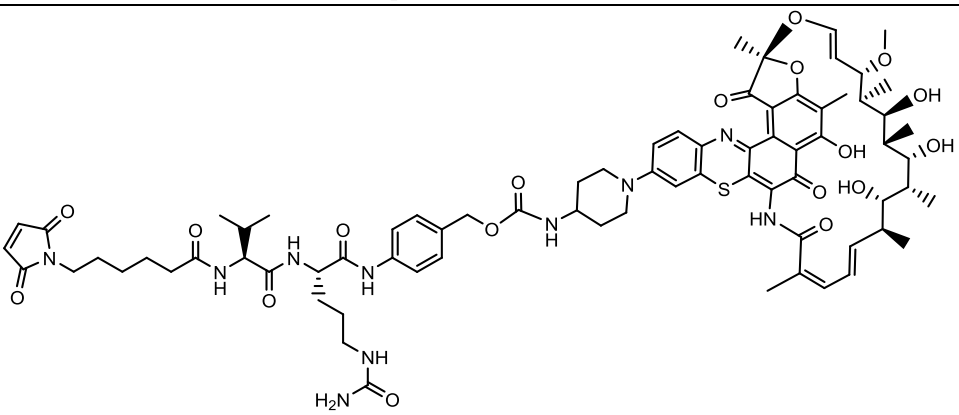
	
	
	
	

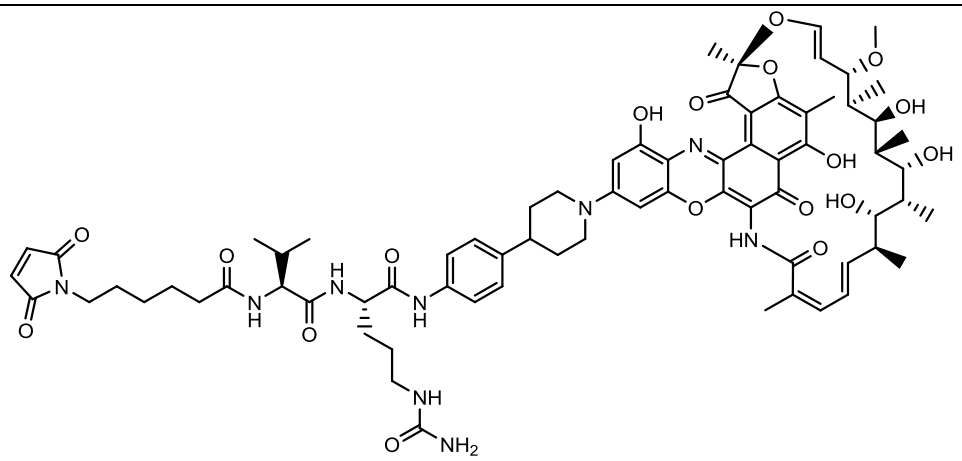
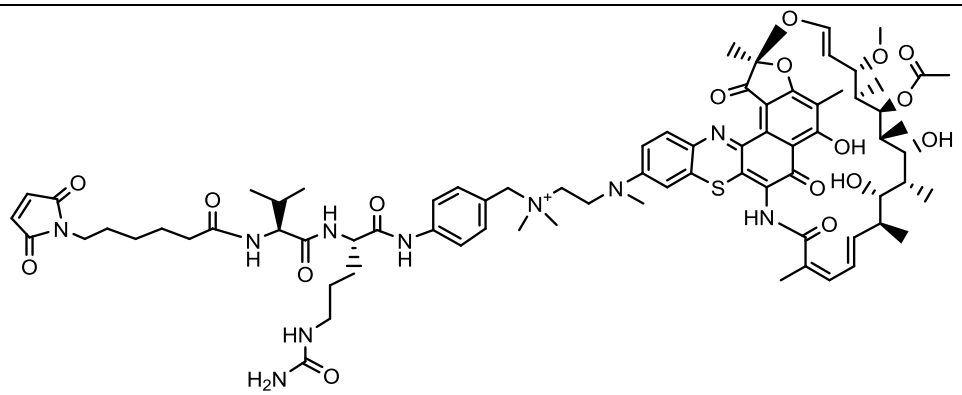
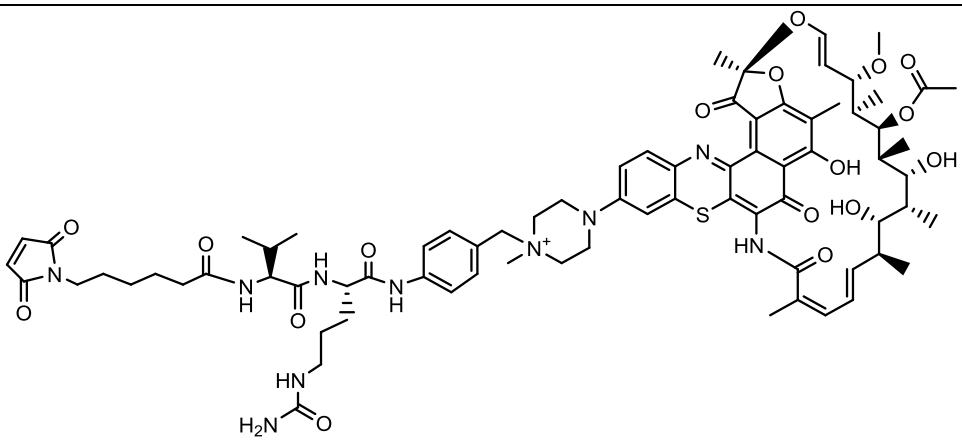
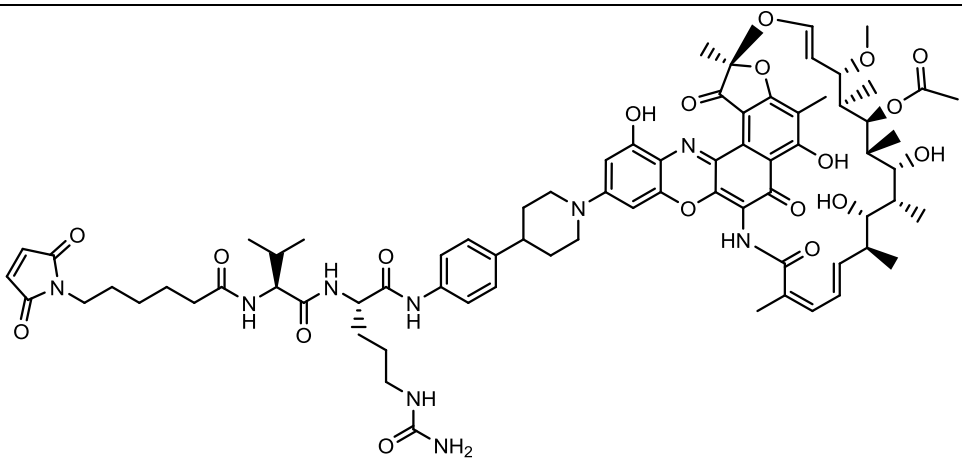
	
	
	
	

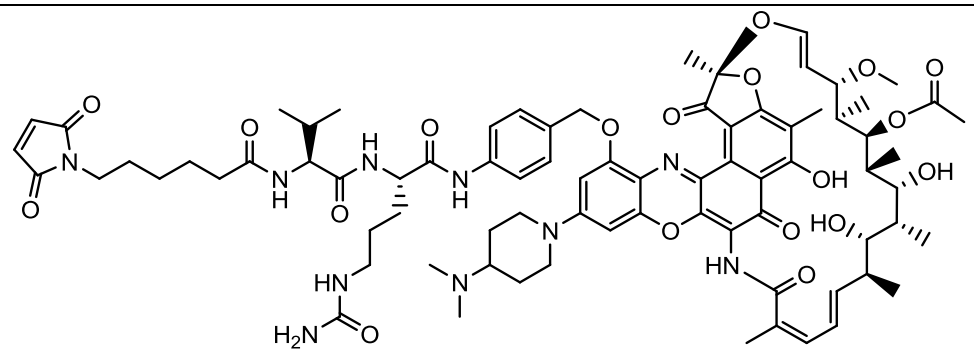
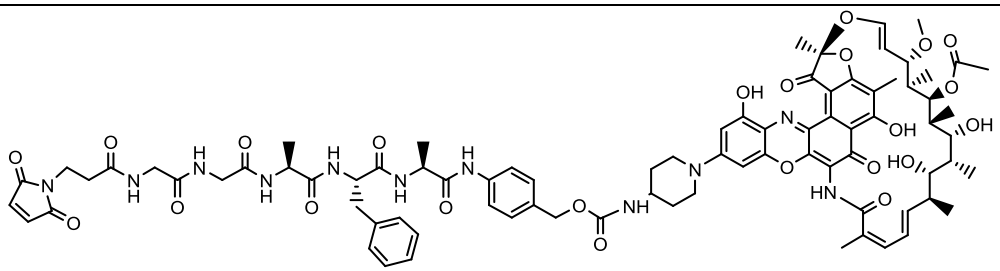
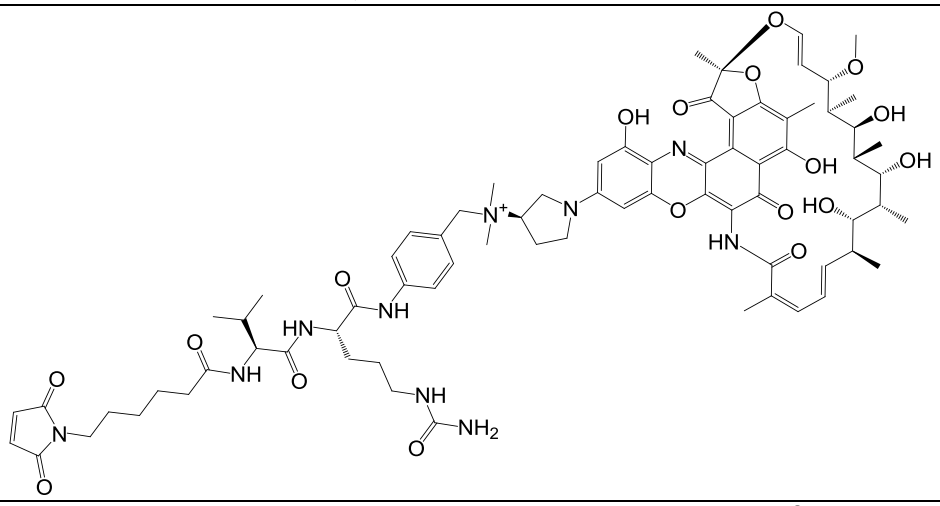
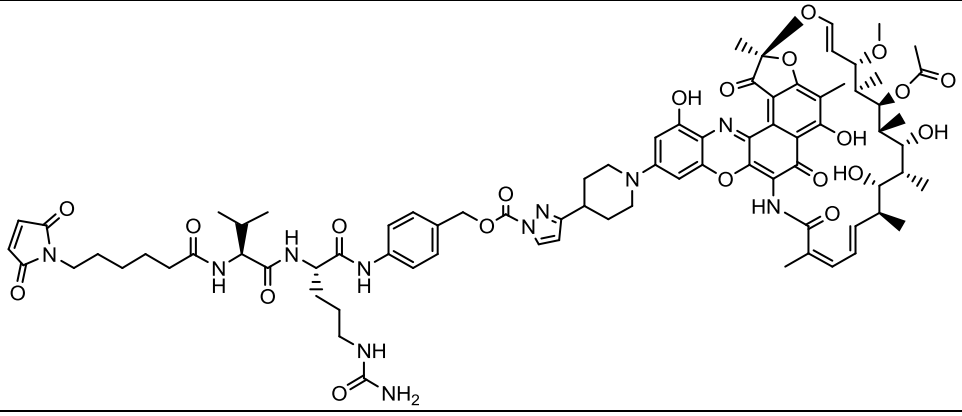
	
	
	
	

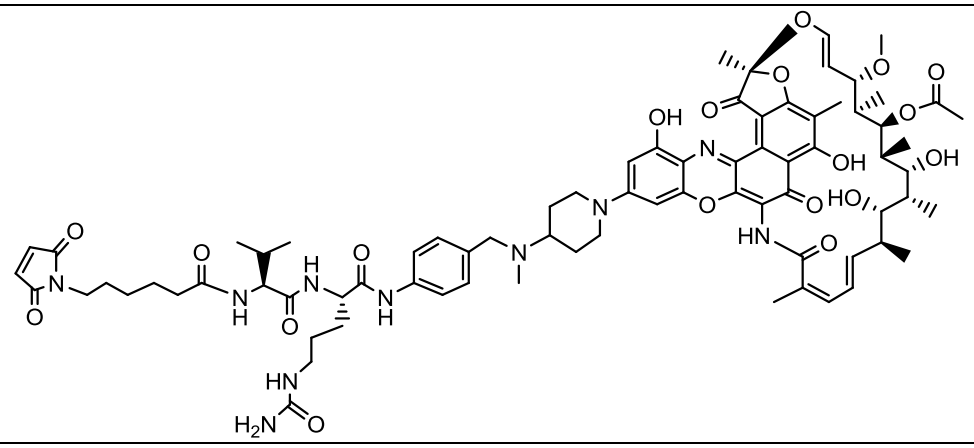
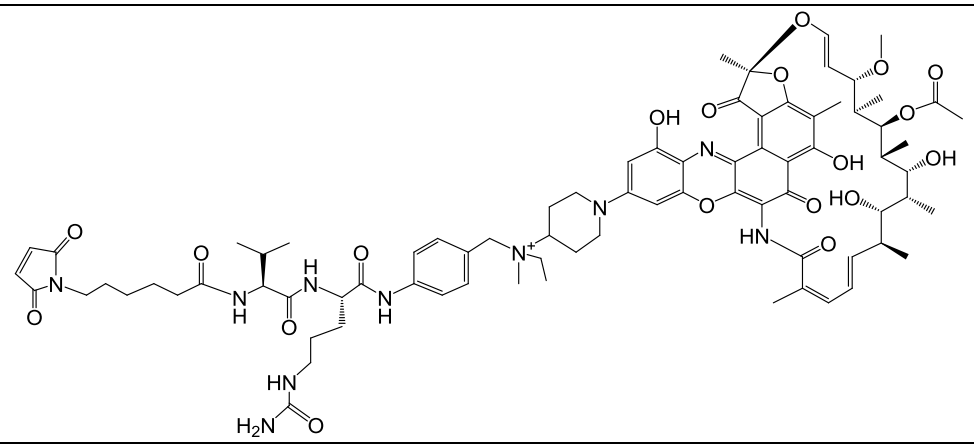
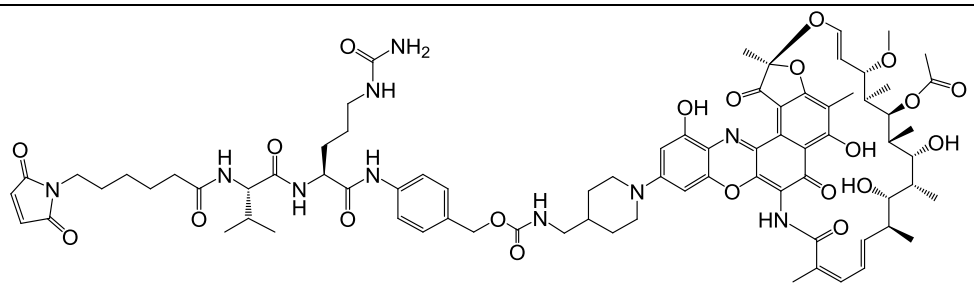
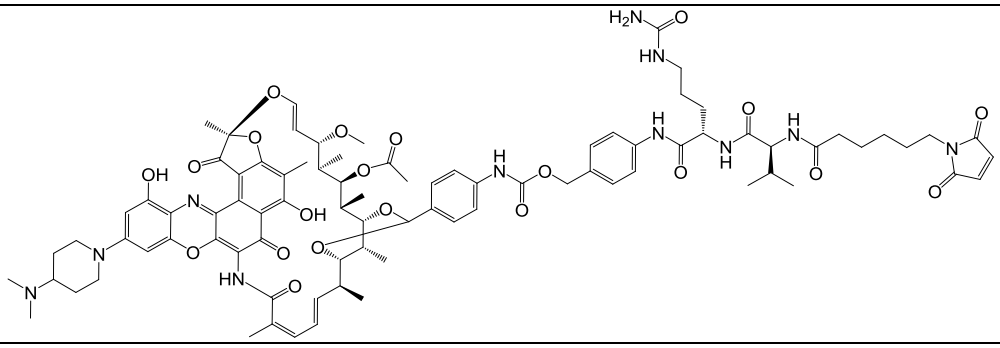
	
	
	
	

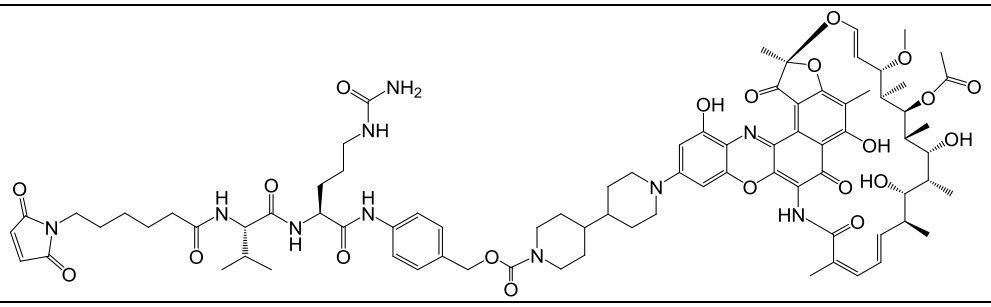
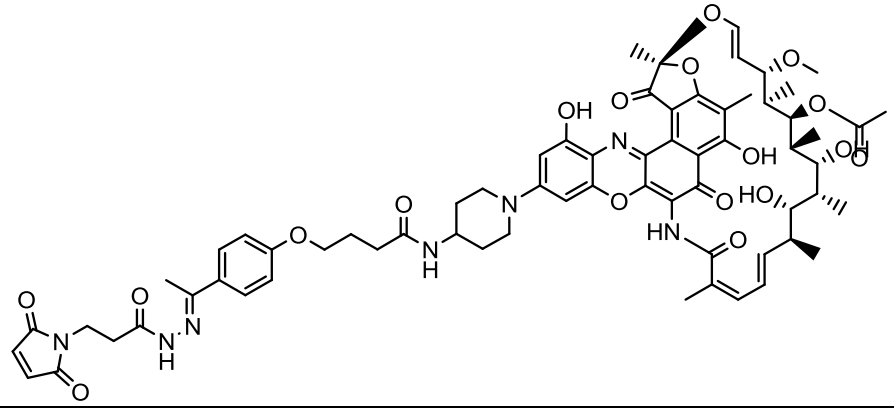
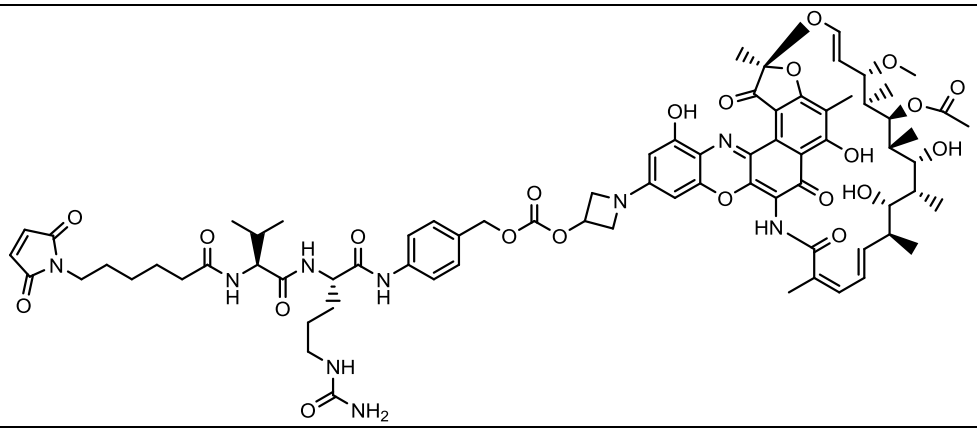
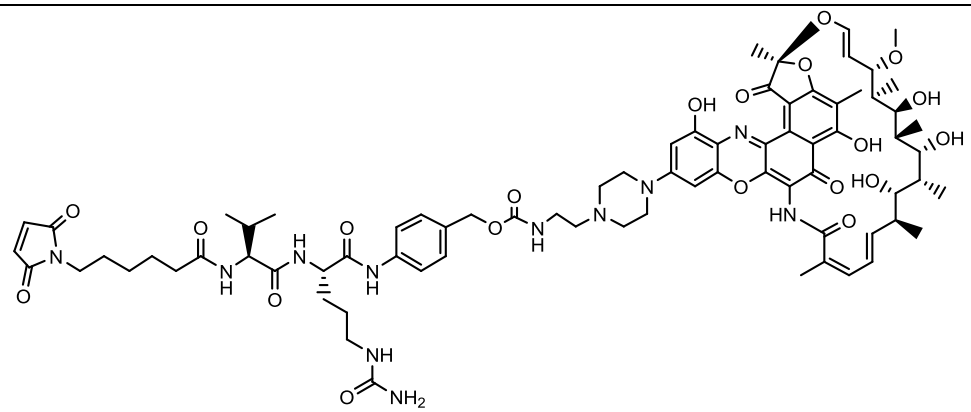
	
	
	
	

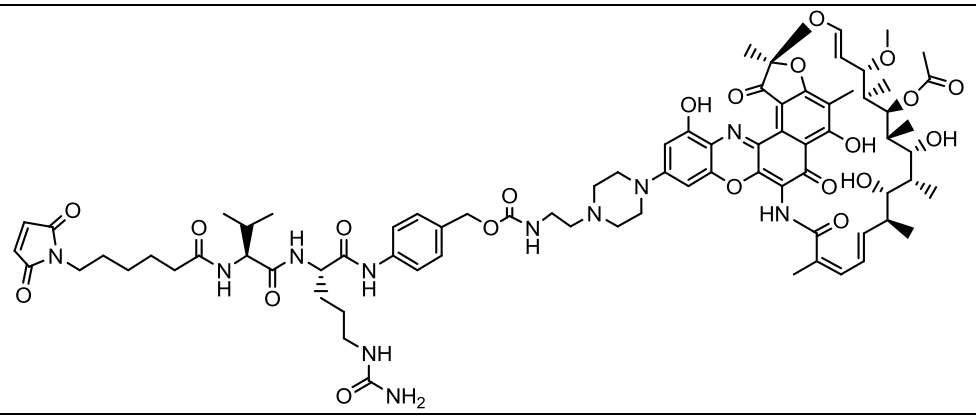
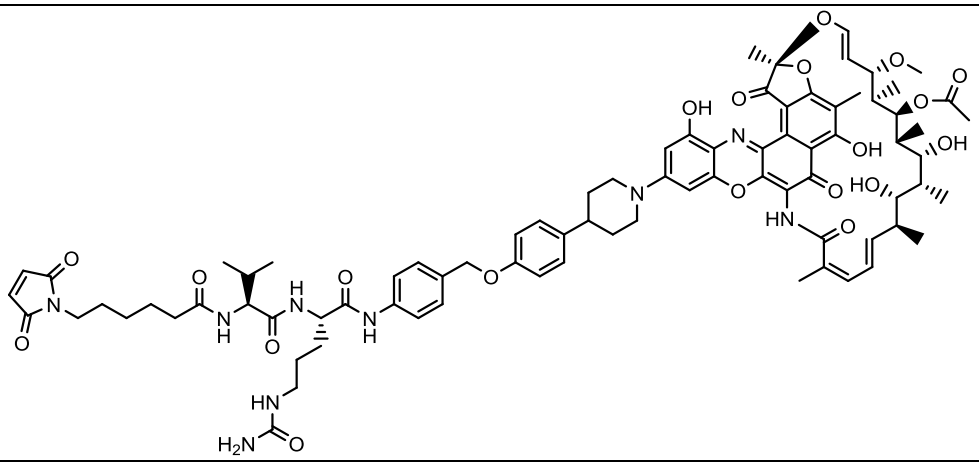
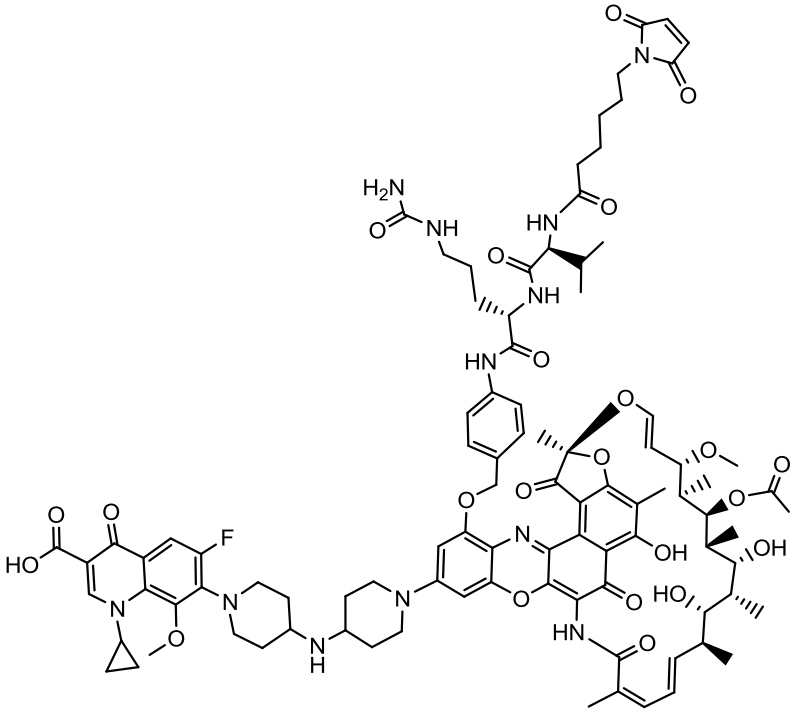
	
	
	
	

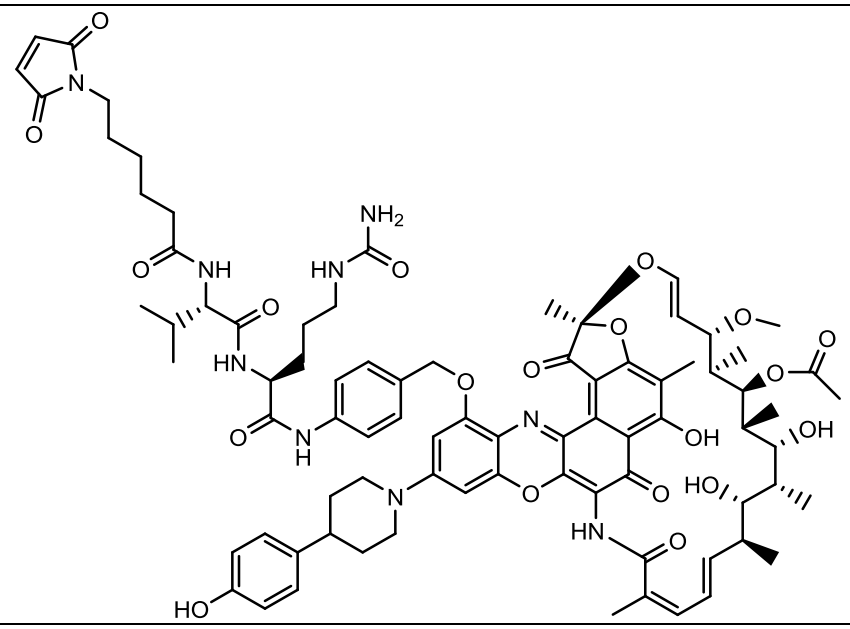
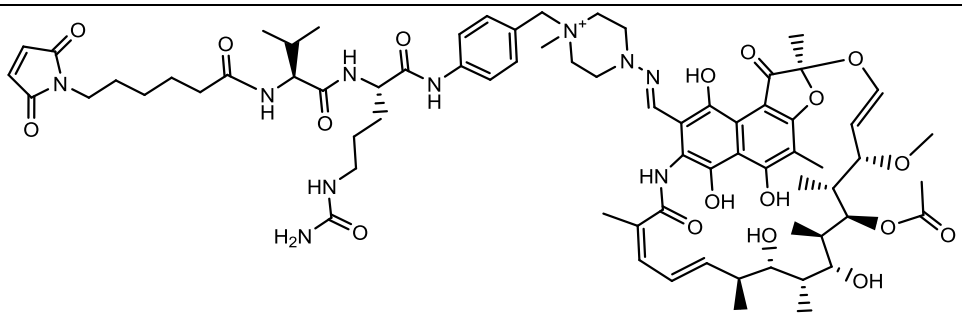
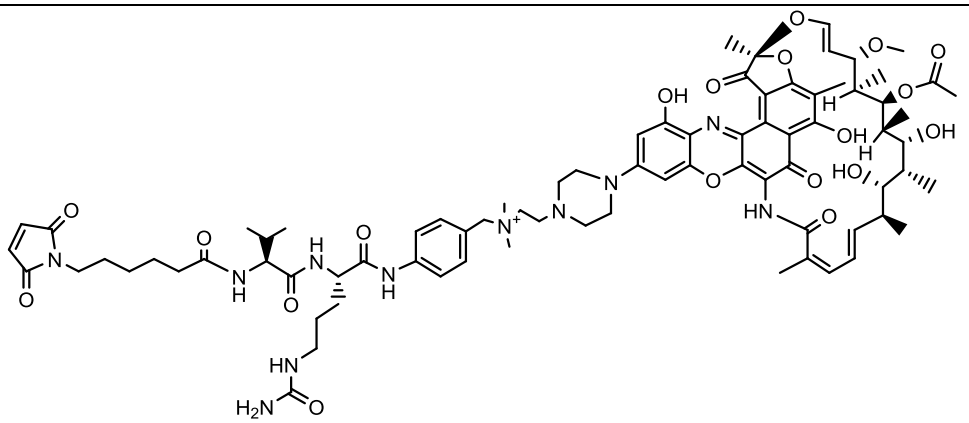
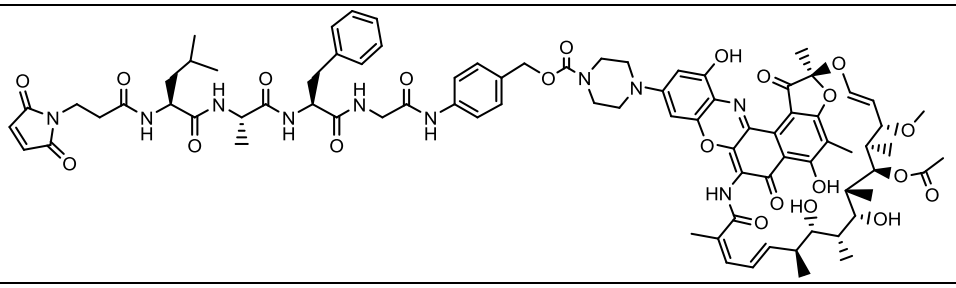
	
	
	
	

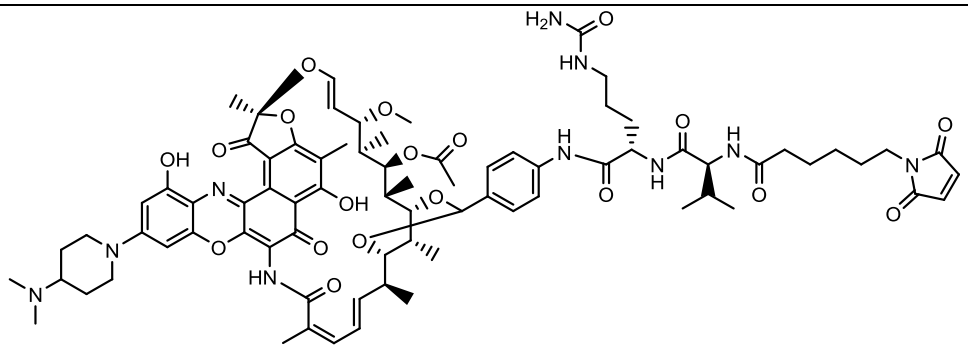
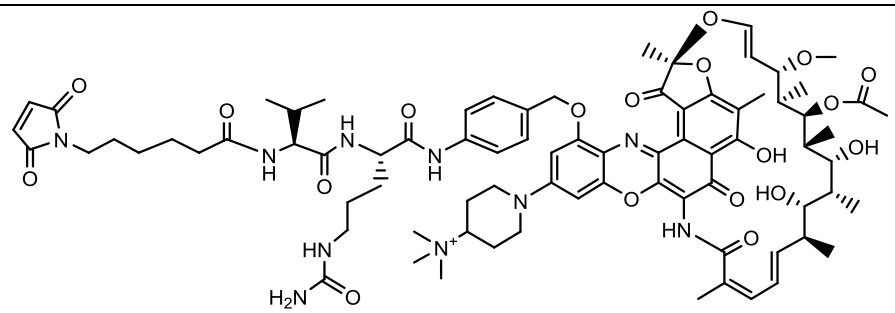
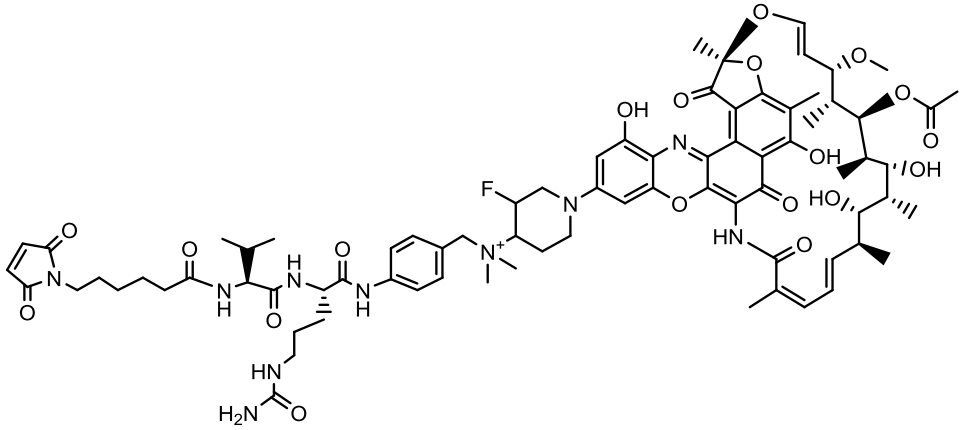
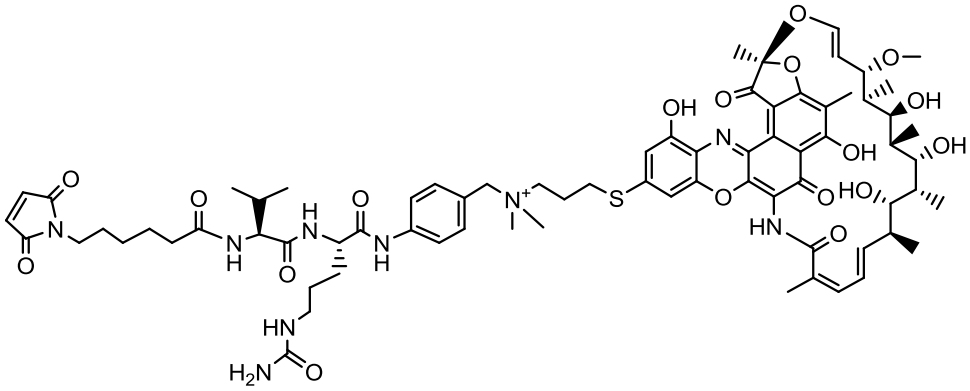
	
	
	
	

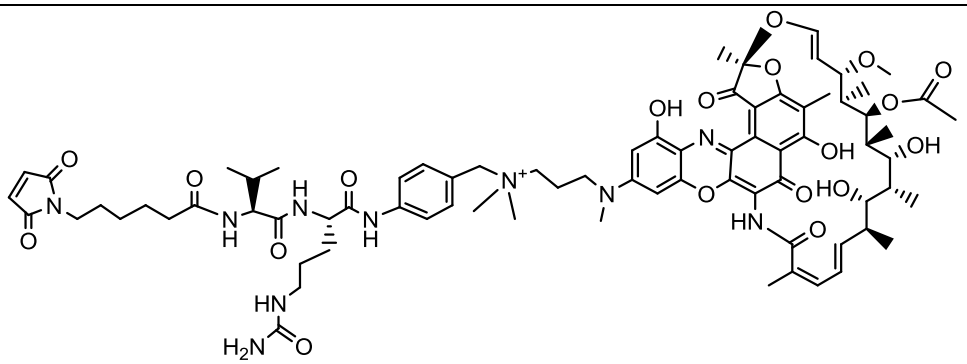
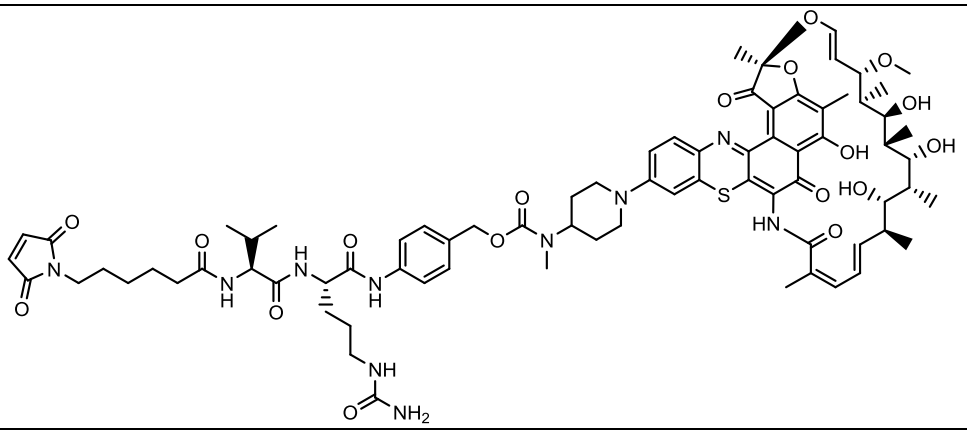
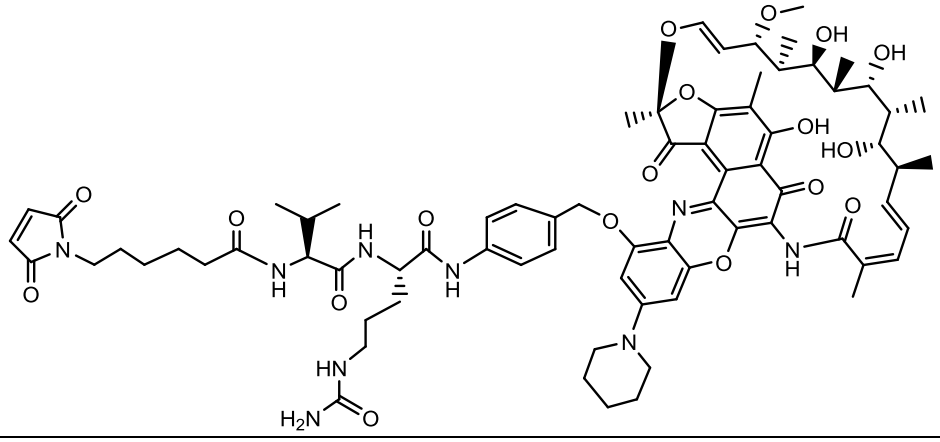
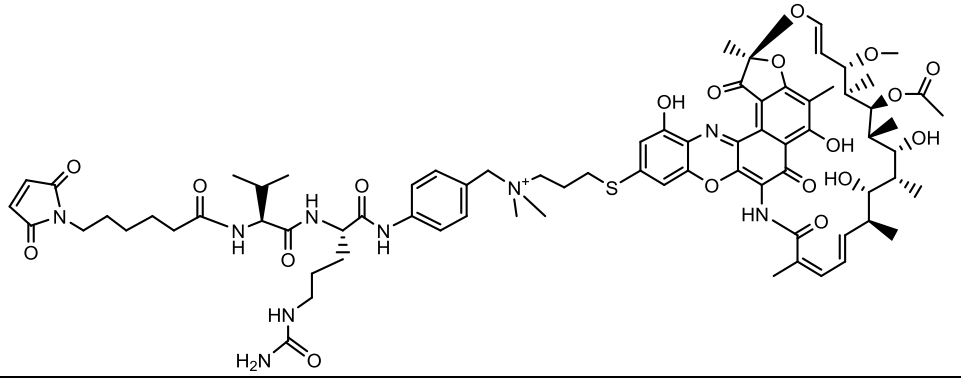
	
	
	
	

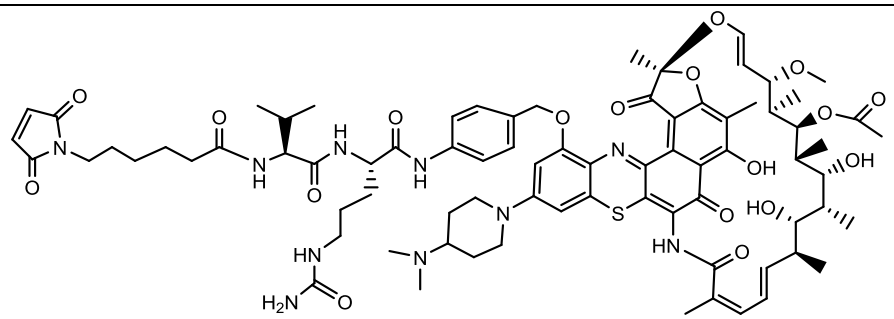
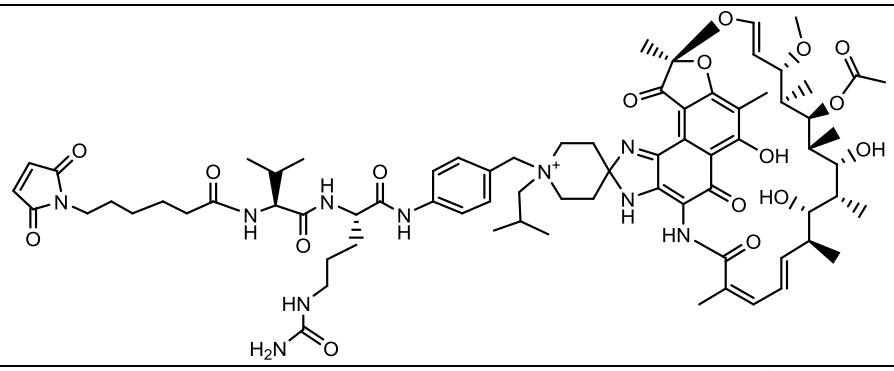
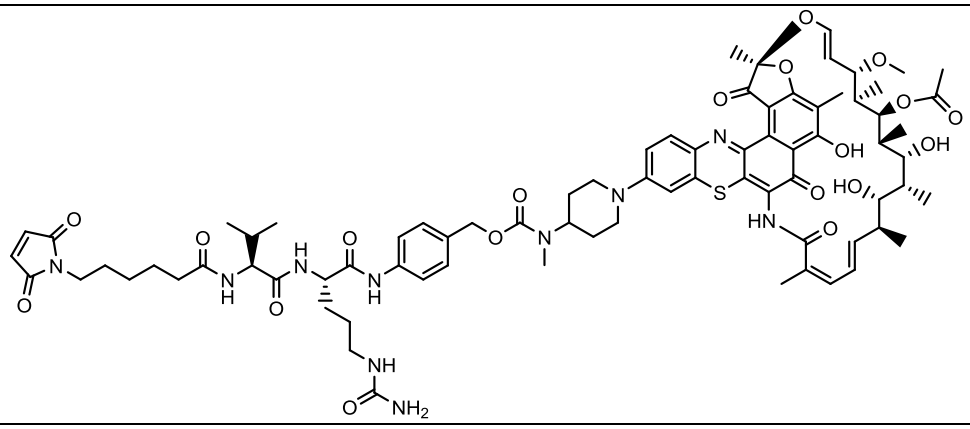
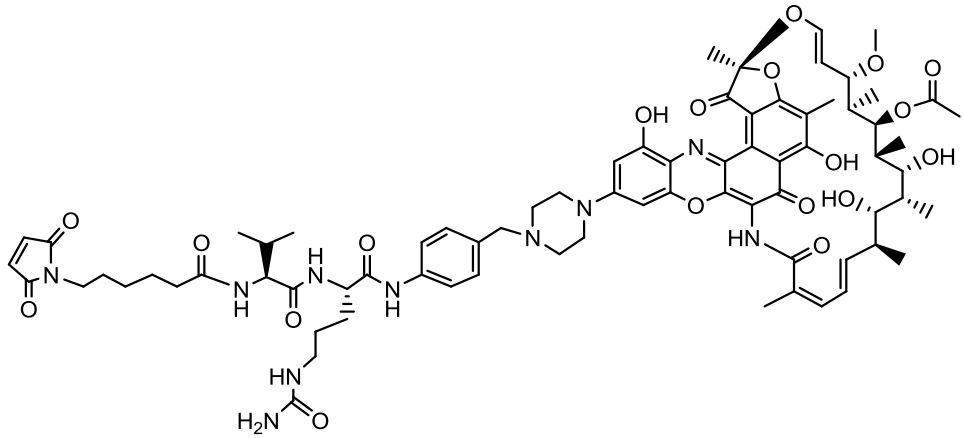
	
	
	
	

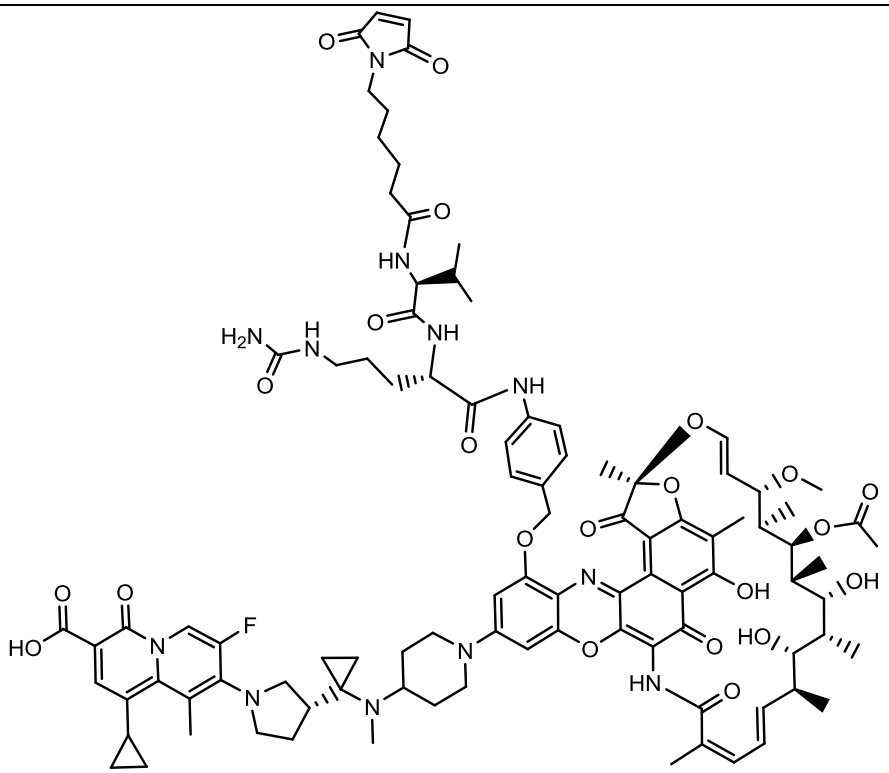
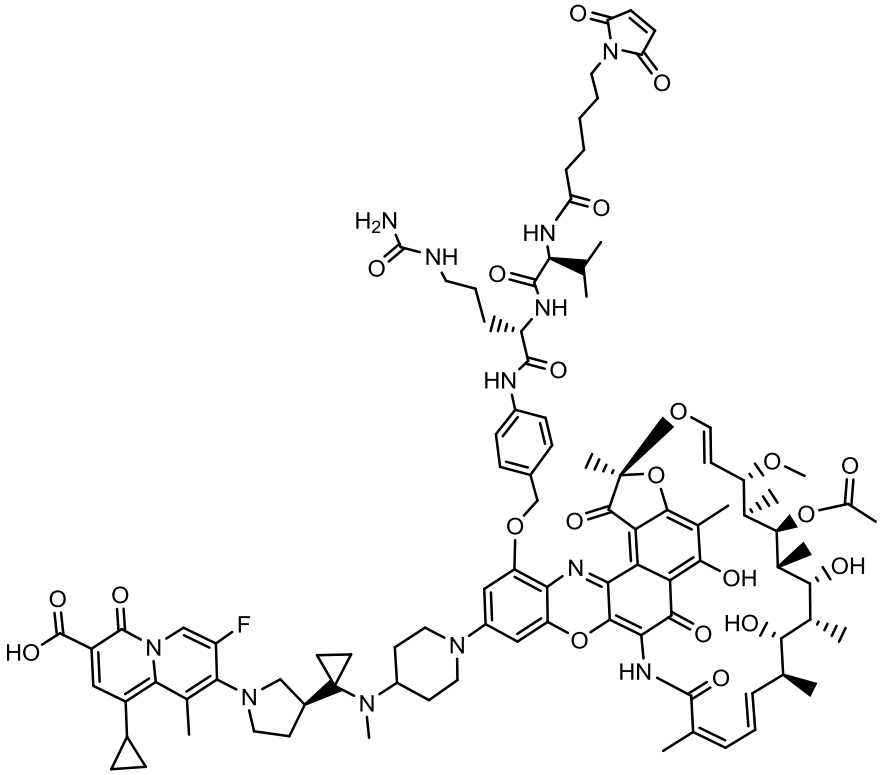
	
	
	

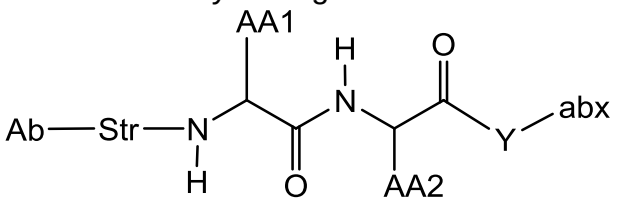
FORMAS DE REALIZACIÓN DE CONJUGADOS DE ANTICUERPO–ANTIBIÓTICO

El anticuerpo S4497 se unió a derivados de rifamicina de la Tabla 3 denominados pipBOR y a otros a través de un ligador peptídico escindible de proteasa. El ligador está diseñado para ser escindido por proteasas lisosomales, incluidas catepsinas B, D y otras, que reconocen las unidades peptídicas, incluido el dipéptido de valina–citrulina (val–cit, vc) (Dubowchik *et al* (2002) Bioconj. Chem. 13:855–869). La generación del intermediario de ligador–antibiótico consistente en el antibiótico y el ligador MC–vc–PAB y otros, se describe en detalle en los Ejemplos 1–17. El ligador está diseñado de modo tal que la escisión del enlace amida en el resto PAB separe el anticuerpo del antibiótico en estado activo.

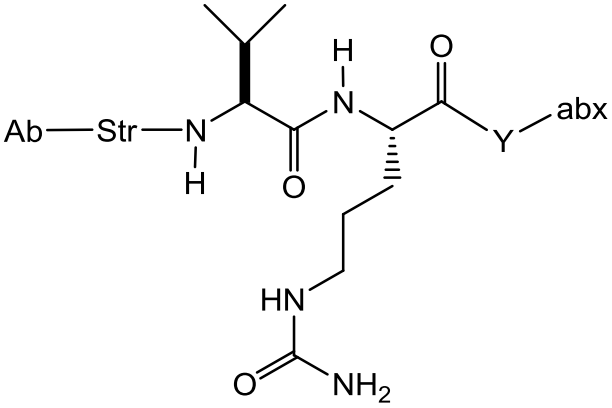
El AAC denominado S4497–dimetil–pipBOR es idéntico al AAC S4497–pipBOR, excepto por el amino dimetilado en el antibiótico y el grupo oxicarbonilo en el ligador.

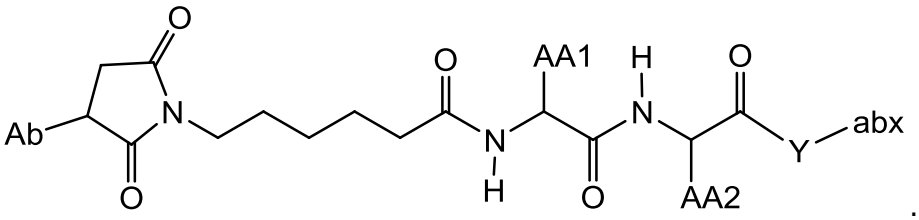
La Figura 5 muestra un posible mecanismo de activación del fármaco para conjugados de anticuerpo–antibiótico (AAC). El antibiótico activo (Ab) sólo se libera luego de la internalización del AAC dentro de células de mamífero. La porcion Fab del anticuerpo en el AAC se une con *S. aureus,* mientras que la porción Fc del AAC mejora la captación de las bacterias por la unión mediada por el receptor de Fc con células fagocíticas, incluidos neutrófilos y macrófagos. Luego de la internalización en el fagolisosoma, el ligador de Val–Cit es escindido por proteasas lisosomales, que liberan el antibiótico activo dentro del fagolisosoma.

Una forma de realización de los compuestos conjugados de anticuerpo–antibiótico (AAC) de la invención incluye la siguiente:

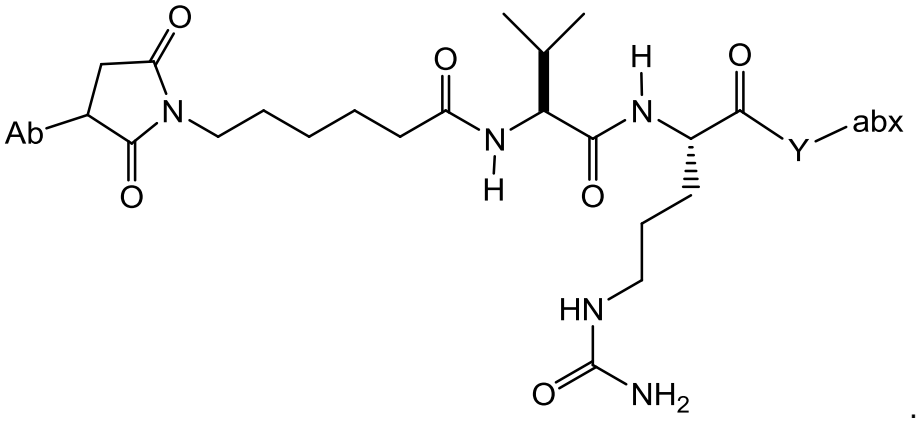


donde AA1 y AA2 se seleccionan independientemente de una cadena lateral de aminoácidos, que incluye las fórmulas:

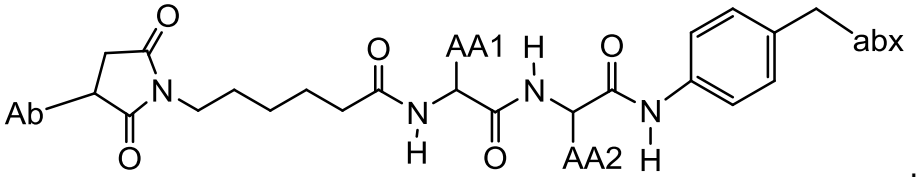




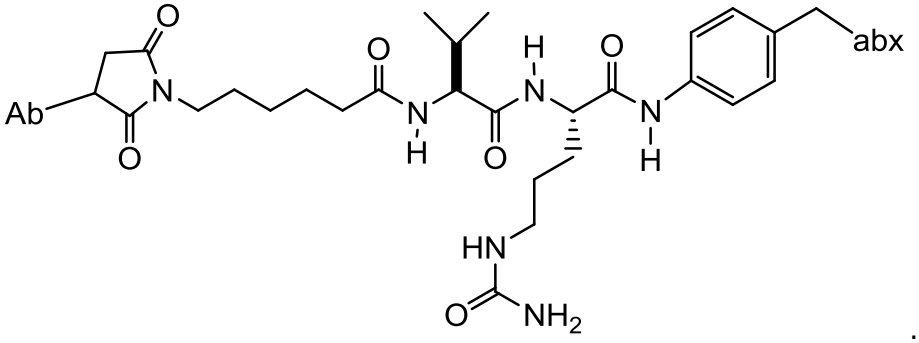
.



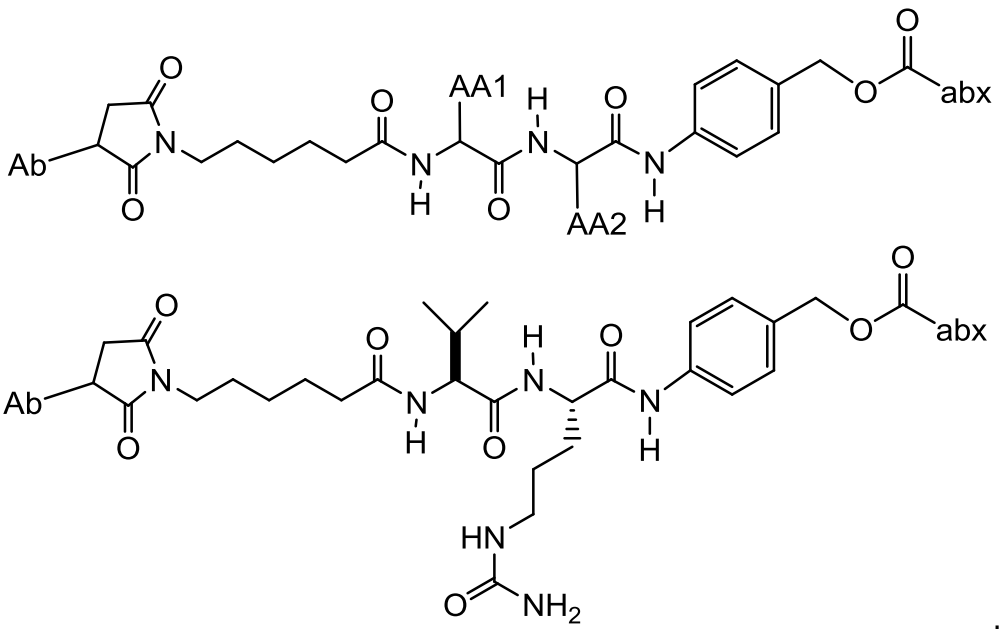
.



.

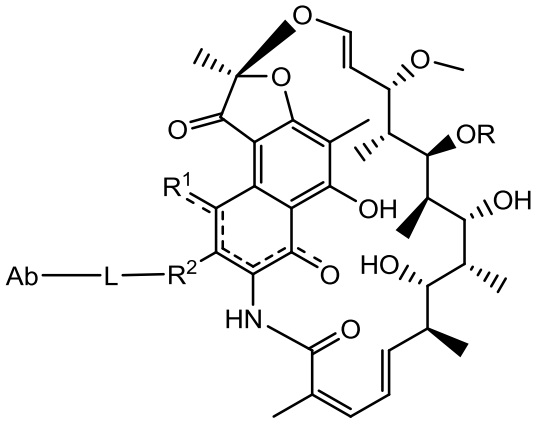


.



.

Una forma de realización de los compuestos conjugados de anticuerpo–antibiótico de la invención incluye la siguiente:



I

en donde:

las líneas punteadas indican un enlace opcional;

R es H, alquiloC_1–C_{12} o $C(O)CH_3$;

R^1 es OH;

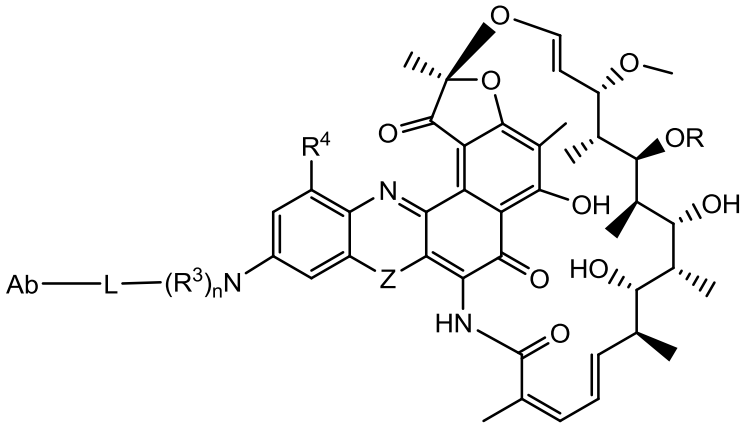
R^2 es CH=N–(heterociclilo), en donde el heterociclilo está opcionalmente sustituido con uno o varios grupos seleccionados independientemente de $C(O)CH_3$, alquiloC_1–C_{12}, heteroariloC_1–C_{12}, heterocicliloC_2–C_{20}, ariloC_6–C_{20} y carbocicliloC_3–C_{12};

o R^1 y R^2 forman un heteroarilo o heterociclilo fusionado de 5 ó 6 miembros, y formando opcionalmente un anillo heteroarilo, heterociclilo, arilo o carbociclilo spiro o fusionado de 6 miembros, en donde el anillo heteroarilo, heterociclilo, arilo o carbociclilo spiro o fusionado de 6 miembros está opcionalmente sustituido con H, F, Cl, Br, I, alquiloC_1–C_{12} o OH;

L es el ligador peptídico unido a R^2 o el heteroarilo o heterociclilo fusionado formado por R^1 y R^2; y

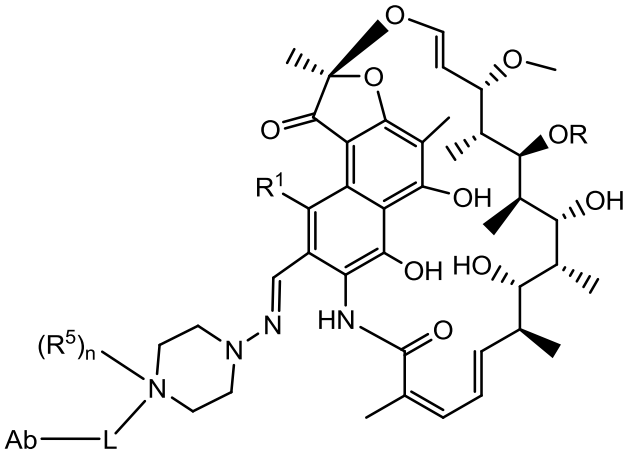
Ab es el anticuerpo anti–ácido teicoico de pared (WTA).

Una forma de realización de los compuestos conjugados de anticuerpo–antibiótico de la invención incluye la siguiente:



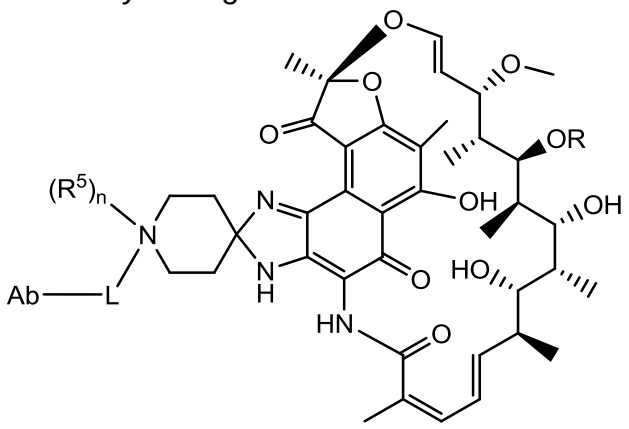
en donde R^3 se selecciona independientemente de H y alquiloC_1–C_{12}; n es 1 ó 2; R^4 se selecciona de H, F, Cl, Br, I, alquiloC_1–C_{12} y OH; y Z se selecciona de NH, N(alquiloC_1–C_{12}), O y S.

Una forma de realización de los compuestos conjugados de anticuerpo–antibiótico de la invención incluye el siguiente resto de antibiótico tipo rifampina:



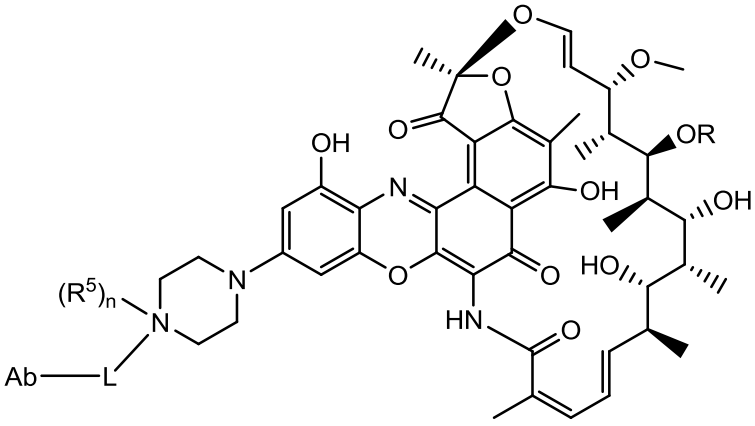
en donde R^5 se selecciona de H y alquiloC_1–C_{12}; y n es 0 ó 1.

Una forma de realización de los compuestos conjugados de anticuerpo–antibiótico de la invención incluye el siguiente resto de antibiótico tipo rifabutina:



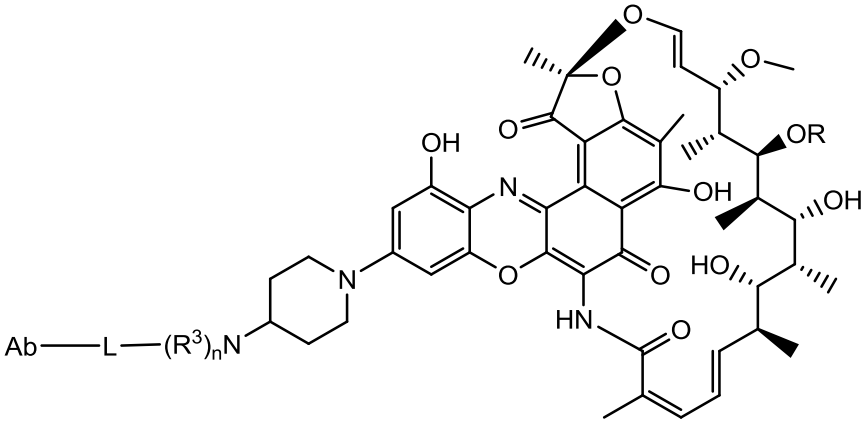
en donde R^5 se selecciona de H y alquiloC_1–C_{12}; y n es 0 ó 1.

Una forma de realización de los compuestos conjugados de anticuerpo–antibiótico de la invención incluye el siguiente resto de antibiótico tipo rifalazilo:



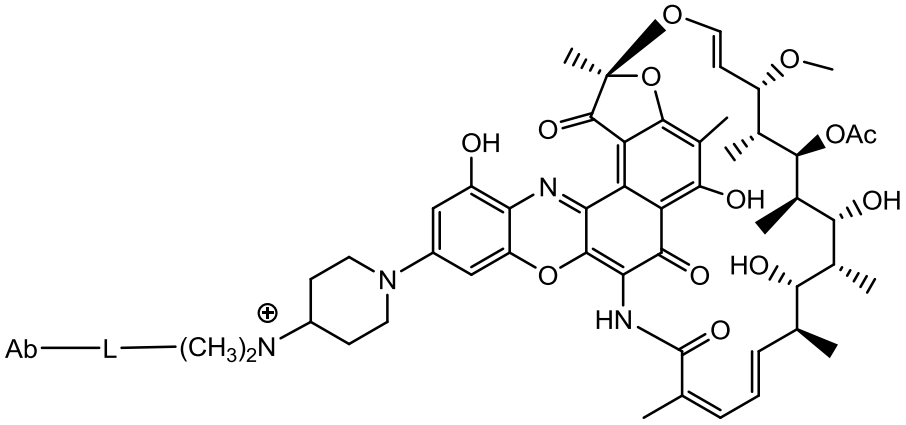
en donde R^5 se selecciona independientemente de H y alquiloC_1–C_{12}; y n es 0 ó 1.

Una forma de realización de los compuestos conjugados de anticuerpo–antibiótico de la invención incluye el siguiente resto de antibiótico tipo pipBOR:



en donde R^3 se selecciona independientemente de H y alquiloC_1–C_{12}; y n es 1 ó 2.

Una forma de realización de los compuestos conjugados de anticuerpo–antibiótico de la invención incluye la siguiente:



.

CARGA DE ANTIBIÓTICO DEL AAC

La carga de antibiótico está representada por p, el número promedio de restos de antibiótico (abx) por anticuerpo en una molécula de Fórmula I. La carga de antibiótico puede oscilar entre 1 y 20 restos de antibiótico (D) por anticuerpo. Los AAC de Fórmula I incluyen recolecciones o una combinación de anticuerpos conjugados con un rango de restos de antibiótico, de 1 a 20. El número promedio

de restos de antibiótico por anticuerpo en preparaciones de AAC a partir de reacciones de conjugación se puede caracterizar por medios convencionales, tales como espectroscopia de masa, ensayo de ELISA y HPLC. También se puede determinar la distribución cuantitativa de AAC en términos de p. En algunos casos, la separación, purificación y caracterización de AAC homogéneos, donde p es un determinado valor, a partir de AAC con otras cargas de antibiótico se puede lograr por medios tales como HPLC en fase inversa o electroforesis.

Para algunos conjugados de anticuerpo–antibiótico, p puede estar limitado por el número de sitios de unión en el anticuerpo. Por ejemplo, cuando la unión es un tiol de cisteína, como en las formas de realización ilustrativas anteriores, un anticuerpo puede tener sólo uno o varios grupos tiol de cisteína, o puede tener sólo uno o varios grupos tiol suficientemente reactivos a través de los cuales se puede unir un ligador. En ciertas formas de realización, una mayor carga de antibiótico, por ejemplo p >5, puede causar agregación, insolubilidad, toxicidad o pérdida de permeabilidad celular de ciertos conjugados de anticuerpo–antibiótico. En ciertas formas de realización, la carga de antibiótico para un AAC de la invención oscila entre 1 y aproximadamente 8; entre aproximadamente 2 y aproximadamente 6; entre aproximadamente 2 y aproximadamente 4; entre aproximadamente 3 y aproximadamente 5; aproximadamente 4; o aproximadamente 2.

En ciertas formas de realización, menos del máximo teórico de restos de antibiótico se conjugan con un anticuerpo durante una reacción de conjugación. Un anticuerpo puede contener, por ejemplo, residuos de lisina que no reaccionan con el intermediario de antibiótico–ligador o reactivo ligador, como se analiza más abajo. En general, los anticuerpos no contienen muchos grupos tiol de cisteína libres y reactivos que se pueden unir con un resto de antibiótico; de hecho, la mayoría de los residuos de tiol de cisteína en los anticuerpos existen como

puentes de disulfuro. En ciertas formas de realización, un anticuerpo se puede reducir con un agente reductor, tal como ditiotreitol (DTT) o tricarboniletilfosfina (TCEP), en condiciones reductoras parciales o totales, para generar grupos tiol de cisteína reactivos. En ciertas formas de realización, un anticuerpo se somete a condiciones de desnaturalización para revelar grupos nucleofílicos reactivos, tales como lisina o cisteína.

La carga (relación antibiótico/anticuerpo, "AAR") de un AAC se puede controlar de diferentes maneras, por ejemplo: (i) limitando el exceso molar de intermediario de antibiótico–ligador o reactivo ligador respecto del anticuerpo, (ii) limitando el tiempo o la temperatura de la reacción de conjugación, y (iii) limitando las condiciones de reducción parcial para la modificación de tiol de cisteína.

Se ha de entender que, cuando más de un grupo nucleofílico reacciona con un intermediario de antibiótico–ligador o reactivo ligador seguido por un reactivo de resto de antibiótico, el producto resultante es una mezcla de compuestos AAC con una distribución de uno o varios restos de antibiótico unidos a un anticuerpo. El número promedio de antibióticos por anticuerpo se puede calcular a partir de la mezcla mediante un ensayo de anticuerpo de ELISA dual, que es específico para el anticuerpo y específico para el antibiótico. Las moléculas de AAC individuales se pueden identificar en la mezcla por espectroscopia de masa y separar por HPLC, por ejemplo cromografía de interacción hidrofóbica (véase, por ejemplo, McDonagh *et al* (2006) Prot. Engr. Design & Selection 19(7):299–307; Hamblett *et al* (2004) Clin. Cancer Res. 10:7063–7070; Hamblett, K.J., *et al*. “Effect of drug loading on the pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity of an anti–CD30 antibody–drug conjugate”, Abstract No. 624, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, March 27–31, 2004, Proceedings of the AACR, Volume 45, March 2004; Alley, S.C., *et al*. “Controlling the location of drug attachment in antibody–drug conjugates”, Abstract No. 627, American Association

for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, March 27–31, 2004, Proceedings of the AACR, Volume 45, March 2004). En ciertas formas de realización, un AAC homogéneo con un único valor de carga se puede aislar a partir de la mezcla de conjugación por electroforesis o cromatografía. Los anticuerpos con cisteína modificada de la invención permiten preparaciones más homogéneas, dado que el sitio reactivo en el anticuerpo se limita principalmente al tiol de cisteína modificada por ingeniería genética. En una forma de realización, el número promedio de restos de antibiótico por anticuerpo se encuentra en el rango de aproximadamente 1 a aproximadamente 20. En algunas formas de realización, el rango se selecciona y se controla entre aproximadamente 1 y 4.

MÉTODOS PARA PREPARAR CONJUGADOS DE ANTICUERPO–ANTIBIÓTICO

Un AAC de Fórmula I se puede preparar mediante varias vías, empleando reacciones de química orgánica, condiciones y reactivos conocidos por el especialista en el arte, los cuales incluyen: (1) la reacción de un grupo nucleofílcio de un anticuerpo con un reactivo ligador bivalente para formar Ab–L a través de un enlace covalente, seguida por la reacción con un resto de antibiótico abx; y (2) la reacción de un grupo nucleofílico de un resto de antibiótico con un reactivo ligador bivalente, para formar L–abx, a través de un enlace covalente, seguida por la reacción con un grupo nucleofílico de un anticuerpo. Los ejemplos de métodos para preparar un AAC de Fórmula I a través de la última vía se describen en US 7498298, la cual se incorpora expresamente a la presente por referencia.

Los grupos nucleofílicos en los anticuerpos incluyen, aunque no a modo de limitación: (i) grupos amina N–terminales, (ii) grupos amina de cadena lateral, por ejemplo lisina, (iii) grupos tiol de cadena lateral, por ejemplo cisteína, y (iv) grupos hidroxilo o amino de azúcares, donde el anticuerpo es glucosilado. Los grupos amina, tiol e hidroxilo son nucleofílicos y capaces de reaccionar para formar

enlaces covalentes con grupos electrofílicos en restos de ligadores y reactivos ligadores, que incluyen: (i) ésteres activos tales como ésteres de NHS, ésteres de HOBt, haloformiatos y haluros de ácidos; (ii) haluros de alquilo y bencilo tales como haloacetamidas; (iii) grupos de aldehídos, cetonas, carboxilo y maleimida. Ciertos anticuerpos tienen disulfuros intercatenarios reducibles, es decir, puentes de cisteína. Los anticuerpos pueden hacerse reactivos para la conjugación con reactivos ligadores por tratamiento con un agente reductor tal como DTT (ditiotreitol) o tricarboniletilfosfina (TCEP), de modo tal que el anticuerpo se reduzca total o parcialmente. Así, cada puente de cisteína formará, teóricamente, dos nucleófilos de tiol reactivos. Se pueden introducir grupos nucleofílicos adicionales en los anticuerpos a través de la modificación de residuos de lisina, por ejemplo, haciendo reaccionar residuos de lisina con 2–iminotiolano (reactivo de Traut), lo cual resulta en la conversión de una amina en un tiol. Los grupos tiol reactivos se pueden introducir en un anticuerpo introduciendo uno, dos, tres, cuatro o más residuos de cisteína (por ejemplo, preparando anticuerpos variantes que comprenden uno o varios residuos de aminoácido cisteína no nativos).

Los conjugados de anticuerpo–antibiótico de la invención también se pueden producir por reacción entre un grupo electrofílico en un anticuerpo, tal como un grupo aldehído o cetona carbonilo, con un grupo nucleofílico en un reactivo ligador o antibiótico. Los grupos nucleofílicos útiles en un reactivo ligador incluyen, aunque no a modo de limitación, hidrazida, oxima, amino, hidrazina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidrazina y arilhidrazida. En una forma de realización, un anticuerpo se modifica para introducir restos electrofílicos que son capaces de reaccionar con sustituyentes nucleofílicos en el reactivo ligador o antibiótico. En otra forma de realización, los azúcares de anticuerpos glucosilados se pueden oxidar, por ejemplo con reactivos oxidantes de periodato, para formar grupos aldehído o cetona, los cuales pueden reaccionar con el grupo amina de los

reactivos ligadores o restos de antibiótico. Los grupos base de Schiff de imina resultantes pueden formar un enlace estable, o se pueden reducir, por ejemplo mediante reactivos de borohidruro, para formar enlaces de amina estables. En una forma de realización, la reacción de la porción carbohidrato de un anticuerpo glucosilado con galactosa oxidasa o meta–periodato de sodio puede proporcionar grupos carbonilo (aldehído y cetona) en el anticuerpo, que pueden reaccionar con grupos apropiados en el antibiótico (Hermanson, Bioconjugate Techniques). En otra forma de realización, los anticuerpos que contienen residuos de serina o treonina N–terminales pueden reaccionar con meta–periodato de sodio, lo cual da por resultado la producción de un aldehído en lugar del primer aminoácido (Geoghegan & Stroh, (1992) *Bioconjugate Chem.* 3:138–146; US 5362852). Dicho aldehído puede hacerse reaccionar con un resto de antibiótico o nucleófilo ligador.

Los grupos nucleofílicos de un resto de antibiótico incluyen, aunque no a modo de limitación, grupos amina, tiol, hidroxilo, hidrazida, oxima, hidrazina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidrazina y arilhidrazida, capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrofílicos en restos ligadores y reactivos ligadores, que incluyen: (i) ésteres activos tales como ésteres de NHS, ésteres de HOBt, haloformiatos y haluros de ácidos; (ii) haluros de alquilo y bencilo tales como haloacetamidas; (iii) grupos de aldehídos, cetonas, carboxilo y maleimida.

Los conjugados de anticuerpo–antibiótico (AAC) de la Tabla 3 se prepararon por conjugación de los anticuerpos anti–WTA e intermediarios de ligador–antibiótico descritos de la Tabla 2, y de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo 24. Los AAC fueron evaluados para determinar su eficacia por medio de un ensayo de macrófagos *in vitro* (Ejemplo 18) y un modelo renal de ratón *in vivo* (Ejemplo 19).

Tabla 3 Conjugados de anticuerpo–antibiótico (AAC)

AAC Nro.	AAC fórmula	ligador–abx LA Nro. (Tabla 2)	AAR *
AAC–101	tio–trastuzumab HC A118C–MC–vc–PAB–(dimetil–pipBOR)	LA–54	1,8
AAC–102	tio–S4497–HC–A118C–MC–vc–PABC–(pipBOR)	LA–51	1,9
AAC–103	tio–S4497–HC–A114C–MC–fk–PABC–(pipBOR)	LA–52	1,0
AAC–104	tio–S4497–HC–A114C–MP–vc–PABC–(pipBOR)	LA–53	1,8
AAC–105	tio–S4497–HC–A118C–MC–vc–PAB–(dimetilpipBOR)	LA–54	1,73 1,9
AAC–106	tio–S4462–HC–A118C–MC–vc–PAB–(dimetilpipBOR)	LA–54	
AAC–107	tio–S4497–HC–A118C–MC–vc–PABC–(monometilpip, desacetilBOR)	LA–55	1,75
AAC–108	tio–S4497–HC–A118C–MC–vc–PABC–(monometilpipBOR)	LA–56	1,5
AAC–109	tio–S4497–HC–A118C–MC–vc–PABC–(pip, desacetilBOR)	LA–57	1,9
AAC–110	tio–hu–anti gD 5B5–HC–A118C–MC–vc–PAB–(dimetilpipBOR)	LA–54	1,94
AAC–111	tio–S4497–HC–A118C–MC–vc–PABC–(rifabutina)	LA–58	1,6
AAC–112	tio–S4497–HC–A118C–MC–vc–PAB–(dimetil–pipBOR)	LA–54	1,65

AAC–113	tio–S4497 HC–MC–GGAFAGGG–(pipBOR) ("péptido central" divulgado como SEC.ID NRO.: 126)	LA–59	1,6
AAC–114	tio–S4462 HC–MC–GGAFAGGG–(pipBOR) ("péptido central" divulgado como SEC.ID NRO.: 126)	LA–59	1,8
AAC–115	tio–Tmab LC–MC–GGAFAGGG–(pipBOR) ("péptido central" divulgado como SEC.ID NRO.: 126)	LA–59	1,7
AAC–116	tio–S7578–MC–vc–PAB–(dimetil–pipBOR)	LA–54	tbd
AAC–117	tio–S4497–HC–A118C–MC–vc–PABC–(pipBOR)	LA–51	tbd
AAC–118	tio–S4497–HC–A118C–MC–vc–PAB–(oxiBOR)	LA–60	1,8
AAC–119	tio–S4497–HC–A118C–MC–vc–PAB–(dimetilpip, desacetilBOR)	LA–61	1,7
AAC–120	tio–S4497–HC–A118C–MC–vc–PABC–(piperazBTR)	LA–62	1,8
AAC–121	tio–S4497–HC–A118C–MC–vc–PABC–(piperaz, desacetilBTR)	LA–63	1,8
AAC–122	tio–S4497–HC–A118C–MC–vc–PAB–(dimetilpipBOR)	LA–54	1,9
AAC–123	tio–S4497–HC–A118C–MC–vc–PAB–(dimetilpipBOR)	LA–54	1,9
AAC–124	tio–S4497–HC–A118C– MC–vc–PABC–(piperazBTR)	LA–62	1,8
AAC–125	tio–S4497–HC–A118C–MC–vc–PABC–	LA–64	0,9

	(piperaz, desacetilBOR)		
AAC–126	tio–S4497–HC–A118C–MC–vc–PABC–(piperazBOR)	LA–65	1,7
AAC–127	tio–S4497–HC–A118C–MC–vc–PABC–PAB–(dimetilpipBOR)	LA–66	1,7
AAC–128	AAC–12	LA–67	1,9
AAC–129	tio–S6078–HC A114C–LCWT–MC–vc–PAB–(dimetilpipBOR)	LA–54	1,6
AAC–130	tio–S4497–HC–A118C–MC–vc–PAB–(oxi, isopropilpipBOR)	LA–68	1,8
AAC–131	tio–S4497–HC–A118C–MC–tpm–cit–PAB–(dimetilpipBOR)	LA–69	1,8
AAC–132	tio–S4497 HC MC–GPImeLFF–(pipBOR) ("péptido central" divulgado como SEC.ID NRO.: 129)	LA–69	1,3
AAC–133	tio–S4497 HC MC–GPILFF–(pipBOR) ("péptido central" divulgado como SEC.ID NRO.: 130)	LA–70	1,2
AAC–134	tio–S4497 HC MC–val–cit–phe–(pipBOR)	LA–71	1,7
AAC–135	tio–S4497–HC–A118C–MC–vc–PAB–(dimetilpipBOR)	LA–54	1,9
AAC–136	tio–S4497.v1 HC WT, LC V205C– MC–vc–PAB–(dimetilpipBOR)	LA–54	2
AAC–137	tio–S4497.v1 HC WT, LC V205C–MC–vc–PAB–(piperazBOR)	LA–65	tbd
AAC–138	tio–S4497 HC WT v8, LC V205C– MC–vc–PAB–(dimetilpipBOR)	LA–54	1,9

AAC–139	tio–S4497–HC–A118C– MC–vc–PAB–(dimetilpipBOR)	LA–54	1,8
AAC–140	tio–S4497 HC WT (v8), LC V205C–MC–vc–PAB–(piperazBOR)	LA–65	1,6
AAC–141	tio–S6078–HCA114C–LCWT–MC–vc–PAB–(dimetilpipBOR)	LA–54	1,6
AAC–142	tio–S4497 HC WT (v8), LC V205C–MC–vc–PAB–(dimetilpipBOR)	LA–54	1,7
AAC–143	tio–S4497 HC–MP–GGAFA–PAB–(pipBOR) ("péptido central" divulgado como SEC.ID NRO.: 131)	LA–87	1,55
AAC–144	tio–S4497 v1HC–MC–vc–PAB–(fenilpipBOR)	LA–72	1,7
AAC–145	tio–S4497 v1HC–MC–vc–PAB–(dimetilBTR)	LA–73	1,7
AAC–146	tio–Tmab HC A118C–MP–GGAFA–PABC–(pipBOR) ("péptido central" divulgado como SEC.ID NRO.: 131)	LA–87	1,3
AAC–147	tio–S4497 v1HC–MC–vc–PAB–(dimetilpipBOR)	LA–74	1,9
AAC–148	tio–S4497v1 HC–MC–vc–PABC–(pipBTR)	LA–75	1,9
AAC–149	tio–S4497v1 HC–MC–vc–PAB–(metilpiperaz, desacetilBOR)	LA–76	2
AAC–150	tio–S4497v1 HC–MC–vc–(fenilpipBOR)	LA–77	1,8
AAC–151	tio–S4497–HC–A118C–MC–vc–PAB–(3–dimetilaminopirrolBOR)	LA–78	tbd
AAC–152	tio–S4497–HC–A118C–MC–vc–PAB–(O–metil, dimetilpipBOR)	LA–79	1,7

AAC–153	tio–S4497–HC–A118C–MC–vc–PABC–(fenilpipBOR)	LA–80	tbd
AAC–154	tio–S4497v1 HC WT, LC V205C–MC–vc–PAB–(dimetilpipBOR)	LA–54	1,8
AAC–155	tio–S7578–HC WT–LC V205C–MC–vc–PAB–(dimetilpipBOR)	LA–54	1,9
AAC–156	tio–S4497v8–LC–MC–vc–PAB–(3–dimetilaminopirrolBOR)	LA–78	tbd
AAC–157	tio–S4497v8–LC–MC–vc–PABC–(desacetil, pipBTR)	LA–81	2,2
AAC–158	tio–S4497v8–LC–MC–vc–(desacetil, fenilpipBOR)	LA–82	–
AAC–159	tio–S4497v8–LC–MC–vc–PAB–(dimetilamino, metilaminoetilBTR)	LA–83	2,2
AAC–160	tio–S4497v8–LC–MC–vc–PAB–(metilpiperazBTR)	LA–84	tbd
AAC–161	tio–S4497v8–LC–MC–vc–(fenilpipBOR)	LA–85	tbd
AAC–162	tio–S4497v8–LC–MC–vc–PAB–(oxi, dimetilaminopipBOR)	LA–86	tbd
AAC–163	tio–S4497–v8–LCV205C–MC–LAFG–PAB–(dimetilamino–3–pirroloBOR) ("péptido central" divulgado como SEC.ID NRO.: 128)	LA–88	2,2
AAC–164	tio–S4497–v8–LCV205C–MC–vc–PABpirazolo(pipBOR)	LA–89	tbd
AAC–165	tio–S4497–v8–LCV205C–MC–vc–PAB–(monometilaminopipBOR)	LA–90	1,3

AAC–166	tio–S4497 HC WT (v8), LC V205C–MC–vc–PAB–(dimetilpipBOR)	LA–54	1,8
AAC–167	tio–S4497 HC WT (v8), LC V205C–MC–vc–PAB–(metil, etilaminopipBOR)	LA–91	2,0
AAC–168	tio–S4497 HC WT (v8), LC V205C–MC–vc–PABC–(aminometilpipBOR)	LA–92	1,6
AAC–139	tio–S4497 WT (V8), LC V205C–MC–vc–PABC–C21,C23–phenilacetal–(dimetilaminopipBOR)	LA–93	1,6
AAC–170	tio–S4497 WT (V8), LC V205C–MC–vc–PABCpip–(pipBOR)	LA–94	1,4
AAC–171	tio–S6078 v4 HC–Cys LC–Cys–MC–vc–PAB–(dimetilpipBOR)	LA–54	3,9
AAC–172	tio–S6078 v4 HC–CYS, LC–CYS–MC–vc–PAB–(piperazBOR)	LA–65	3,9
AAC–173	tio–S6078 v4 HC–WT, LC–Cys–MC–vc–PAB–(dimetilpipBOR)	LA–54	2,0
AAC–174	tio–S6078.v4.HC–WT, LC–CYS–MC–vc–PAB–(piperazBOR)	LA–65	1,8
AAC–175	tio–S4497 HC WT (v8), LC V205C–MP–hidrazidaPP–(pipBor)	LA–95	2,0
AAC–176	tio–S4497 HC WT (v8), LC V205C–MC–vc–PABC–(azetidinilBOR)	LA–96	tbd
AAC–177	tio–S4497–v8–LCV205C–MC–vc–PABC–(etilpiperazino, desacetilBOR)	LA–97	1,6
AAC–178	tio–S4497–v8–LCV205C–MC–vc–PABC–(etilaminopiperazinoBOR)	LA–98	1,7

AAC–179	tio–S4497–v8–LCV205C–MC–vc–PABfenil–(pipBOR)	LA–99	1,9
AAC–180	tio–S4497–v8–LCV205C–MC–vc–PAB–(fluoroquinolona, oxiBOR)	LA–100	1,9
AAC–181	tio–S4497–v8–LCV205C–MC–vc–PAB–(fenoxipip, oxiBOR)	LA–101	1,6
AAC–182	tio–S6078 v4 HC–CYS, LC–CYS–MC–vc–PAB–(oxi, dimetilaminopipBOR)	LA–86	4,0
AAC–183	tio–S6078 v4 HC–CYS, LC–CYS–MC–vc–PABC–(desacetilo, pipBTR)	LA–81	3,8
AAC–184	tio–S6078 v4 HC–CYS, LC–CYS–MC–vc–PAB–(oxi, isopropilpipBOR)	LA–68	tbd
AAC–185	tio–S6078 v4 HC–CYS, LC–CYS–MC–vc–PAB–(metilrifampicina)	LA–102	tbd
AAC–186	tio–S4497 HC WT (v8), LC V205C–MC–vc–PAB–(dimetilpipBOR)	LA–54	1,9
AAC–187	tio–S6078 v4 HC–CYS, LC–CYS–MC–vc–PAB–(dimetilpipBOR)	LA–54	3,8
AAC–188	tio–S6078 v4 HC–WT, LCCYS–MC–vc–PAB–(oxi, isopropilpipBOR)	LA–68	1,6
AAC–189	tio–S6078 v4 HC–WT, LC–CYS–MC–vc–PAB–(metilrifampicina)	LA–102	1,8
AAC–190	tio–S7578–HC–WT–LC–Cys–MC–vc–PAB–(dimetilpipBOR)	LA–54	1,9
AAC–191	tio–S4497–v8–LC–V205C–MC–vc–PAB–(dimetilaminoetilpiperazinoBOR)	LA–103	1,7
AAC–192	tio–S4497 HC WT (v8), LC V205C–MC–vc–	LA–54	1,9

	PAB–(dimetilpipBOR)		
AAC–193	tio–S4497 HC v1–MP–LAFG–PABC–(piperazinoBOR) ("péptido central" divulgado como SEC.ID NRO.: 128)	LA–104	1,8
AAC–194	tio–S6078 v4 HC–WT, LC–CYS–MC–vc–PAB–(piperazBOR)	LA–65	1,8
AAC–195	tio–S4497–v8–LC V205C–MC–vc–C21,C23–anilinoacetal–(dimetilaminopipBOR)	LA–105	2,0
AAC–196	tio–S4497–v8–LC V205C–MC–vc–anilino–(trimetilammonio–pip, oxiBOR)	LA–106	2,1
AAC–197	tio–S4497–v8–LC V205C–MC–vc–PAB–(dimetilamonio, fluoropipBOR)	LA–107	2,0
AAC–198	tio–S4497–v8–LC V205C–MC–vc–PAB–(dimetilamonio, tiopropil, desacetil BOR)	LA–108	1,9
AAC–199	tio–S4497–v8–LC V205C–MC–vc–PAB–(dimetilamonio, metilaminopropilBOR)	LA–109	1,8
AAC–200	tio–S4497–v8–LC V205C–MC–vc–PAB–(dimetilpipBOR)	LA–54	1,0
AAC–201	tio–S4497–v8–LC V205C–MC–vc–PABC–(metilaminopip, desacetil BOR)	LA–110	1,9
AAC–202	tio–S4497–v8–LC V205C–MC–vc–PAB–(oxi, pip, desacetil BOR)	LA–111	1,9
AAC–203	tio–S4497–v8–LC V205C–MC–vc–PAB–(metilrifampicina)	LA–102	1,8
AAC–204	tio–S4497–v8–LC–cys–MC–vc–PAB–(dimetilamonio, tiopropil BOR)	LA–112	2,0

AAC–205	tio–S4497–v8–LC V205C–MC–vc–PAB–(oxi, dimetilaminopipBOR)	LA–113	1,8
AAC–206	tio–S4497–v8–LC V205C–MC–vc–PAB–(N–isobutilrifabutina)	LA–114	1,9
AAC–207	tio–S4497–v8–LC V205C–MC–vc–PAB–(metilrifampicina)	LA–102	1,8
AAC–208	tio–S4497–v8–LC V205C–MC–vc–PAB–(dimetilamonio, fluoropipBOR)	LA–107	1,8
AAC–209	tio–S4497–v8–LC cys–D10–MC–vc–PAB–(dimetilpipBOR)	LA–54	1,9
AAC–210	tio–S4497–v8–LC cys–MC–vc–PABC–(monometilpipBTR)	LA–115	1,5
AAC–211	tio–S4497–v8–LC cys–MC–vc–PAB–(piperazinoBOR)	LA–116	tbd
AAC–212	tio–S4497–v8–LC cys–MC–vc–PAB–(*R*–fluoroquinolona, oxiBOR	LA–117	tbd
AAC–213	tio–S4497–v8–LC cys–MC–vc–PAB–(*S*–fluoroquinolona, oxiBOR	LA–118	tbd
AAC–214	tio–S4497–v8–LC–cys–MC–vc–PAB–(dimetilpip, desacetilBOR)	LA–61	2,0
AAC–215	tio–S4497 LC v8–MP–LAFG–PABC–(piperazinoBOR) ("péptido central" divulgado como SEC.ID NRO.: 128)	LA–104	1,6
AAC–216	tio–S4497 HC WT (v8), LC V205C–MC–vc–PAB–(piperazBOR)	LA–65	1,9

AAC–217	tio–S4497–v8–LCV205C–MC–vc–PAB–(monometilaminopipBOR)	LA–90	1,8
AAC–218	tio–S4497 HC WT (v8), LC V205C–MC–vc–PAB–(dimetilpipBOR)	LA–54	1,9
AAC–219	tio–S4497 HC WT (v8), LC V205C–MC–vc–PABC–(piperazBOR)	LA–65	1,9
AAC–220	tio–S4497–v8–LCV205C–MC–vc–PAB–(piperazinoBOR)	LA–116	tbd
AAC–221	tio–S4497–v8–LCV205C–MC–vc–PAB–(metilpiperaz BOR)	LA–67	tbd
AAC–222	tio–S4497 LC v8 –MP–LAFG–PABC–(piperazinoBOR) ("péptido central" divulgado como SEC.ID NRO.: 128)	LA–104	tbd

*AAR = relación promedio de antibiótico/anticuerpo.

Tipo salvaje ("WT"), anticuerpo mutante con cisteína modificada por ingeniería genética ("tio"), cadena liviana ("LC"), cadena pesada ("HC"), 6–maleimidocaproílo (“MC”), maleimidopropanoílo (“MP”), valina–citrulina (“val–cit” o “vc”), alanina–fenilalanina (“ala–phe”), p–aminobencilo (“PAB”) y p–aminobenciloxicarbonilo (“PABC”).

Tbd = a determinar.

HC–A114C (Kabat) = HC–A118C (EU)

ANÁLISIS *IN VITRO* QUE DEMUESTRA QUE LOS AAC ELIMINAN MRSA INTRACELULAR

Los experimentos *in vitro* confirman que los AAC liberan el antibiótico activo sólo después de que el ligador entre el anticuerpo y el antibiótico es

escindido por una enzima apropiada, tal como catepsina B. Se cultivó MRSA hasta el día siguiente en medio de crecimiento bacteriano normal y hasta 10 µg/ml de AAC. La incubación de MRSA con los AAC S4497–pipBOR o S4497–dimetil–pipBOR no dio por resultado la inhibición del crecimiento bacteriano, a menos que los AAC fueran pretratados con catepsina B para liberar el antibiótico activo. Un ensayo *in vitro* que utilizó macrófagos peritoneales murinos confirmó que AAC liberan el antibiótico activo y matan MRSA dentro de las células fagocíticas (Ejemplo 18). Un AAC que comprende el anticuerpo rF1, que se une a una familia de proteínas asociadas con la pared celular, se conjugó con un derivado de rifamicina. *S. aureus* (cepa Newman) se trató con distintas dosis del rF1–AAC o con dosis equivalentes del anticuerpo solo, rifampicina sola o una mezcla de anticuerpo y rifampicina libre para permitir la unión del anticuerpo a la bacteria (opsonización), y luego de 1 hora de incubación, las bacterias opsonizadas fueron entregadas a los macrófagos (Figura 7A).

La Figura 7A muestra un ensayo de macrófagos *in vitro* que demuestra que AAC matan las MRSA intracelulares. *S. aureus* (Newman) se incubó con anticuerpo rF1 solo, rifampicina libre sola, una mezcla simple del anticuerpo rF1 más rifampicina libre combinada en la misma relación de anticuerpo a antibiótico hallada en el AAC, o el rF1–AAC durante 1 hora, y se agregó a los macrófagos murinos. Los macrófagos se incubaron a 37ºC durante 2 horas para permitir la fagocitosis. Luego de completada la fagocitosis, la mezcla de infección fue reemplazada con medio de crecimiento normal suplementado con 50 µg/ml de gentamicina para inhibir el crecimiento de bacterias extracelulares, y el número total de bacterias intracelulares sobrevivientes se determinó 2 días después de la infección por colocación en placas.

Los macrófagos se infectaron durante 2 horas, y la infección se removió y se reemplazó con medio que contenía gentamicina para matar toda bacteria

extracelular remanente que no hubiera sido tomada por los macrófagos. Luego de 2 días, los macrófagos se lisaron y el número total de bacterias intracelulares sobrevivientes se determinó por colocación en placas en placas de agar. El análisis reveló que el tratamiento con el AAC dio por resultado una reducción de más de 100 veces en el número de bacterias intracelulares en comparación con el tratamiento con una mezcla simple del anticuerpo rF1 más rifampicina libre combinada en la misma relación anticuerpo a antibiótico que la hallada en el AAC (Figura 7A).

MRSA es capaz de invadir un número de tipos celulares no fagocíticos, incluidos osteoblastos y diversos tipos de células epiteliales y endoteliales (Garzoni y Kelly, (2008) Trends in Microbiology). MRSA es capaz de infectar una línea celular de osteoblastos (MG63), una línea celular epitelial de vías aéreas (A549) y cultivos primarios de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC). La Figura 7B muestra la destrucción intracelular de MRSA (cepa USA300) con 50 µg/ml de AAC S4497–pipBOR **102** en macrófagos, osteoblastos (MG63), células epiteliales de vías aéreas (A549) y células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) donde el anticuerpo simple no conjugado S4497 no lo logra. Estos tipos celulares probablemente expresen menores niveles generales de catepsina B que las células fagocíticas profesionales, tales como los macrófagos; sin embargo, MRSA tratada con 50 µg/ml fue efectivamente destruida luego de la internalización en estas tres líneas celulares. La línea punteada indica el límite de detección del ensayo.

Se realizó un análisis *in vitro* para comparar la actividad de AAC elaborado con variaciones en el ligador que une el anticuerpo con el antibiótico. El AAC S4497–dimetil–pipBOR es más potente que el AAC S4497–pipBOR en el enayo de destrucción intracelular de macrófago. El AAC S4497–pipBOR y el AAC S4497–dimetil–pipBOR fueron titulados para determinar la dosis efectiva mínima

en nuestro ensayo de destrucción intracelular de macrófago (Figura 7C). Puede ser necesario el tratamiento con al menos 2 µg/ml de AAC para lograr una depuración óptima de bacterias intracelulares.

La Figura 7C muestra una comparación de AAC hecho con pipBOR **51** vs. dimetil–pipBOR (diMe–pipBOR) **54**. MRSA fue opsonizada con anticuerpo S4497 solo o con los AAC S4497–pipBOR **102** o S4497–diMetil–pipBOR **105** en distintas concentraciones, que oscilaron entre 10 µg/ml y 0,003 µg/ml. Estos datos revelaron que para ambos AAC, la destrucción óptima se produjo cuando los AAC se evaluaron a más de 2 µg/ml, con una pérdida de actividad dependiente de la dosis que se hizo evidente a 0,4 µg/ml. El nivel general de destrucción fue significativamente superior con el AAC S4497 dimetil–pipBOR **105**. El tratamiento con mayores dosis del AAC S4497–dimetil–pipBOR **105** eliminó las bacterias intracelulares hasta debajo del límite de detección, y se observó más de 300 veces de destrucción usando una dosis subóptima de 0,4 µg/ml de AAC.

La Figura 7D muestra que AAC mata las bacterias intracelulares sin dañar los macrófagos. La cepa USA300 de *S. aureus* se preincubó con 50 µg/ml del anticuerpo S4497 anti–*S. aureus* (anticuerpo) o con 50 µg/ml de AAC tio–S4497–HC–A118C–MC–vc–PAB–dimetilpipBOR **105** durante 1 hora para permitir la unión del anticuerpo a la bacteria. Las bacterias opsonizadas se agregaron a macrófagos peritoneales murinos a una multiplicidad de infección de 10–20 bacterias por macrófago y se incubaron a 37ºC durante 2 horas para permitir la fagocitosis. Luego de que se completara la fagocitosis, las bacterias libres se removieron, y los macrófagos se cultivaron durante 2 días en medio de crecimiento normal suplementado con 50 µg/ml de gentamicina para matar las bacterias no internalizadas. Al final del período de cultivo, la supervivencia de los macrófagos se evaluó detectando la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) citoplásmica en el sobrenadante de cultivo. La cantidad total de LDH liberada de

cada cavidad se comparó con las cavidades de control que contenían macrófagos que fueron lisados por adición de detergente a las cavidades. Se midió el grado de lisis celular de los macrófagos en las cavidades tratadas con detergente, los macrófagos no infectados, los macrófagos infectados con USA300 pre–opsonizada con anticuerpo S4497, o los macrófagos infectados con USA300 pre–opsonizada con AAC tio–S4497–HC–A118C–MC–vc–PAB–dimetilpipBOR **105**.

La Figura 7E muestra la recuperación de USA300 vivas desde el interior de los macrófagos a partir de la lisis celular de macrófagos anterior. Los macrófagos fueron lisados, y se realizaron diluciones en serie del lisado celular para enumerar la cantidad de bacterias intracelulares sobrevivientes.

La Figura 9 muestra un ensayo de inhibición de crecimiento que demuestra que AAC no son tóxicos para *S. aureus* a menos que el ligador sea escindido por catepsina B. A la izquiera se muestra un esquema del ensayo de liberación de catepsina (Ejemplo 20). AAC se trata con catepsina B para liberar el antibiótico libre. La cantidad total de actividad antibiótica en el AAC intacto versus el AAC tratado con catepsina B se determina preparando diluciones en serie de la reacción resultante y determinando la dosis mínima de AAC que es capaz de inhibir el crecimiento de *S. aureus*. El gráfico superior derecho muestra el ensayo de liberación de catepsina para tio–S4497–HC–A118C–MC–vc–PAB–pipBOR **102,** y el gráfico inferior derecho muestra el ensayo de liberación de catepsina para tio–S4497–HC–A118C–MC–vc–PAB–dimetilpipBOR **105**.

EFICACIA *IN VIVO* DE LOS CONJUGADOS DE ANTICUERPO–ANTIBIÓTICO:

Se estableció un modelo *in vivo* de peritonitis en ratones para evaluar la eficacia del AAC. En este modelo, los ratones se infectan por inyección intraperitoneal (I.P.) de MRSA, y la carga bacteriana se monitorea 2 días después de la inyección en el fluido peritoneal y el riñón. Las bacterias consechadas del peritoneo se pudieron hallar como bacterias extracelulars de flotación libre o

internalizadas dentro de células peritoneales –principalmente neutrófilos y macrófagos– que son reclutadas al sitio de la infección. Aunque las bacterias extracelulares identificadas en este modelo parecían ser sensibles al tratamiento con antibiótico, las bacterias intracelulares demostraron no responder al tratamiento con varios antibióticos clínicamente relevantes, incluida la rifampina (Sandberg *et al* (2009) Antimicrobial Agents Chemother) y por lo tanto parecieron ser un excelente blanco para evaluar la eficacia de nuestros AAC.

La Figura 8A muestra la eficacia *in vivo* del AAC S4497–pipBOR **102**. Modelo de infección intraperitoneal en ratones A/J. Los ratones se infectaron con 5×10^7 CFU de MRSA por inyección intraperitoneal y se trataron con 50 mg/kg del anticuerpo S4497 solo o con 50 mg/kg del AAC S4497–pipBOR **102** por inyección intraperitoneal (protocolo 11–2032A). Los ratones fueron sacrificados 2 días después de la infección, y la carga bacteriana total se evaluó en el sobrenadante peritoneal (bacterias extracelulares), las células peritoneales (bacterias intracelulares) o en el riñón.

Los ratones A/J fueron infectados con USA300 y se les administró 50 mg/kg de anticuerpo S4497 o AAC S4497–pipBOR **102** treinta minutos después de la infección. Al cabo de 2 días, los ratones fueron sacrificados, y las cargas bacterianas se monitorearon en el lavado peritoneal y en el riñón. Para distinguir entre bacterias extracelulares e intracelulares, el lavado peritoneal se centrifugó suavemente para separar el sobrenadante, que contenía las bacterias extracelulares, y las células peritoneales. Las células peritoneales se trataron con lisostafina para matar cualquier bacteria extracelular contaminante y se lisaron para calcular la cantidad total de bacterias intracelulares al momento de la cosecha. Aunque los ratones tratados con anticuerpo solo albergaban entre 10^5 y 10^6 CFU de bacterias intracelulares y extracelulares en el lavado peritoneal y entre 10^4 y 10^6 bacterias en el riñón, los ratones tratados con el AAC S4497–

pipBOR eliminaron la infección hasta debajo del límite de detección. Estos datos revelaron que aunque el AAC está diseñado para liberar el antibiótico activo dentro del fagolisosoma, se observó una excelente eliminación de las combinaciones intracelulares y extracelulares de MRSA. Dado que las bacterias extracelulares no son destruidas directamente por el AAC, el hecho de que estas bacterias también fueran eliminadas por el tratamiento con AAC sugiere que una significativa fracción de las bacterias extracelulares es tomada por las células en algún momento durante la infección, o que el AAC es capaz de mejorar la captación de bacterias extracelulares, con lo cual aumenta la proporción relativa de bacterias que son intracelulares, donde son efectivamente destruidas por el AAC.

También se examinó la eficacia del AAC en un modelo de infección intravenosa. En este modelo, *S. aureus* se tomó haciendo circular neutrófilos poco después de la infección, de modo tal que la mayoría de las bacterias halladas en sangre se asociaran con células huésped dentro de los pocos minutos posteriores a la infección (Rogers, *et al* (1956) J. Exp. Med. 103:713–742). Los ratones A/J fueron infectados con 2 x 10^6 CFU de MRSA por inyección intravenosa, y luego se trataron con 50 mg/kg de AAC por inyección intravenosa 30 minutos después de la infección. En este modelo, el sitio de infección primario es el riñón, y los ratones desarrollan grandes abscesos que son detectables dos días después de la infección y que no logran eliminar durante hasta 30 días en ausencia de tratamiento. El tratamiento con 50 mg/kg del AAC S4497–pipBOR **102** eliminó la infección en todos los ratones evaluados (Figura 8B).

La Figura 8B muestra un modelo de infección intravenosa en ratones A/J. Los ratones se infectaron con 2 x 10^6 CFU por inyección intravenosa y se trataron con 50 mg/kg de anticuerpo S4497, 50 mg/kg de AAC S4497–pipBOR **102** o una mezcla simple de 50 mg/kg de anticuerpo S4497 + 0,5 mg/kg de rifamicina libre.

Los tratamientos se administraron por inyección IV 30 minutos después de la infección, y los riñones se cosecharon 4 días después de la infección. La línea punteada gris indica el límite de detección para cada órgano. Los grupos de control tratados con 50 mg/kg de anticuerpo S4497 solo, o con una mezcla simple de 50 mg/kg de anticuerpo S4497 más 0,5 mg/kg de rifamicina libre (la dosis equivalente del antibiótico presente en 50 mg/kg deAAC) no mostraron eficacia.

La eficacia de AAC preparado con restos de antibiótico pipBOR y dimetil–pipBOR se comparó *in vivo* en el modelo de infección intravenosa en ratones A/J. El AAC S4497–pipBOR **102** (Figura 9A) o el AAC S4497–dimetil–pipBOR **105** (Figura 9B) se administraron en distintas dosis, que variarone entre 50 mg/kg y 2 m/kg 30 minutos después de la infección, y los riñones se examinaron 4 días después de la infección para determinar la carga bacteriana total. La Figura 9A muestra la eficacia de AAC pipBOR **102** en un modelo de infección intravenosa por titulación del AAC S4497–pipBOR **102**. Los ratones A/J hembras de 7 semanas de vida se infectaron con 2 x 10^6 CFU de MRSA (cepa USA300) por inyección intravenosa en la vena de la cola. La Figura 9B muestra la eficacoa de AAC diMetil–pipBOR **105** en el modelo de infección intravenosa por titulación del AAC S4497–dimetil–pipBOR **105**. Los tratamientos con anticuerpo S4497, AAC **102** o AAC **105** se administraron en las dosis indicadas 30 minutos después de la infección. Los ratones fueron sacrificados 4 días después de la infección, y el número total de bacterias sobrevivientes por ratón (2 riñones combinados) se determinó por colocación en placas.

Ambos AAC fueron efectivos en la dosis más alta de 50 mg/kg; sin embargo, el AAC S4497–pipBOR **102** sólo fue parcialmente eficaz en las dosis menores. El AAC S4497–dimetil–pipBOR **105** proporcionó una eliminación bacteriana completa en dosis superiores a 10 mg/kg. Los experimentos subsiguientes indicaron que se requerían dosis por encima de 15 mg/kg para

lograr una eliminación bacteriana consistente. Las Figuras 9A y 9B muestran que AAC tio–S4497–HC–A118C–MC–vc–PAB–dimetilpipBOR **105** es más eficaz que AAC tio–S4497–HC–A118C–MC–vc–PAB–pipBOR **102** en un modelo de infección intravenosa, lo que indica un efecto de la distinción estructural del carbamato (**51**) y dimetilpiperidilo (**54**) entre **102** y **105**, respectivamente.

Los ratones se trataron con el AAC 30 minutos después de la infección. Para replicar mejor las condiciones que probablemente ocurran en pacientes con MRSA que procuren tratamiento, se determinó si el AAC es efectivo para eliminar una infección establecida y si la unión del antibiótico con un anticuerpo anti–*S. aureus* proporciona una ventaja definitiva sobre el tratamiento con el antibiótico solo. Para este fin, se comparó la eficacia del AAC con una dosis equivalente del antibiótico dimetil–pipBOR.

La Figura 9C muestra ratones CB17.SCID infectados con 2 x 10^7 CFU de MRSA por inyección intravenosa (protocolo 12–2418). Un día después de la infección, los ratones se trataron con 50 mg/kg de anticuerpo S4497, 50 mg/kg de AAC S4497 dimetil–pipBOR **105** o con 0,5 mg/kg de anitbiótico dimetil–pipBOR **7** (la dosis equivalente de antibiótico contenido en 50 mg/kg de AAC). Los ratones fueron sacrificados 4 días después de la infección, y el número total de bacterias sobrevivientes por ratón (2 riñones combinados) se determinó por colocación en placas. El tratamiento con 50 mg/kg de AAC S4497–dimetil–pipBOR fue claramente eficaz cuando se administró 1 día después de la infección, mientras que el tratamiento con la dosis equivalente de dimetil–pipBOR solo no logró eliminar la infección.

EL TRATAMIENTO CON UN AAC ES EFICAZ EN PRESENCIA DE ANTICUERPOS HUMANOS Y SUPERIOR AL TRATAMIENTO CON EL ESTÁNDAR DE REFERENCIA ACTUAL (SOC), LA VANCOMICINA

El anticuerpo S4497 fue clonado a partir de células B derivadas de pacientes infectados con *S. aureus*. Esto generó la preocupación de que el suero humano normal o el suero presente en pacientes infectados con MRSA puede contener anticuerpos anti–MRSA que competirían por la unión con nuestro AAC. Para tratar esto, se evaluó suero humano derivado de donantes sanos normales y un panel de pacientes con MRSA, a fin de estimar el nivel general de anticuerpos anti–MRSA que reconocen el mismo antígeno que el AAC. Se desarrolló un ensayo basado en ELISA usando preparaciones de pared celular a partir de MRSA. Para limitar la unión no antígeno–específica a las preparaciones de pared celular en estos ensayos, se utilizó una cepa de MRSA que es deficiente en el gen para la proteína A. La proteía A se une a la región Fc de los anticuerpos IgG. La unión de diversas muestras séricas de tipo salvaje (WT) a MRSA que expresaba el antígeno S4497 (Figura 10A, WT) fue examinada en comparación con la unión a una cepa de MRSA TarM/TarS DKO (doble knockout) mutante que carece de las modificaciones de azúcares que son reconocidas por el anticuerpo S4497. La Figura 10A muestra la prevalencia de anticuerpos anti–*S. aureus* en suero humano. Los pacientes infectados con *S. aureus* o los controles normales contienen grandes cantidades de anticuerpos séricos específicos de WTA con la misma especificidad que anti–WTA S4497.

Se generó una curva estándar usando un anticuerpo monoclonal que se une bien al mismo antígeno que es reconocido por S4497. Comparando el nivel de unión en muestras séricas con la señal obtenida del anticuerpo usado para generar la curva estándar, se estimó el nivel de anticuerpos anti–MRSA presentes en muestras séricas derivadas de donantes sanos normales o pacientes con MRSA, o en preparaciones de IgG total aisladas de suero normal (Figura 10A). el suero humano normal contiene 10–15 mg/ml de IgG total (Manz *et al*. (2005) Annu Rev. Immunol. 23:367). El análisis de la reactividad anti–MRSA en las diferentes

muestras séricas reveló que hasta 300 µg/ml de estos anticuerpos son potencialmente reactivos con el mismo antígeno reconocido por S4497 y, por lo tanto, es probable que compitan por la unión con el AAC.

El anticuerpo S4497 se usó para generar AAC paar propiedades que incluyen una unión muy alta en MRSA (estimación de 50.000 sitios de unión por bacteria). Suficientes números de AAC pueden ser capaces de unirse con MRSA incluso en presencia de los anticuerpos rivales hallados en el suero humano. Para evaluar esto directamente, se tituló el AAC S4497–dimetil–pipBOR en búfer suplementado con 10 mg/ml de IgG humana (Figura 10B, +IGIV), y se midió el nivel de destrucción intracelular en el ensayo de destrucción intracelular de macrófagos.

La Figura 10B muestra un modelo de infección *in vivo* que demuestra que el AAC es eficaz en presencia de niveles fisiológicos de IgG humana. El ensayo de macrófagos *in vitro* con la cepa USA300 de MRSA muestra que el AAC S4497–dimetil–pipBOR **105** es eficaz en presencia de 10 mg/ml de IgG humana. La cepa USA300 de MRSA fue opsonizada con AAC solo, o con AAC diluido en 10 mg/ml de IgG humana durante 1 hora a 37 ºC con agitación. Las bacterias opsonizadas se agregaron directamente a macrófagos peritoneales murinos y se incubaron durante 2 horas para permitir la fagocitosis. Después de la infección, los cultivos de macrófagos se mantuvieron en medio completo suplementado con gentamicina, y el número total de bacterias intracelulares sobrevivientes se evaluó 2 días después de la infección. Estos datos revelaron que, aunque la IgG humana inhibió la destrucción de AAC en las dosis más bajas, se alcanzó una excelente destrucción usando dosis por sobre 10 µg/ml, una concentración de anticuerpo que es fácilmente alcanzable *in vivo*. La IgG sérica normal puede disminuir el efecto funcional del AAC **105**. Dado que la máxima actividad de destrucción intracelular de macrófagos de un AAC puede requerir de una alta unión a

antígeno y una eficiente interacción con FcRs (para la opsonofagocitosis), los anticuerpos séricos preexistentes pueden competir ambos por la unión a WTA, y los correspondientes complejos inmunes formados compiten por la unión a FcRs en los macrófagos.

Para confirmar que el AAC sería efectivo en presencia de anticuerpos humanos rivales *in vivo*, se modificó el modelo de infección *in vivo* para generar ratones que expresen niveles normales de IgG humana en el suero. Los ratones CB17:SCID, que carecen de células T y células B y, por lo tanto, no tienen anticuerpos en el suero (Bosna y Carroll, (1991) Ann Rev Immunol. 9:323), fueron reconstituidos con 10 mg/ml de IgG humana por dosificación diaria de IgG humana altamente concentrada (IGIV). Los estudios preliminares confirmaron que estos ratones, denominados SCID:huIgG, de hecho tenían niveles sostenidos de al menos 10 mg/ml de IgG humana en el suero y que estos ratones eran igualmente susceptibles a la infección con MRSA en comparación con los controles no tratados. Los ratones SCID:huIgG se infectaron con MRSA y se trataron con anticuerpo S4497 o con el AAC S4497–dimetil–pipBOR (50 mg/kg) 1 día después de la infección. Cuatro días después de la infección, se evaluó la carga bacteriana en los riñones (Figura 10C).

La Figura 10C muestra los datos combinados de 3 experimentos independientes que usaron 2 preparaciones separadas del AAC tio–S4497–HC–A118C–MC–vc–PAB–dimetil–pipBOR **105** o **112**. Los ratones CB17.SCID fueron reconstituidos con IgG humana usando un régimen posológico optimizado para obtener niveles constantes de al menos 10 mg/ml de IgG humana en suero. Los ratones se trataron con anticuerpo S4497 (50 mg/kg) o AAC S4497–dimetil–pipBOR (50 mg/kg). Los ratones tratados con el AAC tuvieron una reducción mayor a 4–log de la carga bacteriana (prueba T de Student, p=0,0005). Las cargas bacterianas fueron, en promedio, más de 10.000 veces menores en los

ratones tratados con el AAC S4497–dimetil–pipBOR en comparación con los ratones tratados con el anticuerpo S4497 de control, lo cual indica que el AAC fue claramente efectivo incluso en presencia de altos niveles de anticuerpos anti–MRSA humanos rivales.

La eficacia del AAC se comparó con la del tratamiento con vancomicina, el estándar de referencia actual para infecciones por MRSA. La Figura 11A muestra un modelo de infección *in vivo* que demuestra que el AAC es más eficaz que el estándar de referencia actual (SOC) del antibiótico vancomicina en ratones que son reconstituidos con niveles normales de IgG humana. Los ratones CB17.SCID fueron reconstituidos con IgG humana usando un régimen posológico optimizado para obtener niveles constantes de al menos 10 mg/ml de IgG humana en suero. Los ratones se trataron con anticuerpo S4497 (50 mg/kg), vancomicina (100 mg/kg), AAC S4497–dimetil–pipBOR (50 mg/kg, **112** o un AAC elaborado con un anticuerpo de control de isotipo que no reconoce MRSA, AAC tio–hu–anti gD 5B5–HC–A118C–MC–vc–PAB–dimetilpipBOR **110** (50 mg/kg). A los ratones que recibieron AAC se les administró una dosis única de AAC el Día 1 después de la infección por inyección intravenosa. A los ratones que recibieron tratamiento con vancomicina se les administraron inyecciones dos veces por día del antibiótico por inyección intraperitoneal. Todos los ratones fueron sacrificados el Día 4 después de la infección, y el número total de bacterias sobrevivientes por ratón (2 riñones combinados) se determinó por colocación en placas.

El tratamiento con vancomicina es efectivo para tratar la infección por MRSA en nuestro modelo de infección intravenosa murino si el tratamiento se inicia 30 minutos después de la infección. La dosificación dos veces por día con 100 mg/kg de vancomicina no logró eliminar la infección y sólo fue capaz de reducir la carga bacteriana en aproximadamente 50 veces, cuando el tratamiento se inició más de 1 día después de la infección (Figura 11A). Resulta sorprendente

que el tratamiento con una sola dosis del AAC S4497–dimetil–pipBOR 1 día después de la infección haya sido capaz de eliminar la infección en la mayoría de los ratones. Sorprendentemente, el tratamiento con el AAC de control elaborado con un anticuerpo IgG humano que no reconoce a *S. aureus* (gD–AAC) tuvo cierta eficacia en este modelo. El anticuerpo gD no reconoce a *S. aureus* a través de su sitio de unión a antígeno; sin embargo, el anticuerpo es capaz de unirse con la proteína A hallada en *S. aureus*.

La Figura 11C muestra un modelo de infección *in vivo* que demuestra que el AAC, tio–S6078–HC A114C–LCWT–MC–vc–PAB–dimetilpipBOR **129,** es más eficaz que el anticuerpo anti–WTA puro S4497, de acuerdo con el mismo régimen que en la Figura 11A, en ratones que son reconstituidos con niveles normales de IgG humana. Los ratones CB17.SCID fueron reconstituidos con IgG humana usando un régimen posológico optimizado para obtener niveles constantes de al menos 10 mg/ml de IgG humana en suero. Los ratones se trataron con anticuerpo S4497 (50 mg/kg) o AAC tio–S6078–HC A114C–LCWT–MC–vc–PAB–dimetilpipBOR **129** (50 mg/kg).

El análisis FACS demostró que la tinción con altas concentraciones del anticuerpo gD en bacterias aisladas de una infección *in vivo* proporciona un bajo nivel de unión a *S. aureus* en comparación con la unión de anticuerpos anti–MRSA a MRSA aislados de riñones infectados (Figura 11B). Los ratones se infectaron con MRSA por inyección intravenosa, y los riñones infectados se extirparon 3 días después de la infección y se homogeneizaron. Los anticuerpos anti–MRSA o de control se marcaron con Alexa–488 y se evaluaron a un rango de concentraciones entre 0,08 µg/ml y 50 µg/ml. El anticuerpo S4497 reconoce una modificación de N–acetilglucosamina que está unida al ácido teicoico de pared (WTA) a través de un enlace beta–anomérico en la pared celular de *S. aureus*. El anticuerpo S7578 se une a una modificación de N–acetilglucosamina similar que

está unida al WTA a través de un enlace alfa–anomérico. El anticuerpo rF1 es un anticuerpo anti–MRSA de control positivo que reconoce modificaciones de azúcares halladas en una familia de proteínas ancladas de pared celular que contienen repeticiones de SDR. El anticuerpo gD es una IgG humana de control negativo que no reconoce a *S. aureus*. Aunque el nivel general de unión con el anticuerpo gD es significativamente menor que el obtenido con el anticuerpo S4497 (estimado como al menos 30 veces menor por análisis FACS, Figura 11B), la limitada eficacia observada con el AAC gD indica que incluso el bajo nivel de unión de un AAC sobre MRSA *in vivo* es suficiente para lograr una eficacia que pareció ser equivalente a la reducción en CFU obtenida con vancomicina.

Los datos anteriores demuestran claramente que los AAC son capaces de destruir MRSA intracelulares, y que los AAC S4497–pipBOR y S4497 dimetil–pipBOR son efectivos para limitar la infección con MRSA tanto *in vitro* como *in vivo*. Los AAC de la invención actúan matando bacterias dentro de las células de mamíferos y, de esta forma, proporcionan un efecto terapéutico único que es más efectivo para matar poblaciones de bacterias que son resistentes al tratamiento con vancomicina.

La Figura 20 muestra que el pretratamiento con 50 mg/kg de anticuerpos libres no es eficaz en un modelo de infección intravenosa. Los ratones Balb/c recibieron una dosis única del vehículo de control (PBS) o 50 mg/kg de anticuerpos por inyección intravenosa 30 minutos antes de la infección con 2×10^7 CFU de USA300. Los grupos de tratamiento incluyeron un anticuerpo de control de isotipo que no se une a *S. aureus* (gD), un anticuerpo dirigido contra la modificación beta del ácido teicoico de pared (4497) o un anticuerpo dirigido contra la modificación alfa del ácido teicoico de pared (7578). Los ratones de control recibieron tratamiento dos veces por día con 110 mg/kg de vancomicina por inyección intraperitoneal (Vanco). Todos los ratones fueron sacrificados el Día

4 post–infection, y el número total de bacterias sobrevivientes en los riñones (2 riñones combinados) se determinó por colocación en placas. Aunque el pretratamiento con vancomicina eliminó la infección en todos los ratones evaluados, el pretratamiento con anticuerpos dirigidos contra la pared celular de *S. aureus* no tuvo efecto sobre las cargas bacterianas.

Las Figuras 21 y 22 muestran que los AAC dirigidos contra la modificación beta del ácido teicoico de pared o la modificación alfa del ácido teicoico de pared son eficaces en un modelo de infección intravenosa que usa ratones que son reconstituidos con niveles normales de IgG humana. Los ratones CB17.SCID fueron reconstituidos con IgG humana usando un régimen posológico optimizado para obtener niveles constantes de al menos 10 mg/ml de IgG humana en suero y se infectaron con 2 x 10^7 CFU de USA300 por inyección intravenosa. El tratamiento se inició 1 día después de la infección con control sólo de búfer (PBS), 60 mg/kg de AAC beta–WTA (**136** AAC) o 60 mg/kg de AAC alfa–WTA (AAC **155**). Los ratones se sacrificaron el Día 4 después de la infección, y el número total de bacterias sobrevivientes en los riñones (2 riñones combinados, Figura 21) y el corazón (Figura 22) se determinó por colocación en placas. El tratamiento con el AAC beta–WTA dio como resultado una reducción de 100.000 veces de la carga bacteriana en el riñón en comparación con los ratones tratados con el vehículo de control. El tratamiento con el AAC alfa–WTA dio como resultado una reducción promedio de 9.000 veces de la carga bacteriana en el riñón.

Hasta la fecha, sigue siendo incierto el motivo por el cual los antibióticos actualmente disponibles a menudo son ineficaces para destruir los depósitos intracelulares de bacterias. Los antibióticos podrían fallar porque no alcanzan las concentraciones suficientes dentro de las células, ya sea porque no ingresan en el compartimiento fagolisosomal donde residen los depósitos intracelulares de bacterias, o porque pueden estar sujetos a la actividad de las bombas de eflujo

que eliminan el antibiótico de las células de mamífero. Los antibióticos pueden ser dañados por las condiciones severas halladas dentro del fagolisosoma, que incluyen bajo pH, agentes reductores y agentes oxidantes que son liberados específicamente para matar las bacterias fagocitozadas. Alternativamente, los antibióticos pueden fallar porque las bacterias sobrerregulan mecanismos de defensa o no logran dividirse dentro del fagolisosoma y, por lo tanto, se convierten transitoriamente en insensibles a los antibióticos. La importancia relativa de estos mecanismos de resistencia a los antibióticos difiere para los diferentes patógenos y para cada antibiótico. El componente antibiótico de nuestro AAC, pipBOR y dimetil–pipBOR son de hecho más potentes que la rifampicina para matar las MRSA intracelulares cuando se evalúan como antibióticos libres. La unión de estos antibióticos a un anticuerpo proporciona un aumento real dependiente de la dosis en la eficacia que es evidente *in vivo* (Figura 9C). En este caso, la mayor eficiaca del AAC respecto del antibiótico solo probablemente se deba a una combinación de su capacidad para opsonizar bacterias y a una farmacocinética mejorada del AAC. La mayoría de los antibióticos libres son rápidamente eliminados *in vivo* y requieren de dosis repetidas con altas concentraciones de antibiótico para mantener una concentracuón suficiente de antibiótico en suero. Por el contrario, los AAC tienen prolongadas vidas medias en suero debido a la porción de anticuerpo de la molécula. Dado que los AAC liberan el antibiótico sólo después de la unión a *S. aureus* y de ser transportados junto con la bacteria dentro del espacio confinado del fagolisosoma, concentran pequeñas dosis de antibiótico específicamente en un nicho en el cual la mayoría de los antibióticos fallan. Por lo tanto, además de apuntar a reservorios protegidos de bacterias intracelulares, los AAC pueden facilitar el uso de antibióticos más potentes que pueden demostrar ser demasiado tóxicos para usar como agente único, limitando la liberación del antibiótico en el lugar donde más se necesita.

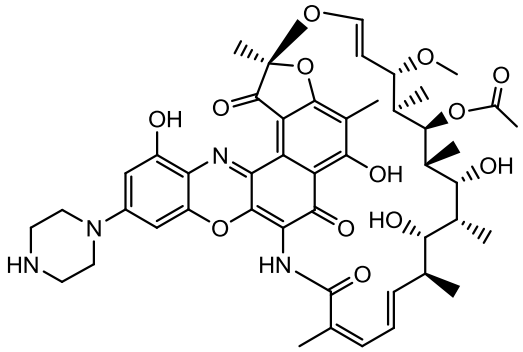
Las Figuras 35 y 36 muestran los resultados del ensayo de macrófagos *in vitro* para el AAC tio–S6078. *S. aureus* (USA300 NRS384) se incubó con anticuerpo S6078 no conjugado a 50 u/ml y AAC a 50 µg/ml, 5 µg/ml, 0,5 µg/ml o 0,05 µg/m durante 1 hora para permitir la unión del anticuerpo a las bacterias. Las bacterias opsonizadas resultantes se alimentaron a macrófagos murinos y se incubaron a 37ºC para permitir la fagocitosis. Al cabo de 2 horas, la mezcla de infección fue removida y reemplazada por medio de crecimiento normal suplementado con 50 µg/ml de gentamicina para matar toda bacteria extracelular remanente. El número total de bacterias intracelulares sobrevivientes se determinó 2 días después por colocación de diluciones en serie de los lisados de macrófago sobre placas de agar de soja tríptico. En la Figura 35, el AAC tio–S6078.v4.HC–WT, LC–Cys–MC–vc–PAB–(dimetilpipBOR) fue efectivo para destruit bacterias intracelulares en dosis de 0,5 µg/ml o mayores con una carga antibiótica de 2,0 (AAC–173) o 3,9 (AAC–171) de antibióticos dimetilpipBOR (LA–54) por anticuerpo tio–S6078. En la Figura 36, tio–S6078.v4.HC–WT, LC–Cys–MC–vc–PAB–(piperazBOR) fue efectivo para destruir bacterias intracelulares en dosis de 0,5 µg/ml o mayores, con una carga antibiótica de 1,8 (AAC–174) o 3,9 (AAC–172) de antibióticos piperazBOR (LA–65) por anticuerpo tio–S6078.

Las Figuras 37 y 38 muestran los resultados de la eficacia *in vivo* del AAC tio–S6078 en un modelo de infección intravenosa murino. Los ratones CB17.SCID fueron reconstituidos con IgG humana usando un régimen de dosificación optimizado para obtener niveles constantes de al menos 10 mg/ml de IgG humana en suero. Los ratones fueron infectados con USA300 y tratados con vehículo de control (PBS), tio–S6078.v4.HC–WT, LC–Cys–MC–vc–PAB–(dimetilpipBOR) AAC con una carga antibiótica de 2,0 (AAC–173) o 3,9 (AAC–171) de antibióticos dimetilpipBOR (LA–54) por anticuerpo tio–S6078 (Figura 37) y tio–S6078.v4.HC–WT, LC–Cys–MC–vc–PAB–(piperazBOR) con una carga antibiótica de 1,8 (AAC–

174) o 3,9 (AAC–172) de antibióticos piperazBOR (LA–65) por anticuerpo tio–S6078 (Figura 38). Los ratones recibieron una dosis única de AAC el Día 1 post–infección por inyección intravenosa y fueron sacrificados el Día 4 post–infección. El número total de bacterias sobrevivientes en 2 riñones se determinó por colocación en placas. El tratamiento con AAC que contenía una carga antibiótica menor redujo la carga bacteriana en aproximadamente 1.000 veces, y el tratamiento con el AAC que contenia una carga antibiótica mayor redujo la carga bacteriana en más de 10.000 veces.

LIGADORES ESCINDIBLES POR ESTAFOPAÍNA PARA CONJUGADOS DE ANTICUERPO–ANTIBIÓTICO

Un ligador escindible por proteasa se describe en la presente como escindible por estafopaína B, una endopeptidasa secretada de *S. aureus*. Para diseñar un ligador escindico específicamente por la bacteria *Staphylococcus aureus,* la actividad de proteasa del sobrenadante de cultivo de *S. aureus* se caracterizó usando una biblioteca de péptidos FRET. A partir de esta selección, se identificó una especificidad de sustrato única. Usando este sustrato, la enzima responsable de la actividad se purificó a partir del sobrenadante de cultivo y se identificó como estafopaína B. Sobre la base de esta identificación, se generó un ligador optimizado de estafopaína B y se unió a piperazino–rifamicina:



La piperazino–rifamicina es un potente antibiótico tipo rifalazilo. El AAC resultante ha demostrado eficacia en modelos *in vitro* e *in vivo* de infección por

MRSA, lo cual proporciona un nuevo mecanismo por el cual se puede apuntar a las infecciones por MRSA. La estafopaína B es una cisteína proteasa secretada de la familia papaína de las endopeptidasas (CAS Reg. Nro. 347841–89–8, Sigma–Aldrich #S3951, Filipek *et al* (2005) J. Biol. Chem. 280 (15): 14669–74) y ha evolucionado hasta tener una especificidad de sustrato únic, prefiriendo las cadenas laterales aromáticas grandes en la posición P2. La expresión de estafopaína B es controlada por el sistema sensorial de quórum *agr* (o regulador de gen accesorio) (Janzon, L. y S. Arvidson (1990) The EMBO Journal 9(5): 1391–1399) como parte de la cascada proteolítica estafilocócica (SCP). Agr modula la expresión de proteasas secretadas y otros factores de virulencia de *S. aureus,* incluyendo aureolisina, V8 y estafopaína A (Shaw, L., E. Golonka, *et al.* (2004) Microbiology 150(Pt 1): 217–228). La estafopaína B ha sido implicada como un potente factor de virulencia debido a su capacidad para degradar el tejido conectivo del huésped, así como aumentar varias proteínas del sistema inmune (Imamura, T., S. Tanase, *et al.* (2005) Journal of Experimental Medicine 201(10): 1669–1676; Potempa, J., A. Dubin, *et al.* (1988) Journal of Biological Chemistry 263(6): 2664–2667; Ohbayashi, T., A. Irie, *et al.* (2011) Microbiology 157(Pt 3): 786–792; Smagur, J., K. Guzik, *et al.* (2009); Biological Chemistry 390(4): 361–371; Smagur, J., K. Guzik, *et al.* (2009); Journal of Innate Immunity 1(2): 98–108; Kulig, P., B. A. Zabel, *et al.* (2007); Journal of Immunology 178(6): 3713–3720). El rol de la estafopaína B como importante factor de virulencia la hace un blanco atractivo para la liberación de antibiótico mediada por proteasa.

Identificación de sustratos escindidos por proteasas de *Staphylococcus aureus*:

Para identificar sustratos fácilmente escindidos por endopeptidasas de *S. aureus*, el sobrenadante de un cultivo durante toda la noche de la cepa Wood46 de *S. aureus* se incubó con una biblioteca de péptidos FRET comercialmente

disponible. La cepa Wood46 tiene un locus *agr* constitutivamente activo, por lo cual la cepa Wood46 exhibe una mayor expresión de proteasa en comparación con el tipo salvaje. La biblioteca de péptidos FRET, Rapid Endopeptidase Profiling Library or PepSets™ REPLi (Mimotopes, Victoria, Australia), consiste en 512 cavidades con 8 péptidos fluorogénicos internamente extinguidos por cavidad en un formato de placas de 96 cavidades. Los péptidos muestran fluorescencia tras la escisión, lo cual permite que la actividad proteolítica sea monitoreada en tiempo real. Cada péptido tiene un centro variable tripeptídico flanqueado por una serie de residuos de glicina a cada lado y otros dos residuos de lisina adicionales en el término C para la solubilidad. El sobrenadante del cultivo de Wood46 se agregó a la biblioteca, y las placas se incubaron hasta el día siguiente a 37 °C. Las cavidades que mostraban un aumento de más de 15 veces de la fluorescencia (12 de las 512 cavidades en total) fueron analizadas por LC–MS (Agilent Q–TOF) para determinar los productos de escisión. Los sitios de escisión se calificaron sobre la base de la frecuencia (Tabla 4). Entre las posiciones superiores, se observó un patrón en la especificidad de sustrato, específicamente una preferencia por las cadenas laterales hidrofóbicas grandes de Phe y Tyr en la posición P2.

Tabla 4. Preferencias de aminoácidos de las secuencias REPLi escindidas por proteasas secretadas de Wood46. Abundancia en cada posición (%)

Residuos	P4	P3	P2	P1	P1’	P2’
G	71,4	50,0	0,0	28,6	35,7	100,0
I/L	21,4	7,1	0,0	0,0	7,1	0,0

A/V	0,0	14,3	0,0	50,0	28,6	0,0
N/Q	7,1	7,1	0,0	0,0	7,1	0,0
S/T	0,0	14,3	0,0	14,3	0,0	0,0
F/Y	0,0	0,0	100,0	0,0	21,4	0,0
K/R	0,0	7,1	0,0	7,1	0,0	0,0

Abundancia en cada posición de residuos de aminoácidos presentes en los péptidos FRET de las cavidades que mostraron el mayor aumento de la fluorescencia. Los péptidos REPLi contienen la secuencia MCA–Gly–Gly–Gly–Xaa–Yaa–Zaa–Gly–Gly–DPA–Lys–Lys (SEC. ID NRO: 132), donde Xaa, Yaa y Zaa varían. Los residuos de glicina presentes en la tabla representan los residuos de Gly que flanquen el centro variable. Aunque los residuos de Gly son los más abundantes en varias posiciones, brindan poca luz en cuanto a la especificidad de sustrato. Al diseñar los ligadores, se dio preferencia a los aminoácidos del centro variable. Los aminoácidos que no estaban en ninguna de las posiciones superiores de la lista se omitieron de la tabla.

Diseño y conjugación de un sustrato FRET escindible por una proteasa de MRSA *in vitro*:

Se diseñó un péptido y se sintetizó usando los residuos más frecuentes en los péptidos escindidos a partir de la selección REPLi, usando información sobre especificidad para P1, P2 y P3. El péptido tiene la secuencia GGAFAGGG (SEC. ID NRO.: 126), con escisión esperada entre GGAFA (SEC. ID NRO.: 131) y GGG. El péptido se sintetizó usando síntesis de fase sólida, incorporando tinciones fluorescentes, tetrametilrodamina (TAMRA) y fluoresceína como par de FRET

(Figura 26) con ácido maleimido–propiónico agregado al término N para permitir la conjugación a los residuos de cisteína del anticuerpo. El péptido mal–FRET resultante, maleimido–propiónico (MP)–Lys(TAMRA)–Gly–Gly–Ala–Phe–Ala–Gly–Gly–Gly–Lys(fluoresceína) ("péptido central" divulgado como SEC. ID NRO.: 125), se conjugó al anticuerpo tioMab modificado con cisteína, tio–S4497. El péptido mal–FRET también se conjugó con tioMab anti–Her2 modificado por cisteína trastuzumab, un control que no se une.

El conjugado FRET tio–S4497–MP–K(Tamra)GGAFAGGGK(Fluoresceína) ("péptido central" divulgado como SEC. ID NRO.: 125) y el conjugado FRET de control que no se une, tio–trastuzumab–MP–K(Tamra)GGAFAGGGK(Fluoresceína) ("péptido central" divulgado como SEC. ID NRO.: 125), se incubaron con cultivos log fase de Wood46 (Figura 28) el tipo salvaje, USA300 (Figura 29), a densidades celulares de 10^8 células/ml y 10^7 células/ml en caldo de soja tríptico (TSB). La concentración final de MP–Lys(TAMRA)–Gly–Gly–Ala–Phe–Ala–Gly–Gly–Gly–Lys(fluoresceína) ("péptido central" divulgado como SEC. ID NRO.: 125) para todas las cavidades due de 2 µM. La fluorescencia se monitoreó en el tiempo a 37 °C, excitación λ 495 nm/ emisión λ 518 nm. Se observó un aumento de la fluorescencia con el conjugado de 4497–mal–péptido FRET en Wood46 y USA300, lo cual indica que el péptido FRET es escindido por una proteasa de *S. aureus* y que la proteasa está presente en ambas cepas. La unidad de ligador MP–K(Tamra)GGAFAGGGK(Fluoresceína) ("péptido central" divulgado como SEC. ID NRO.: 125) es escindida en Wood46 y USA300 cuando se conjuga con un anticuerpo que se une a *S. aureus*. La validación de la escisión de este ligador modelo en USA300 fue fundamental, debido a su relevancia para la cepa clínica de MRSA a la cual apuntaría un potencial conjugado terapéutico de anticuerpo–antibiótico (AAC). El conjugado FRET tio–S4497–MP–K(Tamra)GGAFAGGGK(Fluoresceína) (“péptido central”

divulgado como SEC. ID NRO.: 125) muestra un aumento de la fluorescencia en ambas cepas, lo cual indica que el ligador es escindido por una proteasa de *S. aureus* y que la proteasa está presente en la cepa clínicamente relevante de MRSA, USA300. La densidad celular afecta la velocidad de escisión, la cual se produce más temprano en cultivos de mayor densidad celular. El conjugado de control sin unión tio–trastuzumab–MP–K(Tamra)GGAFAGGGK(Fluoresceína) (“péptido central” divulgado como SEC. ID NRO.: 125) no mostró un aumento de la fluorescencia en ninguna condición evaluada.

Sobre la base del sustrato escindido a partir de los ensayos celulares, el intermediario ligador–antibiótico LA–59 (Tabla 2) se preparó y se conjugó con anticuerpos para formar tio–S4497 (AAC–113) y tio–S4462 (AAC–114) anti–MRSA de cadena pesada, modificado con cisteína, y tio–trastuzumab anti–HER2 de cadena liviana (AAC–115) de la Tabla 3. El AAC ligado a GGAFAGGG (SEC. ID NRO.: 126) demostró mejores índices de escisión que el péptido FRET cuando se incubó con sobrenadante concentrado de un cultivo de Wood46 durante toda la noche, lo cual indica que el ligador–antibiótico es un mejor sustrato para la proteasa desconocida de interés. La escisión se produjo en el sitio esperado entre alanina y glicina en el AAC ligado a GGAFAGGG (“péptido central” divulgado como SEC. ID NRO.: 126) (AAC–113, AAC–114, AAC–115). Este ligador–antibiótico (LA–59) no es un sistema de entrega optimizado para el antibiótico, porque luego de la escisión, se libera GGG–rifamicina y no rifamicina libre. Aunque el potencial terapéutico de este ligador–antibiótico puede ser incierto, su capacidad para ser eficientemente escindido por la proteasa lo convierte en un compuesto herramienta útil para identificar fracciones que contienen la proteasa activa de interés. El intermediario ligador–antibiótico LA–59 se conjugó con la porción Fab del anticuerpo tio–S4497 (Scheer, J. M., W. Sandoval, *et al.* (2012). PloS one 7(12): e51817). Los anticuerpos Fab modificados con cisteína,

"tioFABs", tienen una cisteína reactiva que permite la conjugación sitio–específica de un compuesto tiol–reactivo. Se hizo reaccionar tioFAB S–4497 con un exceso molar de 3 veces de LA–59 respecto de tioFAB durante 1 h. en 50 mM de TRIS, pH 7,5, 150 mM de NaCl a temperatura ambiente. El exceso de LA–59 se separó del AAC por diafiltración en PBS. El conjugado resultante, tioFAB S4497–MC–GGAFAGGG–(pipBOR) (“péptido central” divulgado como SEC. ID NRO.: 126) (Figura 27), se usó como compuesto herramienta para identificar fracciones activas, con escisión del ligador detectada por análisis LC–MS.

Optimización de ligadores para una eficiente escisión por estafopaína B:

El intermediario de ligador–antibiótico LA–59, MC–GGAFAGGG–(pipBOR) (“péptido central” divulgado como SEC. ID NRO.: 126), tiene residuos de sustrato optimizados para las posiciones P1, P2 y P3. Usando los resultados de la selección REPLi, se diseñaron dos nuevos ligadores y se sintetizaron incorporando una preferencia de residuo por P4 (Figura 30). Maleimido–propiónico–Leu–Ala–Phe–Ala–Ala (“péptido central” divulgado como SEC. ID NRO.: 136) and maleimido–propiónico–Leu–Ala–Phe–Gly–Ala (“péptido central” divulgado como SEC. ID NRO.: 135) se sintetizaron usando síntesis de fase sólida. La isoleucina y la leucina fueron los residuos más frecuentes en P4 en la selección REPLi (sin tener en cuenta la glicina). Sólo un residuo, leucina, fue seleccionado para limitar el número de ligadores sintetizados. Ala y Gly fueron alternados en la posición P1 para examinar el efecto sobre la escindibilidad. También se incluyó un residuo en P1’, Ala. Se agregó QSY®7 (xantilio, 9–[2–[[4–[[(2,5–dioxo–1–pirrolidinil)oxi]carbonil]–1–piperidinil]sulfonil]fenil]–3,6–bis(metilfenilamino)–NHS éster, cloruro, CAS Reg. Nro. 304014–12–8, Life Technologies) al término C de ambos ligadores para actuar como reemplazo de antibiótico (Figura 30). La incorporación de QSY®7 permitió evaluar la

escindibildiad de estos ligadores sin consumir antibióticos costosos y que implican gran trabajo.

Los ligadores experimentales mal–péptido–QSY7 se conjugaron con THIOFAB S4497 para evaluar la escindibilidad de estos ligadores. Las conjugaciones se realizaron como se describió previamente. Los conjugados de THIOFAB S4497 ligador–QSY7 resultantes fueron evaluados en cuando a la escindibilidad por estafopaína B, estafopaína A y catepsina B humana a pH 7,2 (Tabla 5). Al igual que la estafopaína B, la estafopaína A es una cisteína proteasa secretada de *S. aureus* de la familia papaína de las proteasas. Es estructuralmente similar a la estafopaína B, pero tiene una especificidad de sustrato más amplia (Filipek, R., M. Rzychon, *et al.* (2003). The Journal of Biological Chemistry 278(42): 40959–40966). La catepsina B, una proteasa lisosomal de cisteína de mamífero, también es miembro de la familia papaína de las endopeptidasas. Se cree que escinde los ligadores de valina–citrulina usados en otros ligadores de AAC descritos en esta patente.

Tabla 5. Escisición de ligadores optimizados por estafopaínas y catepsina B humana

		Estafopaína A	Estafopaína B	Catepsina B
MP–LAFGA–QSY7 (“péptido central” divulgado como SEC. ID NRO.: 135) (Figura 30)	Porcentaje de escisión pH 7,2	38	100	100
	Producto de escisión	A–QSY7	A–QSY7	A–QSY7
MP–LAFAA–QSY7 (“péptido central” divulgado como SEC. ID NRO.: 136) (Figura 30)	Porcentaje de escisión pH 7,2	23	100	100
	Producto de escisión	A–QSY7	A–QSY7	A–QSY7, QSY7
MP–LAFG–PABC–(piperazinoBOR) (“péptido central” divulgado como SEC. ID NRO.:	Porcentaje de escisión pH 5	100	100	100

128) LA–104				
	Porcentaje de escisión pH 7,2	46	100	64
	Producto de escisión	piperazino–rifamicina	piperazino–rifamicina	

La Tabla 5 muestra datos de la escisión de ligadores optimizados conjugados con tioFAB por estafopaína A, estafopaína B y catepsina B. El ligador–antibiótico final, MP–LAFG–piperazino–rifamicina ("péptido central" divulgado como SEC. ID NRO.: 128) es escindido eficientemente por las tres proteases. La escisión por las estafopaínas da como resultado la liberación de rifamicina libre. La escisión por catepsina B libera Phe–Gly–piperazino–rifamicina (Ejemplo 26).

Diseño y conjugación de un ligador escindible por estafopaína B que libera antibiótico libre:

A partir de los ensayos de escisión de los ligadores experimentales evaluados, se seleccionó mal–LAFGA ("péptido central" divulgado como SEC. ID NRO.: 135) para la unión de antibiótico. Se requirió una optimización adicional de este ligador para alcanzar la liberación de antibiótico libre tras la escisión proteolítica. Para lograrlo, Ala en P1' se reemplazó por p–aminobencilo (PAB) o p–aminobenciloxicarbonilo (PABC). Se agregó piperazino–rifamicina al término C de este ligador para completar los intermediarios de ligador–antibiótico LA–88 MC–LAFG–PAB–(dimetilamino–3–pirroloBOR) ("péptido central" divulgado como SEC. ID NRO.: 128) y LA–104, MP–LAFG–PABC–(piperazinoBOR) ("péptido central" divulgado como SEC. ID NRO.: 128). Tras la escisión luego de Gly en la

posición P1, los grupos PAB y PABC se diseñan para auto–inmolarse y liberar antibiótico libre. LA–88 se conjugó para formar tio–S4497–v8–LCV205C–MC–LAFG–PAB–(dimetilamino–3–pirroloBOR) AAC–163 (“péptido central” divulgado como SEC. ID NRO.: 128) (Tabla 3). LA–104 se conjugó para formar AAC–193, AAC–215 y AAC–222. Los ensayos de escisión de AAC 193 con estafopaína A, estafopaína B y catepsina B se realizaron a pH 7,2 y pH 5. Estos valores de pH se seleccionaron para imitar el plasma (pH 7,2) o el entorno del fagolisosoma (pH 5). La estafopaína B alcanzó un 100% de escisión a pH 5 y 7,2. La estafopaína A mostró un 100% de escisión a pH5 y un 64% de escisión a pH 7,2.

La sustitución de Ala por PABC en el grupo P1’ cambió la ubicación en la cual la catepsina B escinde el ligador. Tras la escisión por catepsina B, se liberó Phe–Gly–PABC–(piperazinoBOR). Como agente terapéutico, la potencial escisión de este ligador por catepsina B muy probablemente se produzca en el compartimiento lisosomal de los macrófagos. En estas circunstancias, otras proteasas, incluida la estafopaína B, pueden procesar adicionalmente FG–PABC–piperazino–rifamicina para liberar el antibiótico libre.

El intermediario de ligador–antibiótico, MP–LAFG–PABC–(piperazinoBOR) (“péptido central” divulgado como SEC. ID NRO.: 128) LA–104 se conjugó con tioMAB S4497 para evaluar la eficacia *in vitro* e *in vivo* de los AAC resultantes AAC–193, AAC–215 y AAC–222. También se prepararon dos conjugados de control por conjugación de LA–104 con tioMAB anti–Her2 y tioMAB anti–gD, ambos controles de isotipo. El conjugado tioMAB 4497 MP–LAFG–PABC–piperazino–rifamicina ligado de cadena liviana (“péptido central” divulgado como SEC. ID NRO.: 128) AAC–215 tuvo una relación fármaco a anticuerpo (DAR) de 1,6, al igual que el conjugado de control tioMAB anti–gD. El conjugado de tioMAB anti–Her2 mal–LAFG–PABC–piperazino–rifamicina (“péptido central” divulgado como SEC. ID NRO.: 128) tuvo una DAR de 1,5.

El sobrenadante del cultivo de *S. aureus* se analizó usando una biblioteca de péptidos FRET para identificar sustratos fácilmente escindibles por proteasas secretadas. Los resultados de este análisis mostraron que la abrumadora mayoría de la actividad de proteasa medida se puede atribuir a una cisteína proteasa secretada de *S. aureus,* estafopaína B. Los ligadores peptídicos diseñados para la escisión por estafopaína B fueron optimizados y se identificó un sustrato eficientemente escindido que liberaba antibiótico libre. El ligador resultante también es escindido por la proteasa de *S. aureus* estafopaína A y la proteasa catepsina B humana, ambas también cisteína proteasas.

Cuando se conjuga con un anticuerpo que se une con *S. aureus*, el AAC resultante muestra eficacia tanto *in vitro* como *in vivo.* Las endopeptidasas endógenas de MRSA proporcionan un mecanismo para apuntar a las infecciones por MRSA y liberar la carga útil de manera específica para la enfermedad. La capacidad de este ligador para ser escindido por proteasas secretadas de *S. aureus* permite apuntar a MRSA presentes en neutrófilos humanos, tanto como extracelularmente en plasma o tejido del huésped. Este blanco dual puede permitir la liberación de una alta concentración de antibiótico en los sitios tanto intra– como extra–celulares de infección.

La expresión de estafopaína A y B está sobrerregulada en los neutrófilos humanos, y se cree que son importantes factores de virulencia (Burlak, C., *et al.* (2007) Cellular Microbiology 9(5):1172–1190), lo que las convierte en atractivos blancos para la liberación de antibiótico mediada por proteasa. La catepsina B humana también escinde el ligador, lo cual presenta una vía alternativa de liberación. La eficacia observada del AAC probablemente sea el resultado de múltiples proteasas, tanto de *S. aureus* como del huésped, involucradas en la liberación de antibióticos o restos de antibióticos. Un ligador estable en suero que

es escindido por una variedad de proteasas proporciona un mecanismo de liberación que puede superar las mutaciones de resistencia de la bacteria.

MÉTODOS PARA TRATAR Y PREVENIR INFECCIONES CON CONJUGADOS DE ANTICUERPO–ANTIBIÓTICO

Los AAC de la invención son útiles como agentes antimicrobianos efectivos contra un número de bacterias Gram–positivas humanas y veterinarias, que incluyen los estafilococos, por ejemplo *S. aureus, S. saprophyticus* y *S. simulans;* listeria, por ejemplo *Listeria monocytogenes*; enterococos, por ejemplo *E. faecalis*; estreptococos, por ejemplo *S. pneumoniae*; clostridium, por ejemplo *C. difficile*.

La bacteremia persistente puede ser causada por la internalización en las células huésped. Aunque no se comprende en su totalidad, los patógenos internalizados son capaces de escapar al reconocimiento inmunológico sobreviviendo dentro de las células huésped. Dichos organismos incluyen *S. aureus*, *Salmonella* (por ejemplo, *S. typi*, *S. choreraesuis* y *S. enteritidis*), *Legionella (*por ejemplo*, L. pneumophila)*, *Listeria (*por ejemplo*, L. monocytogenes)*, *Brucella* (por ejemplo*, B. abortus, B. melitensis, B. suis*), *Chlamydia* (*C. pneumoniea*, *C. trachomati*), *Rickettsia spp*., *Shigella* (por ejemplo*, S. flexneri*) y *mycobacteria*.

Luego del ingreso en el torrente sanguíneo, *S. aureus* puede causar infección metastásica en casi cualquier órgano. Se producen infecciones secundarias en aproximadamente un tercio de los casos antes del comienzo de la terapia (Fowler *et al*., (2003) Arch. Intern. Med. 163:2066–2072), e incluso en el 10% de los pacientes luego del comienzo de la terapia (Khatib *et al*., (2006) Scand. J. Infect. Dis., 38:7–14). Los sellos distintivos de las infecciones son grandes reservorios de pus, destrucción de tejidos y la formación de abcesos (todos los cuales contienen grandes cantidades de neutrófilos). Aunque sólo

aproximadamente el 5% de los pacientes desarrollan complicaciones si la bacteremia se extingue dentro de las 48 horas, los niveles se elevan al 40% si la bacteremia persiste más allá de los 3 días.

Aunque *S. aureus* generalmente se considera un patógeno extracelular que secreta toxinas, existe evidencia que señala que puede sobrevivir dentro de células endoteliales, queratinocitos, fibroblastos y osteoclastos (Alexander *et al*, (2001) Appl. Microbiol. Biotechnol. 56:361–366; Garzoni *et al*, (2009) Trends Microbiol. 17:59–65). Los neutrófilos y macrófagos son componentes clave de la respuesta inmune innata del huésped a la infección bacteriana. Estas células internalizan *S. aureus* por fagocitosis, lo cual puede ser mejorado por el anticuerpo, complemento o lectinas del huésped tales como proteínas de unión a manosa, que se pueden unir simultáneamente a patógenos y neutrófilos, macrófagos, y otros fagocitos profesionales. Como se mencionó anteriormente, *S. aureus* no sólo sobrevive en el ambiente lisosomal sino que puede de hecho explotarlo como mecanismo para desarrollar persistencia en el huésped.

Los conjugados de anticuerpo–antibiótico (AAC) de la invención tienen significativas ventajas terapéuticas para el tratamiento de patógenos intracelulares, incluidos aquellos que residen en los fagolisosomas. En una forma de realización, el patógeno es internalizado en células leucocitos, y el componente intracelular es un fagolisosoma. En un AAC intacto, la región variable del anticuerpo se une a un antígeno de superficie celular sobre la bacteria (opsonización). Sin limitarse a ninguna teoría, en un mecanismo, a través del componente anticuerpo del AAC que se une a la superficie celular bacteriana, los fagocitos son atraídos a la bacteria. La porción Fc del anticuerpo se une a un receptor Fc en el fagocito, lo cual facilita la fagocitosis. Luego de que el completo AAC–bacteria es fagocitado, tras la fusión al lisosoma, el ligador del AAC es escindido por exposición a enzimas fagolisosomales, lo cual libera un antibiótico

activo. Debido al espacio confinado y a la concentración de Abx local relativamente alta (aproximadamente 10^4 por bacteria), el resultado es que el fagolisosoma ya no soporta la supervivencia del patógeno intracelular (Figura 5). Dado que el AAC es esencialmente un profármaco inactivo, el índice terapéutico del antibiótico puede extenderse respecto de la forma libre (no conjugada). El anticuerpo proporciona un blanco patógeno–específico, mientras que el ligador escindible es escindido en condiciones específicas para la ubicación intracelular del patógeno. El efecto puede ser directamente sobre el patógeno opsonizado, así como otros patógenos que están co–localizados en el fagolisosoma. En un aspecto específico, el patógeno es *S. aureus*.

La tolerancia a los antibióticos es la capacidad de un patógeno causante de enfermedad de resistir la acción destructora de los antibióticos y otros agentes antimicrobianos, y es mecanísticamente distinta de la resistencia a múltiples fármacos (Lewis K (2007). *"Persister cells, dormancy and infectious disease"*. Nature Reviews Microbiology 5 (1): 48–56. doi:10.1038/nrmicro1557). En cambio, esta forma de tolerancia es causada por una pequeña subpoblación de células microbianas llamados “persistores” (Bigger JW (14 de octubre de 1944). *"Treatment of staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilization".* Lancet 244 (6320): 497–500). Estas células no son resistentes a múltiples fármacos en el sentido clásico, sino que en cambio son células latentes que son tolerantes al tratamiento con antibióticos que pueden matar a sus pares genéticamente idénticos. Esta tolerancia a los antibióticos es inducida por un estado fisiológico que no se divide o que se divide en forma extremadamente lenta. Cuando el tratamiento antimicrobiano no logra erradicar estas células persistoras, se transforman en un reservorio para las infecciones crónicas recurrentes. Los conjugados de anticuerpo–antibiótico de la invención abarcan

una propiedad única para matar estas células persistoras y suprimir la emergencia de poblaciones bacterianas tolerantes a múltiples fármacos.

En otra forma de realización, el AAC de la invención se puede usar para tratar una infección independientemente del compartimiento intracelular en el cual sobrevive el patógeno.

En otra forma de realización, los AAC también se podrían usar para apuntar a bacterias en forma planktónica o de biopelícula (por ejemplo, *S. aureus, K. pneumonia, E. coli, A. baumannii, P. aeruginosa* y *Enterobacteriaceae*) por opsonización mediada por anticuerpo, lo cual conduce a la internalización por parte de fagocitos profesionales. Cuando el fagosoma se fusiona con un lisosoma, se liberan concentraciones suficientemente elevadas de antibiótico libre desde el AAC en el entorno ácido o proteolítico del fagolisosoma para matar el patógeno fagocitado.

Los métodos para tratar infecciones con conjugados de anticuerpo–antibiótico (AAC) de la invención incluyen el tratamiento de infecciones pulmonares bacterianas, tales como infecciones de neumonía o tuberculosis por *S. aureus*, infecciones oculares bacterianas, tales como tracoma y conjuntivitis, infecciones de corazón, cerebro o piel, infecciones del tracto gastrointestinal, tales como diarrea del viajero, osteomielitis, colitis ulcerosa, síndrome de intestino irritable (IBS), enfermedad de Crohn e IBD (enfermedad intestinal inflamatoria) en general, meningitis bacteriana, y abscesos en cualquier órgano, tal como músculos, hígado, meninges o pulmón. Las infecciones bacterianas puede ser en otras partes del cuerpo, como el tracto urinario, el torrente sanguíneo, una herida o un sitio de inserción de catéter. Los AAC de la invención son útiles para las infecciones difíciles de tratar que involucran biopelículas, implantes o sitios santuarios (por ejemplo, osteomielitis e infecciones articulares protésicas), e

infecciones con alta mortalidad, tales como neumonía y bacteremia intrahospitalarias.

Los grupos de pacientes vulnerables que se pueden tratar para prevenir la infección por *Staphylococcal aureus* incluyen pacientes en hemodiálisis, pacientes inmuno–comprometidos, pacientes internados en terapia intensiva y ciertos pacientes quirúrgicos. En otro aspecto, la invención proporciona un método para matar, tratar o prevenir una infección microbiana en un animal, preferentemente un mamífero y con máxima preferencia un ser humano, que incluye administrar al animal un AAC o una formulación farmacéutica de un AAC de la invención. La invención además se refiere al tratamiento o la prevención de enfermedades asociadas con dichas infecciones microbianas o causadas en forma oportunista por ellas. Dichos métodos de tratamiento o prevención pueden incluir la administración oral, tópica, intravenosa, intramuscular o subcutánea de una composición de la invención. Por ejemplo, antes de la cirugía o de la inserción de un catéter IV, en la unidad de terapia intensiva, en la medicina de trasplantes, con la quimioterapia antineoplásica o luego de ésta, u otras actividades que implican un alto riesgo de infección, se puede admnistrar el AAC de la invención para prevenir el inicio o la diseminación de la infección.

La infección bacteriana puede ser causada por una bacteria con una forma activa e inactiva, y el AAC se administra en una cantidad y durante un período suficientes para tratar la forma latente tanto activa como inactiva de la infección bacteriana, donde la duración es mayor a la necesaria para tratar la forma activa de la infección bacteriana.

El análisis de diversas bacterias Gram+ halló WTA beta expresado en todas las *S. aureus*, incluidas las cepas MRSA y MSSA, así como cepas no *aureus Staph* tales como *S. saprophyticus* y *S. simulans*. WTA alfa (Alfa–GLcNAc ribitol WTA) está presente en la mayoría, pero no en todas, las *S. aureus*, y

también está presente en *Listeria monocytogenes*. WTA no está presente en bacterias Gram–. Por lo tanto, un aspecto de la invención consiste en un método para el tratamiento de un paciente infectado con *S. aureus* o *S. saprophyticus* o *S. simulans* mediante la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un AAC anti–WTA beta de la invención. Otro aspecto de la invención consiste en un método para el tratamiento de un paciente infectado con *S. aureus* o *Listeria monocytogenes* mediante la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un AAC anti–WTA alfa de la invención. La invención también contempla un método para prevenir infecciones por *S. aureus* o *S. saprophyticus* o *S. simulans* mediante la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un AAC anti–WTA beta de la invención en entornos hospitalarios, tales como cirugía, pacientes con quemaduras y trasplante de órganos.

El paciente que necesita tratamiento para una infección bacteriana, según lo determine un médico especializado en el arte, ya puede haber recibido un diagnóstico –aunque no necesiariamente– del tipo de bacteria con la cual se ha infectado. Dado que el paciente que padece una infección bacteriana puede empeorar su estado con mucha rapidez, en cuestión de horas, tras su internación el paciente puede recibir los AAC anti–WTA de la invención junto con uno o varios Abx estándar de referencia, tales como vancomicina. Cuando los resultados del diagnóstico están disponibles e indican la presencia de, por ejemplo, *S. aureus* en la infección, el paciente puede continuar con el tratamiento con el AAC anti–WTA. Por lo tanto, en una forma de realización del método de tratamiento de una infección bacteriana o, específicamente, una infección por *S. aureus*, el paciente recibe una cantidad terapéuticamente efectiva de un AAC anti–WTA beta.

En los métodos de tratamiento o prevención de la presente invención, un AAC de la invención se puede administrar como el único agente terapéutico o en conjunción con otros agentes, tales como aquellos descritos a continuación.

Los AAC de la invención muestran superioridad respecto de la vancomicina en el tratamiento de MRSA en modelos preclínicos. La comparación de AAC con el SOC se puede realizar, por ejemplo, a través de una reducción de la tasa de mortalidad. El paciente que es tratado deberá ser evaluado en cuanto a su responsividad al tratamiento con el AAC a través de una variedad de factores medibles. Los ejemplos de los signos y síntomas que los médicos podrían usar para evaluar la mejoría de sus pacientes incluyen los siguientes: normalización del recuento de glóbulos blancos si estaban elevados en el diagnóstico, normalización de la temperatura corporal si estaba elevada (fiebre) al momento del diagnóstico, eliminación en cultivos sanguíneos, mejoría visual de la herida, lo que incluye menos eritema y drenaje de pus, reducción de los requisitos de ventilación, tales como la necesidad de menos oxígeno o una menor velocidad de ventilación en un paciente que es ventilado, salida del estado de ventilación por completo si el paciente es ventilado al momento del diagnóstico, uso de menos medicaciones para mantener una presión arterial estable si estas medicaciones se requerían al momento del diagnóstico, normalización de las anormalidades de laboratorio que sugieren una falla de órgano final, tal como un nivel elevado de creatinina o de las pruebas de la función hepática si eran anormales al momento del diagnóstico, y mejora en las imágenes radiológicas (por ejemplo, una radiografía de tórax que previamente sugería neumonía muestra resolución). En un paciente de Terapia Intensiva, estos factores podrían medirse al menos diariamente. La fiebre se monitorea de cerca, así como los glóbulos blancos con recuento absoluto de neutrófilos, al igual que la evidencia que indica que una

"desviación a la izquierda" (aparición de blastos que indican una mayor producción de neutrófilos en respuesta a una infección activa) se ha resuelto.

En el contexto de los presentes métodos de tratamiento de la invención, un paciente con una infección bacteriana se considera para tratar si existe una significativa mejoría medible, según la evaluación del médico especializado en el arte, en al menos dos o más de los factores precedentes en comparación con los valores, signos o síntomas antes o al inicio del tratamiento o al momento del diagnóstico. En algunas formas de realización, existe una mejoría medible en 3, 4, 5, 6 o más de los factores antes mencionados. En algunas formas de realización, la mejoría en los factores medidos es de al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 100% en comparación con los valores previos al tratamiento. Típicamente, un paciente se puede considerar completamente tratado de la infección bacteriana (por ejemplo, una infección por *S. aureus*) si las mejorías medibles del paciente incluyen lo siguiente: i) repetición de cultivos sanguíneos o tisulares (típicamente varios) que no muestran la bacteria que se identificara originalmente; ii) fiebre normalizada; iii) glóbulos blancos normalizados; y iv) evidencia de que la falla de órgano final (pulmón, hígado, riñón, colapso vascular) se ha resuelto ya sea completa o parcialmente dadas las comorbilidades preexistentes que presentaba el paciente.

Dosificación

En cualquiera de los anteriores aspectos, al tratar a un paciente infectado, la dosis de un AAC normalmente es de aproximadamente 0,001 a 1000 mg/kg/día. En una forma de realización, el paciente con una infección bacteriana es tratado con una dosis de AAC en el rango de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg, típicamente de aproximadamente 5 mg/kg a aproximadamente 90 mg/kg, más específicamente de 10 mg/kg a 50 mg/kg. El

AAC se puede administrar diariamente (por ejemplo, una dosis simple de 5 a 50 mg/kg/día) o menos frecuentemente (por ejemplo, una dosis única de 5, 12,5 ó 25 mg/kg/semana). Una dosis se puede dividir en 2 días, por ejemplo, 25 mg/kg un día y 25 mg/kg al día siguiente. El paciente puede recibir una dosis entre una vez cada 3 días (q3D), de una vez por semana a semana por medio (qOW), durante un lapso de 1–8 semanas. En una forma de realización, el paciente recibe un AAC de la invención por vía IV una vez por semana durante 2–6 semanas junto con el tratamiento de referencia estándar (SOC) para tratar la infección bacteriana, tal como una infección por *staph A*. La duración del tratamiento estará determinada por la condición del paciente o el alcance de la infección, por ejemplo, una duración de 2 semanas para una bacteremia no complicada o 6 semanas para una bacteremia con endocarditis.

En una forma de realización, se administra un AAC en una dosis inicial de 2,5 a 100 mg/kg durante uno a siete días consecutivos, seguidos por una dosis de mantenimiento de 0,005 a 10 mg/kg una vez cada uno a siete días durante un mes.

Vía de administración

Para el tratamiento de las infecciones bacterianas, los AAC de la invención se pueden administrar en cualquiera de las dosis precedentes por vía intravenosa (i.v.) o subcutánea. En una forma de realización, el WTA–AAC se administra por vía intravenosa. En una forma de realización específica, el WTA–AAC administrado por vía i.v. es un AAC WTA–beta, más específicamente, en donde el anticuerpo WTA–beta es uno seleccionado del grupo de Abs con las secuencias de aminoácidos divulgadas en la Figura 14, Figura 15A, Figura 15B, Figura 16A y Figura 16B.

Terapia de combinación

Un AAC se puede administrar junto con uno o varios agentes adicionales, por ejemplo, un segundo agente terapéutico o profiláctico, según corresponda y lo determine el médio que trata al paciente.

En una forma de realización, el segundo antibiótico administrado en combinación con el compuesto conjugado de anticuerpo–antibiótico de la invención se selecciona de las siguientes clases estructurales: (i) aminoglucósidos; (ii) beta–lactámicos; (iii) péptidos macrólidos/cíclicos; (iv) tetraciclinas; (v) fluoroquinolinas/ fluoroquinolonas; (vi) y oxazolidinonas. Véase: Shaw, K. y Barbachyn, M. (2011) Ann. N.Y. Acad. Sci. 1241:48–70; Sutcliffe, J. (2011) Ann. N.Y. Acad. Sci. 1241:122–152.

En una forma de realización, el segundo antibiótico administrado en combinación con el compuesto conjugado de anticuerpo–antibiótico de la invención se selecciona de clindamicina, novobiocina, retapamulina, daptomicina, GSK–2140944, CG–400549, sitafloxacina, teicoplanina, triclosano, naptiridona, radezolid, doxorrubicina, ampicilina, vancomicina, imipenem, doripenem, gemcitabina, dalbavancina y azitromicina.

Los ejemplos adicionales de estos otros agentes terapéuticos o profilácticos son agentes antiinflamatorios (por ejemplo, antiinflamatorios no esteroides (AINE; por ejemplo, detoprofeno, diclofenac, diflunisal, etodolac, fenoprofeno, flurbiprofeno, ibuprofeno, indometacina, ketoprofeno, meclofenameato, ácido mefenámico, meloxicam, nabumeona, naproxeno sódico, oxaprozina, piroxicam, sulindac, tolmetin, celecoxib, rofecoxib, aspirina, colina salicilato, salsalto, y salicilato de sodio y magnesio) y esteroides (por ejemplo, cortisona, dexametasona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisolona, prednisona, triamcinolona)), agentes antibacterianos (por ejemplo, azitromicina, claritromicina, eritromicina, gatifloxacina, levofloxacina, amoxicilina, metronidazol,

penicilina G, penicilina V, meticilina, oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina, nafcilina, ampicilina, carbenicilina, ticarcilina, mezlocilina, piperacilina, azlocilina, temocilina, cepalotina, cefapirina, cefradina, cefaloridina, cefazolina, cefamandol, cefuroxima, cefalexina, cefprozilo, cefaclor, loracarbef, cefoxitina, cefmatozol, cefotaxima, ceftizoxima, ceftriaxona, cefoperazona, ceftazidima, cefixima, cefpodoxima, ceftibuteno, cefdinir, cefpirome, cefepime, BAL5788, BAL9141, imipenem, ertapenem, meropenem, astreonam, clavulanato, sulbactam, tazobactam, estreptomicina, neomicina, kanamicina, paromicina, gentamicina, tobramicina, amikacina, netilmicina, espectinomicina, sisomicina, dibekalina, isepamicina, tetraciclina, clortetraciclina, demeclociclina, minociclina, oxitetraciclina, metaciclina, doxiciclina, telitromicina, ABT–773, lincomicina, clindamicina, vancomicina, oritavancina, dalbavancina, teicoplanina, quinupristina y dalfopristina, sulfanilamida, ácido para–aminobenzoico, sulfadiazina, sulfisoxazol, sulfametoxazol, sulfatalidina, linezolid, ácido nalidíxico, ácido oxolínico, norfloxacina, perfloxacina, enoxacina, ofloxacina, ciprofloxacina, temafloxacina, lomefloxacina, fleroxacina, grepafloxacina, esparfloxacina, trovafloxacina, clinafloxacina, moxifloxacina, gemifloxacina, sitafloxacina, daptomicina, garenoxacina, ramoplanina, faropenem, polimixina, tigeciclina, AZD2563 o trimetoprima), anticuerpos antibacterianos incluidos anticuerpos contra el mismo antígeno o uno diferente del Ag al que apunta el AAC, inhibidores de la agregación plaquetaria (por ejemplo, abciximab, aspirina, cilostazol, clopidogrel, dipiridamol, eptifibatida, ticlopidina o tirofiban), anticoagulantes (por ejemplo, dalteparina, danaparoid, enoxaparina, heparina, tinzaparina o warfarina), antipiréticos (por ejemplo, acetaminofeno), o agentes hipolipemiantes (por ejemplo, colestiramina, colestipol, ácido nicotínico, gemfibrozilo, probucol, ezetimiba, o estatinas tales como atorvastatina, rosuvastatina, lovastatina simvastatina, pravastatina, cerivastatina y fluvastatina). En una forma de

realización, el AAC de la invención se administra en combinación con el tratamiento estándar de referencia (SOC) para *S. aureus* (incluidas cepas resistentes a la meticilina y sensibles a la meticilina). La MSSA usualmente se trata con nafcilina o oxacilina, y la MRSA típicamente se trata con vancomicina o cefazolina.

Estos agentes adicionales se pueden administrar dentro de los 14 días, 7 días, 1 día, 12 horas o 1 hora de la administración de un AAC, o simultáneamente con éste. Los agentes terapéuticos adicionales pueden estar presentes en la misma composición farmacéutica o en una diferente respecto del AAC. Cuando están presentes en composiciones farmacéuticas diferentes, se pueden emplear distintas vías de administración. Por ejemplo, un AAC se puede administrar por vía intravenosa o subcutánea, mientras que un segundo agente se puede administrar por vía oral.

FORMULACIONES FARMACÉUTICAS

La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que contienen el AAC, y métodos para tratar una infección bacteriana usando las composiciones farmacéuticas que contienen el AAC. Dichas composiciones pueden comprender además excipientes adecuados, tales como excipientes (portadores) farmacéuticamente aceptables, que incluyen búfers, ácidos, bases, azúcares, diluyentes, conservantes y similares, que son bien conocidos en el arte y se describen en la presente. Los presentes métodos y composiciones se pueen usar solos o en combinaciones con otros métodos convencionales y/o agentes para tratar enfermedades infecciosas. En un aspecto, la invención además proporciona formulaciones farmacéuticas que comprenden al menos un anticuerpo de la invención y/o al menos un conjugado de anticuerpo–antibiótico (AAC) de éste. En algunas formas de realización, una formulación farmacéutica comprende 1) un anticuerpo de la invención y/o un AAC de éste, y 2) un portador

farmacéuticamente aceptable. En algunas formas de realización, una formulación farmacéutica comprende 1) un anticuerpo de la invención y/o un AAC de éste, y opcionalmente, 2) al menos un agente terapéutico adicional.

Las formulaciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo o AAC de la invención se preparan para su almacenamiento mezclando el anticuerpo o AAC que tiene el grado deseado de pureza con portadores, excipientes o estabilizantes fisiológicamente aceptables opcionales (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)) en forma de soluciones acuosas o liofilizadas u otras formulaciones secas. Los portadores, excipientes o estabilizantes aceptables son no tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas e incluyen búferes tales como fosfato, citrato, histidina y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluidos ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio); alcohol fenólico, butílico o bencílico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3–pentanol; y m–cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos, incluidos glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos de metales (por ejemplo, complejos de Zn–proteína); y/o surfactantes no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG). Las formulaciones farmacéuticas a usar para la administración *in vivo* son generalmente estériles, fácilmente obtenibles por filtración a través de membranas de filtración estériles.

Los ingredientes activos también se pueden atrapar en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli–(metilmetacilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se divulgan en *Remington's Pharmaceutical Sciences,* 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

Se pueden realizar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el anticuerpo o AAC de la invención, donde las matrices están en forma de artículos moldeados, por ejemplo, películas o una microcápsula. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2–hidroxietil–metacrilato) o poli(vinilalcohol)), poliláctidos (patente de EE.UU. Nro. 3.773.919), copolímeros de ácido L–glutámico y γ etil–L–glutamato, copolímeros no degradables de etileno–acetato de vinilo, copolímeros degradables de ácido láctico–ácido glicólico tales como LUPRON DEPOT™ (micoresferas inyectables compuestas por copolímero de ácido láctico–ácido glicólico y acetato de leuprolida) y ácido poli–D–(–)–3–hidroxibutírico. Aunque los polímeros tales como etileno–acetato de vinilo y ácido láctico–ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante menores períodos de tiempo. Cuando los anticuerpos o AAC encapsulados permanecen en el cuerpo durante un largo período, se pueden desnaturalizar o agregar como resultado de la exposición a la humedad a 37°C, lo cual da por resultado una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Se pueden diseñar estrategias racionales para la estabilización,

según el mecanismo involucrado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlaces S–S intermoleculares a través del intercambio de tio–disulfuro, la estabilización se puede lograr modificando los residuos de sulfhidrilo, liofilizando a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados y desarrollando composiciones de matrices poliméricas específicas.

Un anticuerpo se puede formular de cualquier forma adecuada para administrar a una célula o tejido objetivo. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden formular como liposomas, una pequeña vesícula compuesta por diversos tipos de lípidos, fosfolípidos y/o surfactantes que es útil para administrar un fármaco a un mamífero. Los componentes del liposoma comúnmente se disponen en formación bicapa, similar a la disposición lipídica de membranas biológicas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan mediante métodos conocidos en el arte, tales como los descritos en Epstein *et al*., (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:3688; Hwang *et al*., (1980) *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 77:4030; US 4485045; US 4544545; WO 97/38731; US 5013556.

Se pueden general liposomas particularmente útiles mediante el método de evaporación de fase inversa con una composición de lípidos que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivada de PEG (PEG–PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido hasta obtener liposomas del diámetro deseado. Los fragmentos Fab' del anticuerpo de la presente invención se pueden conjugar con los liposomas como se describe en Martin *et al*., (1982) *J. Biol. Chem.* 257:286–288 a través de una reacción de intercambio de disulfuro. Un agente quimioterapéutico está opcionalmente contenido dentro del liposoma (Gabizon *et al*., (1989) *J. National Cancer Inst.* 81(19):1484).

MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA DIAGNÓSTICO Y DETECCIÓN

En ciertas formas de realización, cualquiera de los anticuerpos provistos en la presente es útil para detectar la presencia de MRSA en una muestra biológica. El término “detectar”, según se usa en la presente, abarca la detección cuantitativa o cualitativa. Una “muestra biológica” comprende, por ejemplo, sangre, suero, plasma, tejido, esputo, aspirado, hisopado, etc.

En una forma de realización, se proporciona un anticuerpo anti–WTA para usar en un método de diagnóstico o detección. En otro aspecto, se proporciona un método para detectar la presencia de WTA en una muestra biológica. En ciertas formas de realización, el método comprende poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo anti–WTA, como se describe en la presente, en condiciones que permitan la unión del anticuerpo anti–WTA a WTA, y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo anti–WTA y WTA en la muestra biológica. Dicho método puede ser un método *in vitro* o *in vivo*. En una forma de realización, se usa un anticuerpo anti–MRSA para seleccionar sujetos elegibles para la terapia con un anticuerpo anti–MRSA, por ejemplo donde MRSA es un biomarcador para selección de pacientes.

En una forma de realización ilustrativa, se usa un anticuerpo anti–WTA *in vivo* para detectar, por ejemplo, por imágenes *in vivo*, una infección MRSA–positiva en un sujeto, por ejemplo, con el fin de diagnosticar, pronosticar o calificar el tratamiento de una infección, determinar el curso apropiado de la terapia, o monitorear la respuesta de la infección a la terapia. Un método conocido en el arte para la detección *in vivo* es la tomografía por emisión de inmuno–positrones (inmuno–PET), como se describe, por ejemplo, en van Dongen *et al*., (2007) The Oncologist 12:1379–1389 y Verel *et al*., (2003) J. Nucl. Med. 44:1271–1281. En dichas formas de realización, se proporciona un método para detectar una infección *Staph*–positiva en un sujeto, donde el método comprende administrar un anticuerpo anti–*Staph* marcado a un sujeto que tiene, o que se sospecha que

tiene, una infección *Staph*–positiva, y detectar el anticuerpo anti–*Staph* marcado en el sujeto, en donde la detección del anticuerpo anti–*Staph* marcado indica una infección *Staph*–positiva en el sujeto. En ciertas de esas formas de realización, el anticuerpo anti–*Staph* marcado comprende un anticuerpo anti–*Staph* conjugado con un emisor de positrones, tal como ^{68}Ga, ^{18}F, ^{64}Cu, ^{86}Y, ^{76}Br, ^{89}Zr y ^{124}I. En una forma de realización particular, el emisor de positrones es ^{89}Zr.

En otras formas de realización, un método de diagnóstico o detección comprende poner en contacto un primer anticuerpo anti–*Staph* inmovilizado en un sustrato con una muestra biológica a evaluar en cuanto a la presencia de *Staph*, exponer el sustrato a un segundo anticuerpo anti–*Staph*, y detectar si el segundo anticuerpo anti–*Staph* se une a un complejo entre el primer anticuerpo anti–*Staph* y *Staph* en la muestra biológica. El sustrato puede ser cualquier medio de soporte, por ejemplo, vidrio, metal, cerámica, perlas poliméricas, portaobjetos, chips y demás sustratos. En ciertas formas de realización, una muestra biológica comprende una célula o tejido (por ejemplo, material de biopsia, incluido tejido colorrectal, endometrial, pancreático u ovárico canceroso o potencialmente canceroso). En ciertas formas de realización, el primer o el segudo anticuerpo anti–*Staph* es cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente. En dichas formas de realización, el segundo anticuerpo anti–WTA puede ser los anticuerpos anti–WTA S4497, S4462, S6978, S4487, o anticuerpos derivados de ellos, como se describe en la presente.

Los ejemplos de trastornos que se pueden diagnosticar o detectar de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores incluyen infección MRSA–positiva, usando pruebas tales como inmunohistoquímica (IHC) o hibridación *in situ* (ISH). En algunas formas de realización, una infección *Staph*–positiva es una infección que expresa *Staph* de acuerdo con un ensayo de transcriptasa inversa–PCR (RT–PCR) que detecta el ARNm de *Staph.* En algunas

formas de realización, el RT–PCR es RT–PCR cuantitativo (Francois P y Schrenzel J (2008). "Rapid Diagnosis and Typing of Staphilococcus aureus". *Staphilococcus: Molecular Genetics*. Caister Academic Press; Mackay IM, ed. (2007)), y PCR en tiempo real ("*Real–Time PCR in Microbiology: From Diagnosis to Characterization*. Caister Academic Press).

En ciertas formas de realización, se proporcionan anticuerpos anti–ácido teicoico de pared (WTA) marcados. Las marcas incluyen, aunque no a modo de limitación, marcas o restos que son detectados directamente (tales como marcas fluorescentes, cromofóricas, de densidad de electrones, quimioluminiscentes y radioactivas), así como restos, tales como enzimas o ligandos, que son detectados indirectamente, por ejemplo, a través de una reacción enzimática o interacción molecular. Los ejemplos de marcas incluyen, aunque no a modo de limitación, los radioisótopos ^{32}P, ^{14}C, ^{125}I, ^{3}H y ^{131}I, fluoróforos tales como quelatos térreos raros o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, luceriferasas, por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana (US 4737456), luciferina, 2,3–dihidroftalazindionas, peroxidasa de rábano (HRP), fosfatasa alcalina, β–galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, oxidasas de sacáridos, por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa–6–fosfato deshidrogenasa, oxidasas heterocíclicas tales como uricasa y xantina oxidasa, acopladas con una enzima que emplea peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor de tinción, tal como HRP, lactoperoxidasa o microperoxidasa, biotina/avidina, etiquetas giratorias, etiquetas de bacteriófagos, radicales libres estables, y similares. En otra forma de realización, una marca es un emisor de positrones. Los emisores de positrones incluyen, aunque no a modo de limitación, ^{68}Ga, ^{18}F, ^{64}Cu, ^{86}Y, ^{76}Br, ^{89}Zr y ^{124}I. En una forma de realización particular, un emisor de positrones es ^{89}Zr.

Clínicamente, los síntomas de infecciones con MRSA son similares a aquellos de *Staphilococcus aureus* sensible a la meticilina (MSSA), e incluyen abscedos y celulitis. A menudo, los abscesos están acompañados por áreas de necrosis central. También son comunes los furúnculos, en particular en el contexto de un ataque de MRSA. Las lesiones también se pueden informar erróneamente como picaduras de arañas debido al enrojecimiento general que progresa a un centro neucrótico. Además, las infecciones pueden aparecer como impétigo, foliculitis, abscesos de asiento profundo, piomiositis, osteomielitis, fasciítis necrotizante, síndrome de shock tóxico estafilocóccico, neumonía y sepsis. Las infecciones sistémicas serias son más comunes entre personas con antecedentes de uso de fármacos inyectables, diabetes u otras afecciones con compromiso inmunológico.

Las opciones de tratamiento estándar para las infecciones por MRSA incluyen opciones mecánicas conservadoras, tales como: (i) remojos y compresas tibias, (ii) incisión y drenaje, y (iii) remoción del dispositivo extraño (por ejemplo, el catéter) que causa la infección. Para infecciones más serias, en especial aquellas que presentan celulitis, se prescriben antibióticos (Abx). Para las infecciones leves a moderadas, los antibióticos incluyen trimetoprima–sulfametoxazol (TMP–SMX), clindamicina, doxiciclina, minociclina, tetraciclinea, rifampina, vancomicina, linezolid. Típicamente, el régimen de tratamiento dura 5–10 días, con nuevos exámenes periódicos y evaluación tanto durante como después del período de tratamiento.

Las opciones de tratamiento adicionales incluyen la descolonización, en especial en el contexto en el cual el paciente experimenta infección recurrente o se encuentra en el ambiente en donde el brote de MRSA es constante. La descolonización es un procedimiento en el cual se remueve la flora que inhibe las narinas del paciente. Esto se realiza por aplicación tópica de ungüento de

mupirocina al 2% aplicado generosamente dentro de cada orificio nasal durante 5–10 días y limpieza tópica con gluconato de clorhexidina 4% durante 5 días.

ARTÍCULOS DE MANUFACTURA

En otro aspecto de la invención, se proporciona un artículo de manufactura que contiene materiales útiles para el tratamiento, la prevención y/o el diagnóstico de los trastornos descritos antes. El artículo de manufactura comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto en o asociado con el recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas, bolsas para solución IV, etc. Los recipientes se pueden formar de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es, en sí misma o combinada con otra composición, efectiva para tratar, prevenir y/o diagnosticar el trastorno, y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón que puede ser pinchado con una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo de la composición es un anticuerpo o inmunoconjugado de la invención. La etiqueta o el prospecto indica que la composición se usa para tratar la afección en cuestión. Más aún, el artículo de manufactura puede comprender (a) un primer recipiente con una composición allí contenida, en donde la composición comprende un anticuerpo o inmunoconjugado de la invención; y (b) un segundo recipiente con una composición allí contenida, en donde la composición comprende otro agente citotóxico o de otro modo terapéutico. El artículo de manufactura en esta forma de realización de la invención puede comprender además un prospecto que indica que las composiciones se pueden usar para tratar una afección particular. En forma alternativa o adicional, el artículo de manufactura puede comprender además un segundo (o terder) recipiente que comprende un búfer farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para uso inyectable (BWFI), solución salina con búfer de fosfato,

solución de Ringer o solución de dextrosa. Puede incluir también otros materiales deseables desde el punto de vista comercial y del usuario, incluidos otros búferes, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

EJEMPLOS

Los siguientes son ejemplos de métodos y composiciones de la invención. Se entiende que se pueden poner en práctica diversas otras formas de realización, dada la descripción general suministrada antes.

Ejemplo 1 MC–vc–PAB–pipBOR **51**

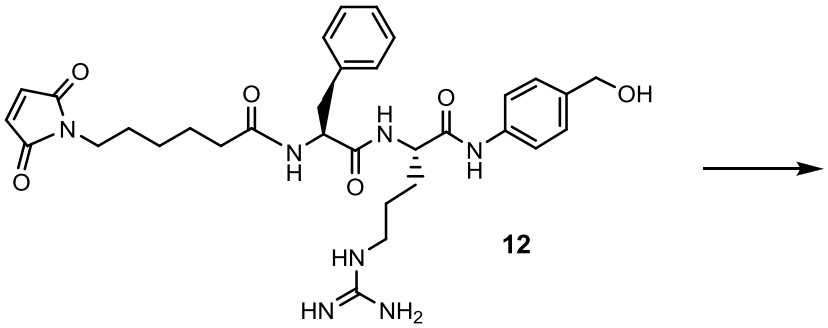
Se hidrogenó 2–nitrobencen–1,3–diol **1** bajo gas hidrógeno con catalizador de paladio/carbono en solvente etanol para proporcionar 2–aminobencen–1,3–diol **2**, aislado como la sal de clorhidrato (Figuras 23A y 23B). La mono–protección de **2** con cloruro de ter–butildimetilsililo y trietilamina en diclorometano/tetrahidrofurano proporcionó 2–amino–3–(ter–butildimetilsililoxi)fenol **3**. Se hizo reaccionar rifamicina S (ChemShuttle Inc., Fremont, CA, US 7342011; US 7271165; US 7547692) con **3** por condensación oxidativa con óxido de manganeso o gas oxígeno en tolueno a temperatura ambiente para proporcionar benzoxazino rifamicina TBS–protegida **4**. La reacción de **4** con piperidin–4–amina y óxido de manganeso proporcionó piperidil benzoxazino rifamicina (pipBOR) **5**.

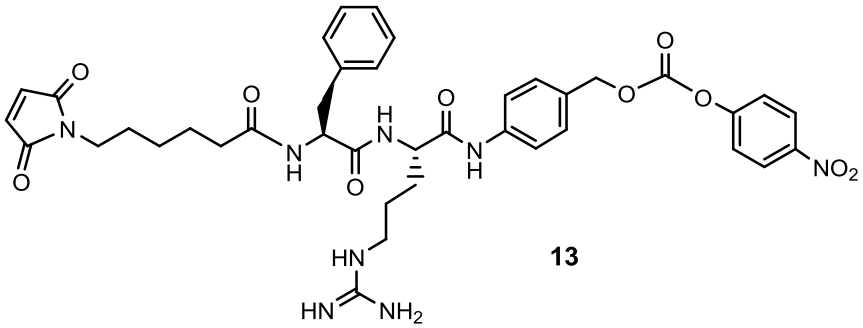
Se mezcló piperidil benzoxazino rifamicina (pipBOR) **5** (0,02 mmol) y 4–nitrofenilcarbonato de 4–((S)–2–((S)–2–(6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanamido)–3–metilbutanamido)–5–ureidopentanamido)bencilo **6** (0,02 mmol) en DMF (0,4 ml) a temperatura ambiente (RT). A esto se le agregó 2,5 equivalentes de N,N'–diisopropiletilamina. La solución se agitó entre 1 y aproximadamente 12 horas y se monitoreó por LC/MS. Tras su finalización, la solución se diluyó con DMF y se inyectó en HPLC y se purificó en condiciones

ácidas para proporcionar MC–vc–PAB–pipBOR **51**. M/Z = 1498,9. Rendimiento 40%.

Ejemplo 2 MC–fk–PAB–pipBOR **52**

Siguiendo el procedimiento del Ejemplo 1, 6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)–N–((S)–1–((S)–5–guanidino–1–(4–(hidroximetil)fenilamino)–1–oxopentan–2–ilamino)–1–oxo–3–fenilpropan–2–il)hexanamida **12** se convirtió en 4–nitrofenilcarbonato de 4–((S)–2–((S)–2–(6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanamido)–3–fenilpropanamido)–5–guanidinopentanamido)bencilo **13**.

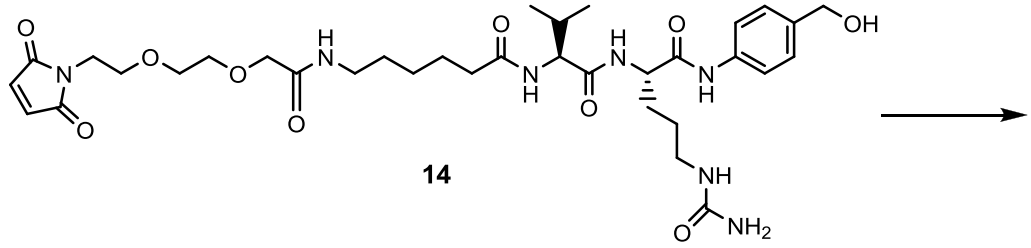




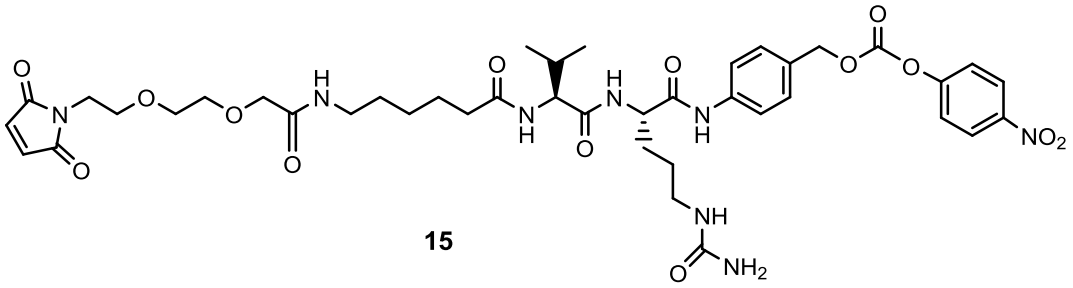
Se mezcló piperidil benzoxazino rifamicina (pipBOR) **5** (0,02 mmol) y **13** (0,02 mmol) en DMF (0,4 ml) a temperatura ambiente (RT). A esto se le agregó 2,5 equivalentes de N,N'–diisopropiletilamina. La solución se agitó de 1 a aproximadamente 12 horas y se monitoreó por LC/MS. Tras su finalización, la solución se diluyó con DMF y se inyectó en HPLC y se purificó en condiciones ácidas para proporcionar MC–fk–PAB–pipBOR **52**. M/Z = 1545,8. Rendimiento 32%.

Ejemplo 3 MP–vc–PAB–pipBOR **53**

Siguiendo el procedimiento del Ejemplo 1, 6–(2–(2–(2–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)etoxi)etoxi)acetamido)–N–((S)–1–((S)–1–(4–(hidroximetil)fenilamino)–1–oxo–5–ureidopentan–2–ilamino)–3–metil–1–oxobutan–2–il)hexanamida **14** se convirtió en 4–nitrofenilcarbonato de 4–((17S,20S)–1–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)–17–isopropil–8,15,18–trioxo–20–(3–ureidopropil)–3,6–dioxa–9,16,19–triazahenicosanamido)bencilo **15**.



14



15

Se mezcló piperidil benzoxazino rifamicina (pipBOR) **5** (0,02 mmol) y **15** (0,02 mmol) en DMF (0,4 ml) a temperatura ambiente (RT). A esto se le agregó 2,5 equivalentes de N,N'–diisopropiletilamina. La solución se agitó de 1 a aproximadamente 12 horas y se monitoreó por LC/MS. Tras su finalización, la solución se diluyó con DMF y se inyectó en HPLC y se purificó en condiciones ácidas para proporcionar MP–vc–PAB–pipBOR **53**. M/Z = 1644,8. Rendimiento 57%.

Ejemplo 4 MC–vc–PAB–dimetilpipBOR **54**

La reacción de N,N–dimetilpiperidin–4–amina con benzoxazino rifamicina TBS–protegida **4** proporcionó dimetilpiperidil benzoxazino rifamicina (dimetil pipBOR) **7** (Figura 24).

Alternativamente, se hidrogenó (5–fluoro–2–nitro–1,3–fenilene)bis(oxi)bis(metilen)dibenceno **9** bajo gas hidrógeno con catalizador de paladio/carbono en solvente tetrahidrofurano/metanol para remover los grupos bencilo, a fin de proporcionar 2–amino–5–fluorobencen–1,3–diol **10**. Se hizo reaccionar Rifamicina S o Rifamicina SV sal de sodio disponible en el comercio (ChemShuttle Inc., Fremont, CA) con 2–amino–5–fluorobencen–1,3–diol **10** por condensación oxidativa en aire o cianuro férrico de potasio en acetato de etilo a 60ºC, para proporcionar fluoro benzoxazino rifamicina **11**. El desplazamiento de fluoro con N,N–dimetilpiperidin–4–amina proporcionó dimetil pipBOR **7** (Figuras 25A y 25B).

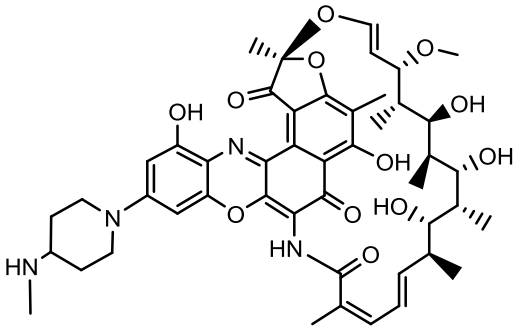
6–(2,5–Dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)–N–((S)–1–((S)–1–(4–(hidroximetil)fenilamino)–1–oxo–5–ureidopentan–2–ilamino)–3–metil–1–oxobutan–2–il)hexanamida **8**, preparada de acuerdo con los procedimientos de WO 2012113847; US 7659241; US 7498298; US 20090111756; US 20090018086; US 6214345; Dubowchik *et al* (2002) Bioconjugate Chem. 13(4):855–869 (1,009 g, 1,762 mmol, 1,000, 1009 mg) se tomó en N,N–dimetilformamida (6 ml, 77 mmol, 44, 5700 mg). A esto se le agregó una solución de cloruro de tionilo (1,1 equiv., 1,938 mmol, 1,100, 231 mg) en diclorometano (DCM) (1 ml, 15,44 mmol, 8,765, 1325 mg) en porciones por goteo (1/2 se agregó durante 1 hora, se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente (RT) y luego se agregó la otra mitad durante otra hora). La solución permaneció de color amarillo. Se agregó otros 0,6 eq. de cloruro de tionilo en forma de solución en 0,5 ml de DCM por goteo, cuidadosamente. La reacción permaneció de color amarillo y se agitó sellada hasta el día siguiente a RT. La reacción se monitoreó por LC/MS hasta un 88% del producto cloruro de bencilo **9**. Ase agregó otros 0,22 eq. de cloruro de tionilo por goteo en forma de solución en 0,3 ml de DCM. Cuando la reacción alcanzó un 92% de cloruro de bencilo **9**, se burbujeó con N_2. La

concentración se redujo de 0,3 M a 0,6 M. El producto N–((S)–1–((S)–1–(4–(clorometil)fenilamino)–1–oxo–5–ureidopentan–2–ilamino)–3–metil–1–oxobutan–2–il)–6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanamida **9** se almacenó en la heladera como solución 0,6 M y se usó como tal. M/Z 591,3, 92% de rendimiento.

En un matraz, se enfrió N–((S)–1–((S)–1–(4–(clorometil)fenilamino)–1–oxo–5–ureidopentan–2–ilamino)–3–metil–1–oxobutan–2–il)–6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanamida **9** (0,9 mmol) hasta 0°C, y se agregó dimetilpiperidil benzoxazino rifamicina (dimetil pipBOR) **7** (0,75 g, 0,81 mmol, 0,46, 750 mg). La mezcla se diluyó con otros 1,5 ml de DMF para alcanzar 0,3 M. Se agitó abierta al aire durante 30 minutos. Se agregó N,N–diisopropiletilamina (3,5 mmol, 3,5 mmol, 2,0, 460 mg), y la reacción se agitó hasta el día siguiente abierta al aire. Durante el transcurso de 4 días, se hicieron 4 adiciones de 0,2 eq. de N,N–diisopropiletilamina base mientras la reacción se agitaba abierta al aire, hasta que la reacción pareció dejar de progresar. La reacción se diluyó con DMF y se purificó por HPLC (20–60% de ACN/FA·H_2O) en varios lotes para proporcionar MC–vc–PAB–dimetilpipBOR **54.** M/Z=1482,8 rendimiento: 32%.

Ejemplo 5 MC–vc–PAB–monometilpip, desacetilBOR **55**

Siguiendo los procedimientos del Ejemplo 1, se hizo reaccionar N–metilpiperidin–4–amina y desacetil benzoxazino rifamicina TBS–protegida con óxido de manganeso para proporcionar monometilpiperidil benzoxazino rifamicina (pipBOR) **16**.

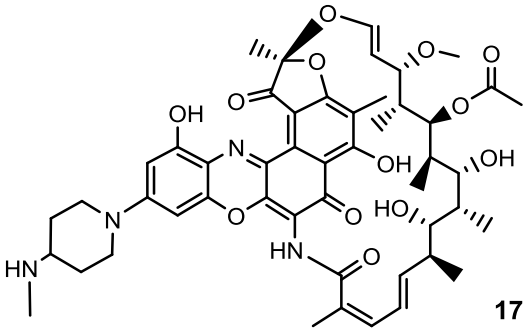


16

Se hizo reaccionar 4–nitrofenilcarbonato de 4–((S)–2–((S)–2–(6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanamido)–3–metilbutanamido)–5–ureidopentanamido)bencilo **6** y **16** para proporcionar MC–vc–PAB–monometilpip, desacetilBOR **55** con un 26% de rendimiento (M/Z = 1456,5).

Ejemplo 6 MC–vc–PAB–monometilpipBOR **56**

Siguiendo los procedimientos del Ejemplo 1, se hizo reaccionar N–metilpiperidin–4–amina y benzoxazino rifamicina TBS–protegida **4** con óxido de manganeso para proporcionar monometilpiperidil benzoxazino rifamicina (pipBOR) **17**.

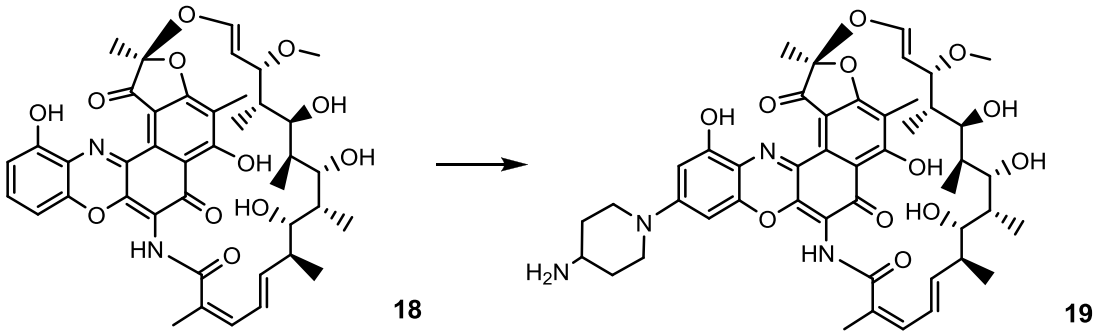


17

Se hizo reaccionar 4–nitrofenilcarbonato de 4–((S)–2–((S)–2–(6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanamido)–3–metilbutanamido)–5–ureidopentanamido)bencilo **6** y **17** para proporcionar MC–vc–PAB–monometilpipBOR **56** con un 25% de rendimiento (M/Z = 1471,0).

Ejemplo 7 MC–vc–PAB– pip, desacetilBOR **57**

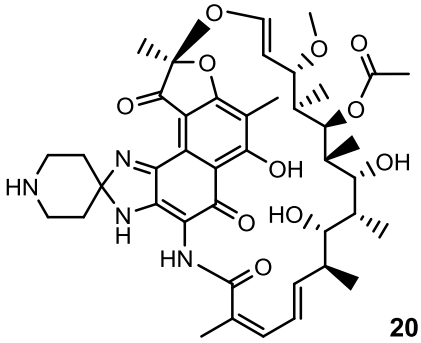
Siguiendo los procedimientos del Ejemplo 1, se hizo reaccionar piperidin–4–amina y desacetil benzoxazino rifamicina TBS–protegida **18** con óxido de manganeso para proporcionar piperidil des–acetil benzoxazino rifamicina (pip desacetil BOR) **19**.



18 19

Se hizo reaccionar piperidil des–acetil benzoxazino rifamicina **19** (0,02 mmol) y 4–nitrofenilcarbonato de 4–((S)–2–((S)–2–(6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanamido)–3–metilbutanamido)–5–ureidopentanamido)bencilo **6** (0,02 mmol) para proporcionar MC–vc–PAB–pip,desacetilBOR **57.** M/Z = 1456,6. Rendimiento 13%.

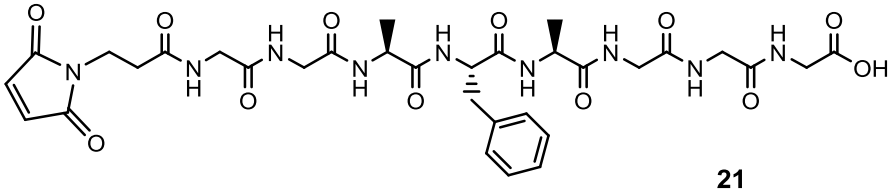
Ejemplo 8 MC–vc–PAB–rifabutina **58**



20

Siguiendo los procedimientos del Ejemplo 1, se hizo reaccionar des–isobutil rifabutina **20** (0,02 mmol) y 4–nitrofenilcarbonato de 4–((S)–2–((S)–2–(6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanamido)–3–metilbutanamido)–5–ureidopentanamido)bencilo **6** (0,02 mmol) para proporcionar MC–vc–PAB–rifabutina **58**. M/Z=1389,6. Rendimiento 21%.

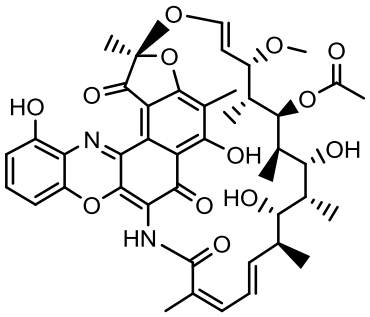
Ejemplo 9 MC–GGAFAGGG–pipBOR (“péptido central” divulgado como SEC. ID NRO. 126) **59**



21

Siguiendo los procedimientos del Ejemplo 1, se acopló péptido de maleimida **21** con piperidil benzoxazino rifamicina (pipBOR) **5** en condiciones estándar de formación de enlace amida para proporcionar MC–GGAFAGGG–pipBOR ("péptido central" divulgado como SEC. ID NRO. 126) **59**. M/Z=1626,0. Rendimiento 13%.

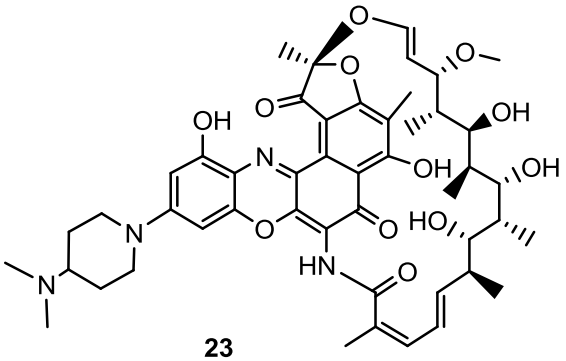
Ejemplo 10 MC–vc–PAB–rif **60**



22

En un pequeño vial, 0,05 ml de una solución 0,6 M de N–((S)–1–((S)–1–(4–(clorometil)fenilamino)–1–oxo–5–ureidopentan–2–ilamino)–3–metil–1–oxobutan–2–il)–6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanamida **9**, preparada mediante el procedimiento del Ejemplo 4, se enfrió hasta 0°C, y se agregó 1 equiv. de benzoxazino rifamicina **22,** y la mezcla se agitó durante 5 minutos. A esta solución a 0ºC se le agregó K_2CO_3 (15 eq.), y los lados del vial se lavaron con 0,05 ml de DMF. La reacción se agitó abierta al aire hasta temperatura ambiente durante 1–4 horas. Cuando se hubo consumido la totalidad de **9**, los sólidos se filtraron, y el filtrado recolectado se diluyó con DMF. La purificación por HPLC proporcionó MC–vc–PAB–rif **60** con un 11% de rendimiento (M/Z = 1356,9).

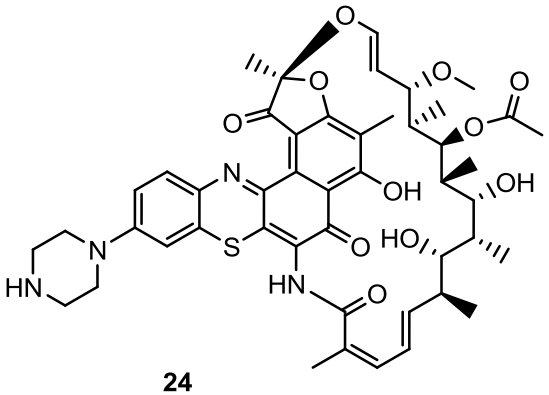
Ejemplo 11 MC–vc–PAB–dimetilpip, desacetilBOR **61**



23

Siguiendo los procedimientos del Ejemplo 4, se hizo reaccionar N–((S)–1–((S)–1–(4–(clorometil)fenilamino)–1–oxo–5–ureidopentan–2–ilamino)–3–metil–1–oxobutan–2–il)–6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanamida **9** con dimetilpiperidil desacetil benzoxazino rifamicina (dimetil desacetil pipBOR) **23** para proporcionar MC–vc–PAB–dimetilpip, desacetilBOR **61**. M/Z = 1440,66.

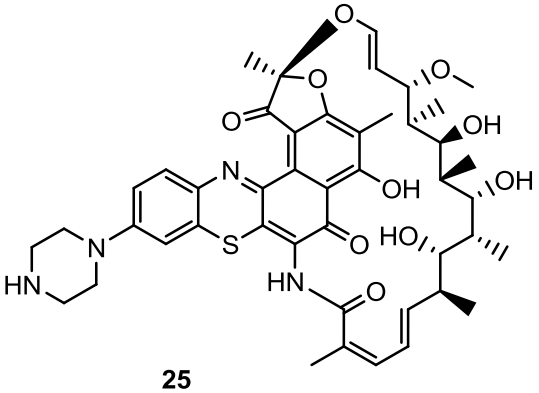
Ejemplo 12 MC–vc–PAB–piperazBTR **62**



24

Siguiendo los procedimientos del Ejemplo 1, se hizo reaccionar 4–nitrofenilcarbonato de 4–((S)–2–((S)–2–(6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanamido)–3–metilbutanamido)–5–ureidopentanamido)bencilo **6** con piperazino benztiazino rifamicina (piperazBTR) **24** para proporcionar MC–vc–PAB–piperazBTR **62**. M/Z = 1483,7.

Ejemplo 13 MC–vc–PAB– piperaz, desacetilBTR **63**

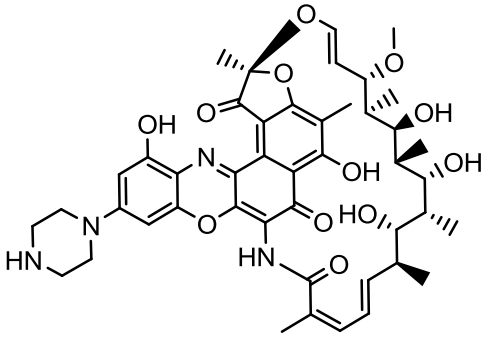


25

Siguiendo los procedimientos del Ejemplo 1, se hizo reaccionar 4–nitrofenilcarbonato de 4–((S)–2–((S)–2–(6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanamido)–3–metilbutanamido)–5–ureidopentanamido)bencilo **6** con

piperazino desacetil benztiazino rifamicina (pipBTR) **25** para proporcionar MC–vc–PAB– piperaz, desacetilBTR **63**. M/Z = 1441,6.

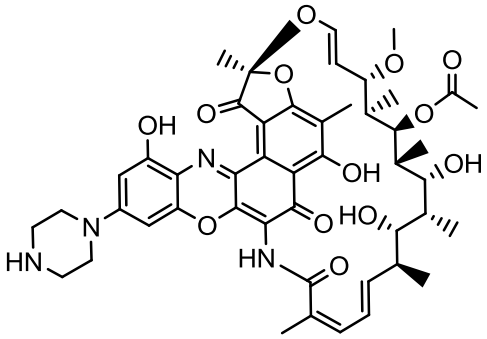
Ejemplo 14 MC–vc–PAB–piperaz, desacetilBOR **64**



26

Siguiendo los procedimientos del Ejemplo 1, se hizo reaccionar 4–nitrofenilcarbonato de 4–((S)–2–((S)–2–(6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanamido)–3–metilbutanamido)–5–ureidopentanamido)bencilo **6** con piperazil desacetil benzoxazino rifamicina (desacetil pipBOR) **26** para proporcionar MC–vc–PAB–piperaz, desacetilBOR **64**. M/Z = 1441,6.

Ejemplo 15 MC–vc–PAB–piperazBOR **65**

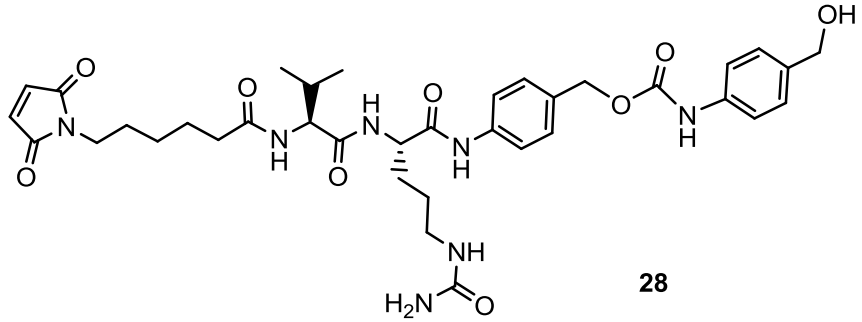


27

Siguiendo los procedimientos del Ejemplo 1, se hizo reaccionar 4–nitrofenilcarbonato de 4–((S)–2–((S)–2–(6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanamido)–3–metilbutanamido)–5–ureidopentanamido)bencilo **6** con piperazil benzoxazino rifamicina (piperazilBOR) **27** para proporcionar MC–vc–PAB–piperazBOR **65**. M/Z = 1482,7.

Ejemplo 16 MC–vc–bisPAB–dimetilpipBOR **66**

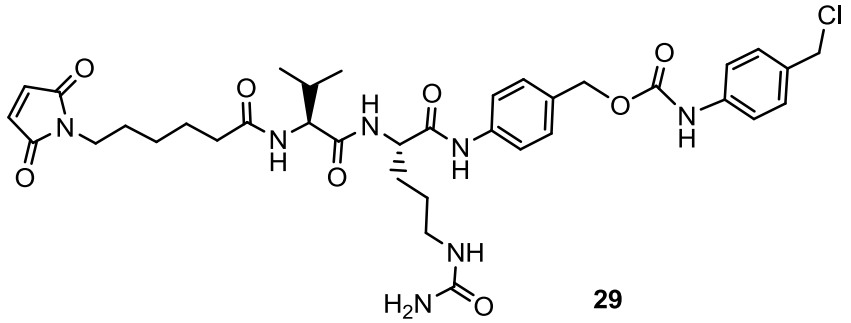
En un vial, 4–nitrofenilcarbonato de 4–((S)–2–((S)–2–(6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanamido)–3–metilbutanamido)–5–ureidopentanamido)bencilo **6** (1,56 g, 2,11 mmol, 100% en masa) se tomó en DMF (55 equiv., 116 mmol, 55,0, 8,5 g) y se agitó a RT. A esta mezcla amarilla turbia se le agregó (4–aminofenil)metanol (PAB, 1,1 equiv., 2,33 mmol, 1,10, 286 mg) y 1–hidroxibenzotriazol (0,37 equiv., 0,782 mmol, 0,370, 106 mg), seguido por N,N'–diisopropiletilamina (1 equiv., 2,11 mmol, 1,00, 276 mg). La reacción se agitó durante 2 horas y se monitoreó por LC/MS. Se agregó 1 equivalente adicional de N,N'–diisopropiletilamina (base de Hunigs) y 100 mg de (4–aminofenil)metanol. La reacción se agitó hasta el día siguiente a RT sellada. Se agregó aproximadamente 0,5 L de éter dietílico por goteo para precipitar el producto. El éter se decantó, el sólido se redisolvió en DMF, y se purificó directamente por HPLC en varios lotes para proporcionar 4–(hidroximetil)fenilcarbamato de 4–((S)–2–((S)–2–(6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanamido)–3–metilbutanamido)–5–ureidopentanamido)bencilo **28** (0,435 g) con un 28% de rendimiento aislado general (M/Z: 722.5), que tiene la siguiente estructura:



28

Siguiendo el procedimiento del Ejemplo 4, se hizo reaccionar 4–(hidroximetil)fenilcarbamato de 4–((S)–2–((S)–2–(6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanamido)–3–metilbutanamido)–5–ureidopentanamido)bencilo **28** con cloruro de tionilo para proporcionar 4–(clorometil)fenilcarbamato de 4–((S)–2–((S)–2–(6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanamido)–3–

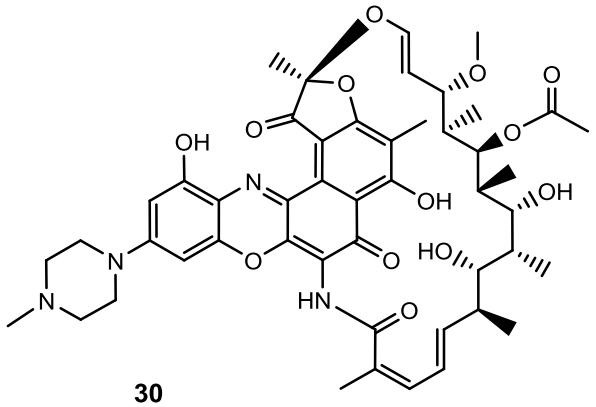
metilbutanamido)–5–ureidopentanamido)bencilo **29** con un 47% de rendimiento aislado (M/Z: 740,4), que tiene la siguiente estructura:



29

Siguiendo el procedimiento del Ejemplo 4, se hizo reaccionar 4–(clorometil)fenilcarbamato de 4–((S)–2–((S)–2–(6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanamido)–3–metilbutanamido)–5–ureidopentanamido)bencilo **29** con dimetilpiperidil benzoxazino rifamicina (dimetil pipBOR) **7** para proporcionar MC–vc–bisPAB–dimetilpipBOR **66** con un 5% de rendimiento (M/Z: 1632,1).

Ejemplo 17 MC–vc–PAB–metilpiperaz BOR **67**



30

Siguiendo el procedimiento del Ejemplo 4, se hizo reaccionar N–((S)–1–((S)–1–(4–(clorometil)fenilamino)–1–oxo–5–ureidopentan–2–ilamino)–3–metil–1–oxobutan–2–il)–6–(2,5–dioxo–2,5–dihidro–1H–pirrol–1–il)hexanamida **9** con metilpiperazino benzoxazino rifamicina (metil piperazBOR) **30** para proporcionar MC–vc–PAB–metilpiperaz BOR **67**. M/Z = 1454,68.

Ejemplo 18 Las MRSA intracelulares están protegidas contra los antibióticos

Este ejemplo proporciona evidencia que indica que las MRSA pueden sobrevivir intracelularmente *in vivo*. En una infección, las MRSA intracelulares están protegidas contra el tratamiento antibiótico y son capaces de sobrevivir a éste (tal como SOC vancomicina), lo cual permite la transferencia de la infección de una célula a otra.

Determinaciones de MIC para bacterias extracelulares: La MIC para bacterias extracelulares se determinó preparando diluciones de 2 veces en serie del antibiótico en caldo de soja tríptico. Las diluciones del antibiótico se hicieron por cuadruplicado en placas de cultivo de 96 cavidades. La MRSA (cepa NRS384 de USA300) se tomó a partir de un cultivo de desarrollo exponencial y se diluyó hasta 1 x 10^4 CFU/ml. La bacteria se cultivó en presencia del antibiótico durante 18–24 horas, con agitación a 37 ºC, y el crecimiento bacteriano se determinó por lectura de la densidad óptica (OD) a 630 nM. La MIC se determinó como la dosis del antibiótico que inhibía el crecimiento bacteriano en >90%.

Determinaciones de MIC para bacterias intracelulares: La MIC intracelular se determinó en bacterias que fueron secuestradas dentro de macrófagos peritoneales de ratón. Los macrófagos se colocaron en placas de cultivo de 24 cavidades a una densidad de 4 x 10^5 células/ml y se infectaron con MRSA (cepa NRS384 de USA300) en una proporción de 10–20 bacterias por macrófago. Los cultivos de macrófagos se mantuvieron en medio de crecimiento suplementado con 50 µg/ml de gentamicina para inhibir el crecimiento de bacterias extracelulares, y los antibióticos de ensayo se agregaron al medio de crecimiento 1 día después de la infección. La sobrevida de las bacterias intracelulares se evaluó 24 horas después de la adición de los antibióticos. Los macrófagos se lisaron con solución salina con búfer de Hanks suplementada con albúmina de suero bovino 0,1% y Triton–X 0,1%, y se realizaron diluciones en serie del lisado en solución salina con búfer de fosfato que contenía Tween–20 0,05%. El número

de bacterias intracelulares sobrevivientes se determinó por colocación en placas con agar de soja tríptico con sangre de oveja desfriniada al 5%.

Aislación de macrófagos peritoneales: Los macrófagos peritoneales se aislaron del peritoneo de ratones Balb/c de 6–8 semanas de vida (Charles River Laboratories, Hollister, CA). Para aumentar el rendimiento de los macrófagos, los ratones fueron tratados previamente por inyección intraperitoneal con 1 ml de medio tioglicolato (Becton Dickinson). El medio tioglicolato se preparó en una concentración del 4% en agua, se esterilizó por autoclave y se dejó descansar durante 20 días hasta 6 meses antes de su uso. Los macrófagos peritoneales se cosecharon 4 días después del tratamiento con tioglicolato lavando la cavidad peritoneal con solución salina con búfer de fosfato fría. Los macrófagos se colocaron en placas con medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con suero fetal bovino 10% y 10 mM de HEPES, sin antibióticos, a una densidad de 4 x 10^5 células/cavidad en placas de cultivo de 24 cavidades. Los macrófagos se cultivaron hasta el día siguiente para permitir la adhesión a la placa. Este ensayo también se utilizó para evaluar la destrucción intracelular en tipos celulares no fagocíticos. Las líneas celulares MG63 (CRL–1427) y A549 (CCL185) se obtuvieron de ATCC y se mantuvieron en medio de cultivo tisular RPMI 1640 suplementado con 10 mM de Hepes y suero fetal bovino 10% (RPMI–10). Las células HUVEC se obtuvieron de Lonza y se mantuvieron en medio completo de células endoteliales EGM (Lonza, Walkersville, MD).

Infección de macrófagos con MRSA opsonizadas: La cepa USA300 de MRSA (NRS384) se obtuvo del repositorio NARSA (Chantilly, Virginia). Algunos experimentos utilizaron la cepa Newman de *S. aureus* (ATCC25904). En todos los experimentos, las bacterias se cultivaron en caldo de soja tríptico. Para evaluar la destrucción intracelular con AAC, se tomó USA300 de un cultivo de crecimiento exponencial y se lavó en HB (solución salina equilibrada de Hanks suplementada

con 10 mM de HEPES y albúmina de suero bovino 0,1%). Los AAC o anticuerpos se diluyeron en HB y se incubaron con las bacterias durante 1 hora para permitir la unión del anticuerpo con las bacterias (opsonización), y las bacterias opsonizadas se usaron para infectar los macrófagos en una proporción de 10–20 bacterias por macrófago (4 x 10^6 bacterias en 250 µl de HB por cavidad). Los macrófagos se prelavaron con medio DMEM libre de suero inmediatamente antes de la infección y se infectaron por incubación a 37ºC en una incubadora de cultivo tisular humidificada con 5% CO_2 para permitir la fagocitosis de las bacterias. Luego de 2 horas, la mezcla de infección fue removida y reemplazada por medio de cultivo normal (DMEM suplementado con suero fetal bovino 10%, 10 mM de HEPES, y se agregó gentamicina a razón de 50 µg/ml para evitar el crecimiento de bacterias extracelulares. Al final del período de incubación, los macrófagos se lavaron con medio libre de suero, y las células se lisaron en HB suplementado con 0,1% Triton–X (que lisa los macrófagos sin dañar las bacterias intracelulares). En algunos experimentos, la viabilidad de los macrófagos fue evaluada al final del período de cultivo por detección de la liberación de lactato dehidrogenasa (LDH) citoplásmica en el sobrenadante del cultivo, usando un Kit de Detección de Citotoxicidad de LDH (producto 11644793001, Roche Diagnostics Corp, Indianapolis, IN). Los sobrenadantes se recolectaron y se analizaron inmediatamente de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se realizaron diluciones en serie del lisado en solución salina con búfer de fosfato suplementada con 0,05% Tween–20 (para destruir los agregados de bacterias), y el número total de bacterias intracelulares sobrevivientes se determinó por colcoación en placas sobre agar de soja trípico con sangre de oveja desfrinada 5%.

Generación de células peritoneales infectadas con MRSA. Los rarones A/J hembras de 6–8 semanas de vida (ratones JAX™, Jackson Laboratories) fueron

infectados con 1 x 10^8 CFU de la cepa NRS384 de USA300 por inyección peritoneal. El lavado peritoneal se cosechó 1 día después de la infección, y las células peritoneales infectadas se trataron con 50 µg/ml de lisostafina diluida en búfer de Hepes suplementado con 0,1% BSA (búfer HB) durante 30 minutos a 37ºC. Las células peritoneales luego se lavaron 2x en búfer HB helado. Las células peritoneales se diluyeron hasta 1 x 10^6 células/ml en medio de cultivo tisular RPMI 1640 suplementado con 10 mM ee Hepes y suero fetal bovino 10%, y 5 µg/ml de vancomicina. Las MRSA libres de la infección primaria se almacenaron hasta el día siguiente a 4ºC en solución salina con búfer de fosfato como control para las bacterias extracelulares que no estaban sujetas a la destrucción de neutrófilos.

Transferencia de infección de células peritoneales a osteoblastos: La línea celular de osteoblastos MG63 se obtivo del ATCC (CRL–1427) y se mantuvo en medio de cultivo tisular RPMI 1640 suplementado con 10 mM de Hepes y suero fetal bovino 10% (RPMI–10). Los osteoblastos se colocaron en placas de cultivo de 24 cavidades y se cultivaron para obtener una capa confluyente. El día del experimento, los osteoblastos se lavaron una vez en RPMI (sin suplementos). Las MRSA o células peritoneales infectadas se diluyeron en RPMI–10 completo y se agregó vancomicina a razón de 5 µg/ml inmediatamente antes de la infección. Las células peritoneales se agregaron a los osteoblastos a razón de 1 x 10^6 células peritoneales/ml. Una muestra de las células se lisó con 0,1% Triton–x para determinar la concentración real de bacterias intracelulares vivas al momento de la infección. La titulación real para todas las infecciones se determinó colocando en placas diluciones en serie de las bacterias sobre agar de soja tríptico con sangre de oveja desfibrinada 5%.

Los osteoblastos MG63 se colocaron en portaobjetos de cámara de vidrio de 4 cavidades y se cultivaron en medio de cultivo tisular RPMI 1640

suplementado con 10 mM de Hepes y suero fetal bovino 10% (RPMI–10) hasta que formaron capas confluyentes. El día de la infección, las cavidades se lavaron con medio libre de suero y se infectaron con una suspensión de células peritoneales infectadas, o con la cepa USA300 de MRSA diluida en RPMI–10 completo suplementado con 5 µg/ml de vancomicina. Un día después de la infección, las células se lavaron con solución salina con búfer de fosfato (PBS) y se fijaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en PBS con paraformaldehído 2%. Las cavidades se lavaron 3X en PBS y se permeabilizaron con PBS con saponina 0,1% durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Inmunofluorescencia: La MRSA se identificó tiñiendo con 20 µg/ml de anti–Staph 20920 de ratón (abcam, Cambridge, MA), seguido por rodamina anti–ratón (Jackson ImmunoResearch, 711–026–152). Las membranas celulares de las células peritoneales se tiñieron con biotina de toxina del cólera, subunidad beta (Invitrogen, Carlsbad, CA), seguida por estreptavidina Cy5 (BD Biosciences San Jose, CA). La unión de la toxina del cólera a las células peritoneales se confirmó por co–tinción con anti–CD11b Alexa 488 clon M1/70 (BD Biosciences). Los portaobjetos se montaron con Prolong Gold con DAPI (Invitrogen, Carlsbad CA). Los portaobjetos se visualizaron usando un microscopio confocal Leica SPE. Las imágenes se recogieron como una serie de tomas Z y se compilaron para generar las imágenes de proyección máxima mostradas.

La sobrevida de *S. aureus* dentro de células de mamífero proporciona un nicho viable que permite la infección persistente en presencia de la terapia con antibióticos. *S. aureus* es capaz de infectar y sobrevivir dentro de un número de tipos celulares de mamífero, incluidos neutrófilos, macrófagos, osteoblastos y células epitheliales (Garzoni, C. y W. L. Kelley (2009) *Trends Microbiol* **17**(2): 59–65). Para evaluar directamente si la MRSA intracelular está protegida de los antibióticos, varios antibióticos clínicamente aprobados se compararon en cuanto

a su capacidad para destruir la MRSA extracelular cultivada en medio de crecimiento bacteriano estándar, con su capacidad para destruir MRSA intracelllar que se ve secuestraad dentro de los macrófagos murinos (Tabla 1). Se seleccionaron macrófagos peritoneales murinos para este análisis debido a que estas células representan un tipo celular primario genéticamente normal que es un componente natural de la respuesta inmune innata a *S. aureus*. El análisis confirmó que estas células son fácilmente infectadas y cultivadas *in vitro*. MRSA es capaz de sobrevivir intracelularmente durante hasta seis días luego de la infección de los macrófagos (Kubica, M., K. Guzik, *et al*. (2008) *PLoS One* **3**(1): e1409). Para evaluar el efecto intracelular de los antibióticos, los macrófagos se infectaron con MRSA y se cultivaron en presencia de gentamicina, un antibiótico que se sabe es inactivo dentro del fagolisosoma debido a una baja captación celular del antibiótico (Vaudaux, P. y F. A. Waldvogel (1979) *Antimicrob Agents Chemother* **16**(6): 743–749). Los antibióticos de ensayo se agregaron al medio de cultivo (además de la gentamicina) un día después de la infección en un rango de dosis seleccionado para incluir los niveles séricos alcanzables desde el punto de vista clínico (conocidos como Cmáx en suer en la Tabla 1). Este análisis reveló que aunque la MRSA extracelular es altamente susceptible a la inhibición del crecimiento por parte de bajas dosis de vancomicina, daptomicina, linezolid o rifampicina en cultivo líquido, ninguno de los cuatro antibióticos logró matar la misma cepa de MRSA intracelular que fue secuestrada dentro de los macrófagos. Notablemente, incluso la rifampicina, que se reporta como uno de los mejores antibióticos para tratar las infecciones intracelulares tales como la tuberculosis, logró una destrucción mínima de MRSA intracelular en el tiempo y y rango de dosis del experimento.

Tabla 1 Concentraciones inhibitorias mínimas (MIC) de varios antibióticos

Antibióticos (Abx)	MIC de MRSA	MIC de NRSA	Cmáx en suero

	extracelular (µg/ml)	intracelular (µg/ml)	(µg/ml)
Vancomicina	1	>100	10–40
Daptomicina	4	>100	80
Linezolid	0,3	>20	10
Rifampicina	0,004	>20	20

Los datos anteriores confirmaron que las bacterias intracelulares están protegidas de los antibióticos durante el tiempo en que están secuestradas dentro de las células. Sin embargo, no se cree que MRSA sea un verdadero patógeno intracelular, ya que no es capaz de infectar a las células vecinas por transferencia directa de célula a célula, y la mayoría de las células infectadas finalmente se lisarán, con lo cual liberarán las bacterias intracelulares. Por lo tanto, sigue siendo posible que la combinación intracelular, una vez liberada, inevitablemente se vea expuesta a los antibióticos extracelulares en forma al menos transitoria, incluso aunque la bacteria sea inmediatamente tomada por las células vecinas. La captación de MRSA libre por los macrófagos requiere entre 15 y 90 minutos (datos no mostrados), lo cual sugiere que si las bacterias no fueron capaces de resistir una breve exposición al antibiótico, podrían permanecer protegidas en el nicho intracelular moviéndose secuencialmente desde una célula moribunda hasta un nuevo huésped. Para determinar si una breve exposición a los antibióticos fue suficiente para matar MRSA, se evaluó la vancomicina, el tratamiento estándar de referencia actual para infecciones por MRSA, y la rifampina. MRSA fue tomada a partir de un cultivo en crecimiento activo y se diluyó hasta 1 x 10^6 bacterias/ml en medio de crecimiento normal. Se agregaron los antibióticos en dos dosis, que representan entre 2x y 10x la concdentración inhibitoria mínima (MIC) esperada. Las muestras se retiraron en distintos momentos entre los 30 minutos y las 5

horas, y el antibiótico se removió por centrifugación y dilución. El número total de bacterias sobrevivientes en el cultivo se determinó por colocación en placas de agar.

La Figura 1 muestra la comparación del tiempo de destrucción de la vancomicina (vanco) y la rifampicin (Rifa) sobre MRSA en división activa. MRSA se cultivó durante 5 horas en medio TSB, en presencia de antibióticos. En los momentos indicados, se tomó una muestra del cultivo, y el antibiótico se removió por centrifugación. El número total de bacterias sobrevivientes se determinó en cada punto temporal por colocación en placas. La vancomicina se evaluó en 2 µg/ml (cuadrados abiertos) y 20 µg/ml (cuadrados cerrados). La rifampina se evaluó en 0,02 µg/ml (triángulos abiertos) y 0,2 µg/ml (triángulos cerrados). Estos dato (Figura 1) revelaron que, aunque ambos antibióticos fueron capaces de inhibir el crecimiento bacteriano en forma efectiva, y a las 5 horas se observó una pérdida de 100 veces en las bacterias viables, las bacterias fueron destruidas gradualmente durante el período de observación de 5 horas, y el 90% de las bacterias permanecían viables durante las primeras dos horas del tratamiento antibiótico, lo que permite mucho tiempo para la potencial captación por parte de células huésped.

Las acumulaciones intracelulares de MRSA se sometieron a ensayo para determinar la transferencia de infección a un nicho intracelular permisivo en presencia de vancomicina. *S. aureus* puede sobrevivir dentro de los osteoblastos, y se han observado acumulaciones intracelulares de *S. aureus* en pacientes con osteomielitis, una afección en la cual se sabe que la infección crónica con *S. aureus* es recalcitrante al tratamiento antibiótico (Thwaites y Gant, (2011) Nature Reviews Microbiology 9:215–222; Ellington *et al*., (2006) J. Orthopedic Research 24(1): 87–93; Bosse *et al*., (2005) J. Bone and Joint Surgery, 87(6): 1343–1347). Se desarrolló un ensayo *in vitro* usando una línea celular de osteoblastos MG63

ya que esta línea celular se reportó como capaz de albergar *S. aureus* intracelular (Garzoni y Kelly, (2008) Trends in Microbiology). Este ensayo confirmó que MRSA es capaz de infectar células MG63, y las bacterias intracelulares viables se pueden recuperar a partir de células MG63 infectadas durante hasta 6 días *in vitro*. Para generar una combinación de *S. aureus* intracelular, se cosecharon células peritoneales de ratones que fueron infectados por inyección peritoneal de MRSA (Figura 2).

La Figura 2 muestra la transferencia de infección desde células peritoneales infectadas hasta osteoblastos en presencia de vancomicina. Para generar una combinación de *S. aureus* intracelular, los ratones A/J se infectaron con MRSA y las células peritoneales infectadas se tomaron 1 día después de la infección. Se ha informado que células generadas de manera similar albergan bacterias intracelulares viables que son capaces de transferir la infección en un modelo de infección *in vivo* (Gresham *et al J Immunol* 2000; 164:3713–3722). Las células peritoneales infectadas consistieron en una mezcla de principalmente neutrófilos y macrófagos, y aproximadamente el 10% de las células albergaban bacterias intracelulares. Las células se trataron con lisostafina para remover las bacterias extracelulares y se suspendieron en medio de crecimiento suplementado con 5 µg/ml de vancomicina. Una muestra de las células peritoneales usadas para la inyección se lisó para determinar la dosis precisa de MRSA intracelular MRSA viable en el momento en que se inició la infección, y diversas dosis de MRSA extracelular libre se diluyeron también en medio con vancomicina para la comparación. Las células peritoneales (MRSA intracelular) o las bacterias libres (MRSA extracelular) se agregaron luego a monocapas de osteoblastos MG63 y se cultivaron durante 4 horas (barras abiertas) o 1 día (barras cerradas). El número total de bacterias intracelulares sobrevivientes en cada cavidad se determinó por colocación de los lisatos celulares en placas de

agar. Las MRSA intracelulares estuvieron protegidas de la vancomicina en comparación con los controles de MRSA extracelulares. Las cavidades infectadas con 3 x 10^4 bacterias intracelulares proporcionaron 8.750 bacterias intracelulares (aproximadamente 1 tercio de la dosis de infección) 1 día después de la infección, mientras que las bacterias extracelulares fueron destruidas eficientemente, ya que la infección con una dosis similar de MRSA libre proporcionó sólo 375 bacterias intracelulares 1 día después de la infección

La microscopía por inmunofluorescencia también demostró la transferencia de infección desde las células peritoneales a los osteoblastos MG63. Las células peritoneales se recolectaron de los ratones 1 día después de la infección con MRSA y se trataron con lisostafina para destruir toda bacteria extracelular contaminante (infección intracelular). La MRSA libre se tomó a partir de un cultivo de crecimiento activo y se lavó en PBS (infección extracelular). El número total de bacterias viables en las muestras de infección intracelular y extracelular se confirmó por colocación en placas de agar, y ambas muestras se suspendieron en medio suplementado con 5 µg/ml de vancomicina inmediatamente antes de la adición a capas confluyentes de osteoblastos MG63 cultivados en portaobjetos de cámara. Un día después de la infección, las células MG63 se lavaron para remover las bacterias extracelulares, se permeabilizaron y se tiñieron con un anticuerpo anti–*S. aureus* para identificar la MRSA intracelular y la toxina del cólera que se unió con preferencia a las membranas de las células peritoneales. Todos los núcleos celulares fueron co–teñidos con DAPI para confirmar que la monocapa de MG63 estaba intacta. Los portaobjetos fueron examinados por microscopía confocal.

Las cavidades infectadas con células peritoneales contenían una monocapa confluyente de células MG63 y los macrófagos peritoneales eran claramente visibles en la parte superior de la capa de MG63. Muchos de los

macrófagos estaban claramente infectados con MRSA, lo cual es visible en forma de agrupaciones de bacterias rojas en la imagen de color único o partículas blancas en la imagen superpuesta. Además de los macrófagos infectados, se observaron claros ejemplos de bacterias que se asociaban sólo con las células MG63. Estas células MG63 infectadas fueron también visibles en cavidades que se infectaron con la MRSA libre. La infección con MRSA libre requirió un inóculo mucho mayor para alcanzar un nivel similar de infección en las células MG63.

Los anteriores resultados establecieron que tanto MRSA libre como MRSA intracelular son capaces de sobrevivir e infectar células MG63 en presencia de vancomicina. Las bacterias de la infección intracelular fueron significativamente más capaces de sobrevivir al tratamiento con vancomicina que las bacterias libres en estas condiciones. La infección con 3×10^4 CFU de bacterias intracelulares proporcionó $8,7 \times 10^3$ CFU de bacterias intracelulares 1 día después de la infección. La infección con una dosis similar de bacterias libres proporcionó sólo 375 bacterias intracelulares 1 día después de la infección, lo cual indica que las bacterias intracelulares eran hasta 20 veces más capaces de sobrevivir que las bacterias libres. Todas las dosis de infección recuperaron más bacterias intracelulares (entre 1,5 y 6 veces) cuando las cavidades se cosecharon 1 día versus 4 horas después de la infección. Dado que la vancomicina inhibe completamente el crecimiento cuando se agrega MRSA libre (Figura 1), estos datos sugieren que las MRSA se deben haber replicado en algún momento a pesar de la constante exposición a la vancomicina en el medio de cultivo. Aunque MRSA no se replica significativamente dentro de macrófagos murinos (según nuestras observaciones no publicadas), existe considerable evidencia de que *S. aureus* es capaz de escapar del fagolisosoma y replicarse dentro del citoplasma de tipos celulares no fagocíticos (Jarry, T. M., G. Memmi, *et al*. (2008*) Cell Microbiol* 10(9): 1801–1814). En su conjunto, las anteriores observaciones

sugieren que incluso bajo constante exposición a la vancomicina, la MRSA libre puede infectar células y la MRSA intracelular puede transferirse de una célula a otra. Estas observaciones revelan un potencial mecanismo para el mantenimiento e incluso la diseminación de la infección que podría producirse en presencia de terapia antibiótica constante.

Ejemplo 19 Modelos de infección *in vivo*

Modelo de peritonitis. Los ratones A/J hembras de 7 semanas de vida (Jackson Laboratories) se infectaron por inyección peritoneal con 5 x 10^7 CFU de USA300. Los ratones fueron sacrificados 2 días después de la infección, y el peritoneo se enjuagó con 5 ml de solución salina abuferada con fosfato (PBS) fría. Los riñones se homogeneizaron en 5 ml de PBS, como se describe a continuación para el modelo de infección intravenosa. Los lavados peritoneales se centrifugaron durante 5 minutos a 1.000 rpm a 4°C en una centrífuga de mesa. El sobrenadante se recolectó en forma de las bacterias extracelulares, y el pelet celular que contenía células peritoneales se recolectó como la fracción intracelular. Las células se trataron con 50 µg/ml de lisostafina durante 20 minutos a 37ºC para matar las bacterias extracelulares contaminantes. Las células peritoneales se lavaron 3x en PBS helado para remover la lisostafina antes del análisis. Para contar el número de CFU intracelulares, las células peritoneales se lisaron en HB (solución saline equilibrada de Hanks suplementada con 10 mM de HEPES y 0,1% de albúmina de suero bovino) con 0,1% Triton–X, y se realizaron diluciones en serie del lisado en PBS con 0,05% Tween–20.

Modelo de infección intravenosa: Se usaron ratones hembra de 7 semanas de vida para todos los experimentos *in vivo*, y las infecciones se realizaron por inyección intravenosa en la vena de la cola. Los ratones A/J (Jackson Lab) se infectaron con una dosis de 2 x 10^6 CFU. Los ratones Balb/c (Charles River Laboratories, Hollister, CA) se infectaron con una dosis de 2 x 10^7 CFU. Para los

estudios que examinaron el papel de la IgG humana competente (modelo SCID IVIG), los ratones CB17.SCID (Charles River Laboratories, Hollister, CA) fueron reconstituidos con inmunoglobulina GammaGard S/D IGIV (ASD Healthcare, Brooks KY) usando un régimen de dosificación optimizado pata alcanzar niveles séricos constantes >10 mg/ml de IgG humana. IGIV se administró con una dosis intravenosa inicial de 30 mg por ratón, seguida por una segunda dosis de 15 mg/ratón por inyección intraperitoneal luego de 6 horas, y dosis diarias subsiguientes de 15 mg por ratón por inyección intraperitoneal durante 3 días consecutivos. Los ratones fueron infectados 4 horas antes de la primera dosis de IGIV con 2 x 10^7 CFU de MRSA diluida en solución salina abuferada con fosfato por inyección intravenosa. Los ratones que recibieron vancomicina se trataron con inyecciones intraperitoneales dos veces por día de 100 mg/kg de vancomicina, comenzando entre 6 y 24 horas después de la infección y durante todo el estudio. Los agentes terapéuticos experimentales (AAC, anticuerpos anti–MRSA o antibiótico dimetil–pipBOR libre) se diluyeron en solución salina abuferada con fosfato y se administraron en una única inyección intravenosa de 30 minutos a 24 horas después de la infección. Todos los ratones fueron sacrificados el día 4 después de la infección, y los riñones fueron cosechados en 5 ml de solución salina abuferada con fosfato. Las muestras de tejido se homogeneizaron usando un GentleMACS Dissociator™ (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). El número total de bacterias recuperadas por ratón (2 riñones) se determinó por colocación en placas de diluciones en serie del homogenado tisular en PBS 0,05% Tween sobre agar de soja tríptico con sangre de oveja desfibrinada 5%.

Ejemplo 20 Ensayo de liberación de catepsina/ caspasa

Para cuantificar la cantidad de antibiótico activo liberado del AAC tras el tratamiento con catepsina B, AAC se diluyeron hasta 200 µg/ml en búfer de catepsina (20 mM de acetato de sodio, 1 mM de EDTA, 5 mM de L–cisteína).

Véase la página 863 de Dubowchik *et al* (2002) Bioconj. Chem. 13:855–869, incorporada por referencia a los fines de este ensayo. Se agregó catepsina B (de bazo bovino, SIGMA C7800) a razón de 10 µg/ml, y las muestras se incubaron durante 1 hora a 37ºC. Como control, se incubaron AAC en búfer solo. La reacción se detuvo por la adición de 10 volúmenes de medio de crecimiento bacteriano, caldo de soja tríptico, pH 7,4 (TSB). Para estimar la liberación total de antibiótico activo, se hicieron diluciones en serie de la mezcla de reacción por cuadruplicado en TSB en placas de 96 cavidades, y se agregó la cepa USA300 de *S. aureus* a cada cavidad en una densidad final de 2 x 10^3 CFU/ml. Los cultivos se incubaron durante toda la noche a 3ºC con agitación, y el crecimiento bacteriano se midió por lectura de la absorbancia a 630 nM usando un lector de placas.

Ejemplo 21 Producción de anticuerpos anti–WTA

Generación, detección y selección de anticuerpos

Abreviaturas: MRSA (*S. aureus* resistente a la meticilina); MSSA (*S. aureus* sensible a la meticilina); VISA (*S. aureus* resistente a intermediario de vancomicina); LTA (ácido lipoteicoico); TSB (caldo de soja tríptico); CWP (preparación de pared celular).

Los anticuerpos de IgG humana se clonaron a partir de células B periféricas de pacientes luego de la infección por *S. aureus* usando la tecnnología Symplex™ (Symphogen, Lyngby, Dinamarca) que conserva el apareamiento de cognados de las cadenas pesada y liviana del anticuerpo, como se describe en US 8.283.294: “Método for cloning cognate antibodies”; Meijer PJ *et al*. Journal of Molecular Biology 358:764–772 (2006); y Lantto J *et al*. J Virol. 85(4):1820–33 (Feb 2011); se usaron células de plasma y memoria como fuente genética para los repertorios de IgG de longitud completa recombinante. Los clones de anticuerpos individuales se expresaron por transfección de células de mamífero,

como se describe en Meijer PJ, *et al*. Métodos in Molecular Biology 525: 261–277, xiv. (2009). Los sobrenadantes que contenían anticuerpos IgG1 de longitud completa fueron cosechados tras siete días y usados para detectar la unión a antígeno por ELISA indirecta en la selección primaria. Se generó una biblioteca de mAb que muestran unión positiva por ELISA a preparaciones de pared celular a partir de la cepa USA300 o Wood46 de *S. aureus*. Los anticuerpos se produjeron luego en transfecciones transitorias de 200 ml y se purificaron por cromatografía de proteína A (MabSelect SuRe, GE Life Sciences, Piscataway, NJ) para su ulterior evaluación. Para la producción de anticuerpo a mayor escala, los anticuerpos se produjeron en células CHO. Los vectores que codificaban VL y VH se transfectaron en células CHO y la IgG se purificó a partir de medio de cultivo celular por cromatografía de afinidad por proteína A.

Tabla 7: Lista de antígenos usados para aislar los Ab

Ag	**Descripción**	Proveedor/ fuente	Recubrimiento
WTA	Ácido teicoico de pared (WTA) de *Staph A.* Cat. Nro. R84500 (2 mg/vial), lote nro. 5E14909	Meridian Life Sciences	2 µg/ml
PGN	Peptidoglicano de *Staphilococcus aureus*; Cat. Nro. 77140, lote nro. 1396845	Sigma	2 µg/ml
CW #1	CW USA300, RPMI, desprovisto de hierro. Fase estacionaria	Genentech, 100x	
CW #3	CW USA300, TSB. Fase estacionaria	Genentech, 500X	
CW #4	CW Wood46, TSB. Fase estacionaria	Genentech, 500X	

CW#1 y CW#3 siempre se mezclaron juntos para hacer el recubrimiento de ELISA.

La Figura 6 sintetiza la selección primaria de los anticuerpos por ELISA. Todos (excepto el 4569) se aislaron cuando fueron detectados con la mezcla de preparación de pared celular USA300 (sin hierro : TSB en una proporción 96:4). Todos los mAb GlcNAc beta (excepto por 6259), SDR y PGN (4479) también fueron positivos para PGN y WTA en la selección primaria. Todos los GlcNAc alfa se hallaron exclusivamente por selección en cuanto a la unión con la mezcla de USA300 CW. 4569 (LTA específico) se halló por selección en Wood46 CWP.

Selección de mAb anti–WTA a partir de la biblioteca usando citometría de flujo ex vivo

Cada mAb dentro de esta biblioteca se analizó en cuanto a tres criterios de selección: (1) intensidad relativa de la unión de mAb a la superficie de MRSA,

como una indicación de la alta expresión del correspondiente antígeno cognado, que favorecería la alta entrega de antibiótico; (2) consistencia de la unión del mAb a MRSA aislada de una diversa variedad de tejidos infectados, como una indicación de la expresión estable del antígeno cognado en la superficie de MRSA *in vivo* durante las infecciones; y (3) capcidad de unión del mAb a un panel de cepas clínicas de *S. aureus*, como una indicación de la conservación de la expresión del antígeno de superficie cognado. Con este fin, se usó citometría de flujo para evaluar todos estos sobrenadantes de cultivo preseleccionados de mAb en la biblioteca para determinar su reactividad con *S. aureus* de una variedad de tejidos infectados y de diferentes cepas de *S. aureus*.

Todos los mAb de la biblioteca fueron analizados en cuanto a su capacidad para unirse a MRSA de riñones, bazos, hígados y pulmones infectados de ratones que fueron infectados con MRSA USA300; y dentro de los corazones o riñones de conejos que se infectaron con USA300 COL en un modelo de endocarditis en conejos. La capacidad de un anticuerpo para reconocer *S. aureus* de una variedad de tejidos infectados genera la probabilidad de que el anticuerpo terapéutico sea activo en una amplia variedad de diferentes infecciones clínicas con *S. aureus*. Las bacterias fueron analizadas inmediatamente después de la cosecha de los órganos, es decir, sin subcultivo, para prevenir los cambios fenotípicos causados por condiciones de cultivo *in vitro*. Se había observado previamente que varios antígenos de superficie de *S. aureus*, aunque eran expresados durante el cultivo *in vitro*, perdieron expresión en tejidos infectados. Los anticuerpos dirigidos contra dichos antígenos probablemente no sean útiles para tratar infecciones. Durante el análisis de esta biblioteca de mAb en una variedad de tejidos infectados, esta observación fue confirmada para un número significativo de anticuerpos, que mostraron una significativa unión a bacterias *S. aureus* a partir del cultivo, pero la ausencia de unión a bacterias de todos los

tejidos infectados evaluados. Algunos anticuerpos se unieron a bacterias de algunos, pero no todos, los tejidos infectados evaluados. Por lo tanto, en la presente invención, se seleccionaron anticuerpos capaces de reconocer bacterias de todas las condiciones de infección evaluadas. Los parámetros que se evaluaron fueron: (1) intensidad de fluorescencia relativa, como una medida de la abundancia de antígeno; (2) número de órganos con tinción positiva, como una medición de la estabilidad para la expresión de antígeno; y (3) capacidad de unión de mAb a un panel de cepas clínicas de *S. aureus* como una indicación de la conservación de la expresión del antígeno de superficie cognado. La intensidad de fluorescencia de los anticuerpos de ensayo se determinó con respecto a un anticuerpo de control de isotipo que se dirigió contra un antígeno no relevante, por ejemplo, mAb IgG1 anti–virus herpes gD:5237 (referenciado más abajo). Los mAb contra WTA–beta no sólo mostraron la mayor abundancia de antigeno, sino que también mostraron una unión muy consistente con MRSA a partir de todos los tejidos infectados evaluados y especificados antes.

Además, evaluamos la capacidad de estos mAb para unirse a las siguientes cepas de *S. aureus*, que se cultivaron *in vitro* en TSB: USA300 (MRSA), USA400 (MRSA), COL (MRSA), MRSA252 (MRSA), Wood46 (MSSA), Rosenbach (MSSA), Newman (MSSA) y Mu50 (VISA). Se halló que mAb anti–WTA beta, pero no mAb anti–WTA alfa, eran reactivos con todas estas cepas. El análisis de unión a diferentes cepas indicó que WTA beta es más conservado que WTA alfa y por lo tanto más adecuado para AAC.

Ejemplo 22 Caracterización de anticuerpos con especificidad contra ácidos teicoicos de pared en *S. aureus*

i) Confirmción de la especificidad WTA de Ab

Se generaron preparaciones de pared celular (CWP) a partir de una cepa de *S. aureus* de tipo salvaje (WT) y una cepa de *S. aureus* mutante que carecía

de WTA (ΔTagO; WTA–cepa nula) incubando 40 mg de cepas peletizadas de *S. aureus* con 1 ml de 10 mM Tris–HCl (pH 7,4) suplementado con 30% rafinosa, 100 µg/ml de lisostafina (Cell Sciences, Canton, MA) y cóctel inhibidor de proteasa libre de EDTA (Roche, Pleasanton, CA) durante 30 min a 37°C. Los lisados se centrifugaron a 11.600 x g durante 5 min, y los sobrenadantes que conten;ian componentes de pared celular se recolectaron. Para el análisis por inmunoblot, las proteínas se separaron sobre un gel 4–12% de Tris–glicina y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Invitrogen, Carlsbad, CA), seguido por blotting con los anticuerpos anti–WTA indicados de ensayo, o con anticuerpos de control contra PGN y LTA.

El inmunoblotting muestra que los anticuerpos contra WTA se unen a las preparaciones de pared celular WT a partir de WT *S. aureus,* pero no a las preparaciones de pared celular a partir de la cepa ΔTagO carente de WTA. Los anticuerpos de control contra peptidoglicano (anti–PGN) y ácido lipoteicoico (anti–LTA) se unen bien a ambas preparaciones de pared celular. Estos datos indican la especificidad de los anticuerpos de ensayo contra WTA.

ii) Citometría de flujo para determinar el grado de unión de mAb a la superficie de MRSA

La expresión de antígeno de superficie en bacterias enteras de tejidos infectados fue analizada por citometría de flujo usando el siguiente protocolo. Para la tinción con anticuerpo de bacterias de tejidos de ratón infectados, los ratones C57Bl/6 hembras de 6–8 semanas (Charles River, Wilmington, MA) recibieron inyecciones intravenosas de 10^8 CFU de USA300 cultivadas en fase log en PBS. Los órganos de los ratones se cosecharon dos días después de la infección. La endocarditis infecciosa (IE) de conejo se estableció como se describió previamente en Tattevin P. *et al*. Antimicrobial agents and chemotherapy 54: 610–613 (2010). Los conejos recibieron inyecciones intravenosas de 5 x 10^7

CFU de MRSA cepa COL cultivada en fase estacionaria, y las colonias del corazón se cosecharon 18 horas después. El tratamiento con 30 mg/kg de vancomicina se administró por vía intravenosa b.i.d. 18 h después de la infección con 7 x 10^7 CFU en fase estacionaria.

Para lisar células de ratón o conejo, los tejidos se homogeneizaron en tubos M (Miltenyi, Auburn, CA) usando un disociador de células gentleMACS (Miltenyi), seguido por la incubación durante 10 min a RT en PBS que contenía 0,1% Triton–X100 (Thermo), 10 µg/ml de DNAseI (Roche) y cóctel inhibidor de proteasa Complete Mini (Roche). Las suspensiones se hicieron pasar a través de un filtro de 40 micrones (BD) y se lavaron con HBSS sin rojo fenol suplementado con 0,1% BSA libre de IgG (Sigma) y 10 mM de Hepes, pH 7,4 (búfer HB). Las suspensiones bacterianas se incubaron luego con 300 µg/ml de IgG de conejo (Sigma) en búfer HB durante 1 h a temperatura ambiente (RT) para bloquear la unión de IgG no específica. Las bacterias se tiñieron con 2 µg/ml de anticuerpos primarios, incluyendo rF1 o mAb IgG1 de control de isotipo anti–virus herpes gD:5237 (Nakamura GR *et al*., J Virol 67: 6179–6191 (1993)), y luego con anticuerpos secundarios IgG anti–humanos fluorescentes (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA). A fin de permitir la diferenciación de bacterias de desechos de órganos de ratón o conejo, se realizó una doble tinción usando 20 µg/ml de mAb de ratón 702 anti–*S. aureus* peptidoglucano (Abcam, Cambridge, MA) y un anticuerpo secundario IgG anti–ratón marcado con fluorocromo (Jackson Immunoresearch). Las bacterias se lavaron y se analizaron por FACSCalibur (BD). Durante el análisis por citometría de flujo, las bacterias fueron calificadas en cuanto a tinción positiva con mAb 702 a partir de gráficos de fluorescencia dobles.

iii) Medición de la afinidad de unión a S. aureus *y densidad de antígeno en MRSA*

La Tabla 8 muestra el análisis de unión en equilibrio de anticuerpos MRSA que se unen a la cepa Newman–ΔSPA, y la densidad de antígeno en la bacteria.

Tabla 8

Anticuerpo MRSA	Especificidad	promK_D,nM (n=2)	Densidad de antígeno, prom sitios/bacteria
4497	b–WTA	2,5	50.000
4462	b–WTA	3,1	43.000
6263	b–WTA	1,4	22.000
6297	b–WTA	1,1	21.000
7578	a–WTA	0,4	16.000
rF1	SDR–glyco	0,3	1600

El K_D y la densidad de antígeno se derivaron usando un ensayo de unión celular de radioligando en las siguientes condiciones de ensayo: DMEM + 2,5% búfer de unión de suero de ratón; unión de solución durante 2 h a temperatura ambiente (RT); y usando 400.000 bacterias/cavidad.

El Ab 6263 es como el 6078 en el hecho de que las secuencias son muy similares. Excepto por el segundo residuo (R vs. G) en CDR H3, todas las demás secuencias de CDR de cadena L y H son idénticas.

Ejemplo 23 Ingeniería genética de mutantes de anticuerpo WTA

En síntesis, la región VH de cada uno de los Ab anti–WTA beta se clonaron y se unieron a la región constante humana de cadena H gamma1, y la VL se unió a la región constante kappa para expresar los Ab como IgG1. En algunos casos, las secuencias de tipo salvaje se alteraron en ciertas posiciones para mejorar la estabilidad del anticuerpo, como se describe a continuación. Luego se generaron Ab con cisteína modificada (TioMabs).

i. Unión de regiones variables con regiones constantes

Las regiones VH de los Ab WTA beta identificadas a partir de la biblioteca de anticuerpos humanos anterior se unieron a regiones constantes γ1 humanas para hacer Ab IgG1 de longitud completa. Las cadenas L eran cadenas L kappa.

ii. Generación de variantes de estabilidad

Los Ab WTA de la Figura 14 (véase, en particular, las Figuras 15A, 15B, 16A, 16B) se sometieron a ingeninería genética para mejoar ciertas propiedades (tales como evitar la desamidación, la isomerización de ácido aspártico, la oxidación o la glucosilación ligada a N) y se evaluaron en cuanto a la retención de la unión a antígeno, así como la estabilidad química luego de los reemplazos de aminoácidos. El ADN de cadena simple de clones que codifican la cadena pesada o liviana se purificó a partir de partículas de fago M13KO7 cultivadas en células de *E. coli* CJ236 usando un kit QIAprep Spin M13 (Qiagen). Se usaron oligonnucleóticos sintéticos 5’ fosforilados con las secuencias:

5’– CCCAGACTGCACCAGCTGGATCTCTGAATGTACTCCAGTTGC– 3’ (SEC. ID NRO. 152)

5’– CCAGACTGCACCAGCTGCACCTCTGAATGTACTCCAGTTGC– 3’ (SEC. ID NRO. 153)

5’CCAGGGTTCCCTGGCCCCAWTMGTCAAGTCCASCWKCACCTCTTGCACAG TAATAGACAGC– 3’ (SEC. ID NRO. 154); y

5’–
CCTGGCCCCAGTCGTCAAGTCCTCCTTCACCTCTTGCACAGTAATAGACAGC – 3’ (SEC. ID NRO. 155) (IUPAC codes)

para mutar los clones que codifican los anticuerpos por mutagénesis dirigida al sitio de oligonucleótido, como se describe por mutagénesis específica de sitio, siguiendo la metodología descrita en Kunkel, T.A. (1985). Rapid and efficient site–specific mutagenesis without phenotypic selection. Proceedings of the National

Academy of Sciences USA 82(2): 488–492. Se usó ADN mutagenizado para transformar células *E. coli* XL1–Blue (Agilent Technologies) y se colocaron en placas de caldo Luria que contenían 50 µg/ml de carbenicilina. Las colonias se tomaron individualmente y se cultivaron en medio líquido de caldo de Luria que contenía 50 µg/ml de carbenicilina. Se secuenció el miniprep ADN para confirmar la presencia de mutaciones.

Para Ab 6078, el segundo aminoácido del VH, met (met–2), es proclive a la oxidación. Por lo tanto, met–2 se mutó a Ile o Val para evitar la oxidación del residuo. Dado que la alteración de met–2 puede afectar la afinidad de unión, los mutantes se evaluaron en cuanto a su unión con Staph CWP por ELISA.

Se halló que los motivos CDR H3 “DG” o “DD” eran proclives a transformarse en ácido iso–aspártico. El Ab 4497 contiene DG en CDR H3 posiciones 96 y 97 (véase la Figura 18B) y fue alterado por estabilidad. CDR H3 generalmente es crítico en cuanto a la unión a antígeno, de modo que se ensayaron varios mutantes en cuanto a unión a antígeno y estabilidad química (véase la Figura 18A). El mutante D96E (v8) retiene la unión a antígeno, similar al Ab de tipo salvaje Ab 4497 (Figura 18A; Figura 18B), y es estable y no forma ácido iso–aspártico.

Staph CWP ELISA

Para el análisis de 6078 mutantes de anticuerpo, una preparación de pared celular USA300 ΔSPA *S. aureus* (WT) tratada con lisostafina, que consistía en 1 X 10^9 bacterias/ml se diluyó 1/100 en 0,05 carbonato de sodio, pH 9,6, y se cubrió con ella placas para ELISA de 384 cavidades (Nunc; Neptune, NJ) durante la incubación hasta el día siguiente a 4˚C. Las placas se lavaron con PBS más 0,05% Tween–20 y se bloquearon durante una incubación de 2 horas con PBS más 0,5% albúmina de suero bovino (BSA). Ésta y todas las incubaciones subsiguientes se realizaron a temperatura ambiente con suave agitación. Las

muestras de anticuerpo se diluyeron en búfer de dilución de muestra/estándar (PBS, 0,5% BSA, 0,05% Tween 20, 0,25% CHAPS, 5 mM EDTA, 0,35M NaCl, 15 ppm proclina (pH 7,4)), se agregaron a las placas lavadas y se incubaron durante 1,5 – 2 horas. Los anticuerpos anti–*S. aureus* unidos a la placa se detectaron durante una incubación de 1 hora con un fragmento F(ab')2 conjugado con peroxidasa de cabra anti–humano IgG(Fcγ) (Jackson ImmunoResearch; West Grove, PA) diluido hasta 40 ng/ml en búfer de ensayo (PBS, 0,5% BSA, 15 ppm Proclina, 0,05% Tween 20). Luego de un lavado final, se agregó tetrametil bencidina (KPL, Gaithersburg, MD), se desarrolló color durante 5–10 minutos, y la reacción se detuvo con 1 M ácido fosfórico. Las placas se leyeron a 450 nm con una referencia a 620 nm usando un lector de microplacas.

iii. Generación de mutantes con Cys modificada (TioMabs)

Se produjeron TioMab de longitud completa introduciendo una cisteína en la cadena H (en CH1) o la cadena L (Cκ) en una posición predeterminada, como se enseñó antes y como se describe a continuación, para permitir la conjugación del anticuerpo con un intermediario de ligador–antibiótico. Las cadenas H y L luego se clonan en plásmidos separados, y los plásmidos codificadores de H y L se cotransfectaron en células 293, donde se expresan y ensamblan en Ab intactos. Ambas cadenas H y L también se pueden clonar en el mismo plásmido de expresión. Se preparan IgG1 que tienen 2 Cys modificadas por ingeniería genética, una en cada una de las cadenas H, o 2 Cys modificadas por ingeniería genética, una en cada una de las cadenas L, o una combinación de 2 cadenas H y 2 cadenas L, cada una con Cys modificada por ingeniería genética (HCLCCys), expresando la combinación deseada de cadenas mutantes cys y cadenas de tipo salvaje.

Las Figuras 15A y 15B muestran los Ab 6078 WT y mutantes con la combinación de HC Cys y LC Cys. Los mutantes 6078 también se evaluaronen

cuanto a su capacidad para unirse a USA300 Staph A deficiente de proteína A a partir de un cultivo hasta el día siguiente. De los resultados del análisis FACS mostrado en la Figura 19, los Ab mutantes se unieron a USA300 de manera similar al anticuerpo 6078 WT (inalterado); las alteraciones de aminoácidos en los mutantes no impidió la unión a Staph A. gD es un anticuerpo de control negativo no específico.

Ejemplo 24 Preparación de conjugados anticuerpo–antibiótico anti–WTA

Los conjugados de anticuerpo–antibiótico (AAC) anti–ácido teicoico de pared de la Tabla 3 se prepararon por conjugación de un anticuerpo anti–WTA con un intermediario de ligador–antibiótico, incluidos aquellos de la Tabla 2. Antes de la conjugación, los anticuerpos anti–WTA se redujeron parcialmente con TCEP usando métodos estándar de acuerdo con la metodología descrita en WO 2004/010957, cuyas enseñanzas se incorporan por referencia con tal fin. Los anticuerpos parcialmente reducidos se conjugaron con el intermediario de ligador–antibiótico usando métodos estándar de acuerdo con la metodología descrita, por ejemplo, en Doronina *et al*. (2003) *Nat. Biotechnol.* 21:778–784 y US 2005/0238649 A1. Brevemente, los anticuerpos parcialmente reducidos se combinaron con el intermediario de ligador–antibiótico para permitir la conjugación del intermediario de ligador–antibiótico con residuos de cisteína reducidos del anticuerpo. Las reacciones de conjugación se extinguieron, y los AAC se purificaron. Se determinó la carga de antibiótico (número promedio de restos de antibiótico por anticuerpo) para cada AAC, la cual estuvo entre aproximadamente 1 y aproximadamente 2 para los anticuerpos anti–ácido teicoico de pared modificados con un solo sitio mutante de cisteína.

Reducción/Oxidación de TioMabs para conjugación: Los anticuerpos monoclonales con cisteína modificada, de longitud completa (TioMabs – Junutula, *et al*., 2008b Nature Biotech., 26(8):925–932; Dornan *et al* (2009) Blood

114(13):2721–2729; US 7521541; US 7723485; WO2009/052249, Shen *et al* (2012) Nature Biotech., 30(2):184–191; Junutula *et al* (2008) Jour of Immun. Métodos 332:41–52) expresados en células CHO, se redujeron a un exceso de aproximadamente 20–40 veces de TCEP (tris(2–carboxietil)fosfine clorhidrato o DTT (ditiotreitol) en 50 mM Tris pH 7,5 con 2 mM EDTA durante 3 h a 37°C o hasta el día siguiente a temperatura ambiente (Getz *et al* (1999) *Anal. Biochem.* Vol 273:73–80; Soltec Ventures, Beverly, MA). El TioMab reducido se diluyó y se cargó en una columna de HiTrap S en 10 mM acetato de sodio, pH 5, y se eluyó con PBS que contenía 0,3M cloruro de sodio. Alternativamente, el anticuerpo se acidificó por adición de un volumen de 1/20 de ácido acético 10%, diluido con 10 mM succinato, pH 5, se cargó en la columna y luego se lavó con 10 volúmenes de columna de búfer de sucinato. La columna se eluyó con 50 mM Tris pH 7,5, 2 mM EDTA.

El TioMab reducido eluido se trató con un exceso molar de 15 veces de DHAA (ácido deshidroascórbico) o 200 nM de sulfato de cobre acuoso ($CuSO_4$). La oxidación de los enlaces disulfuro intercatenarios se completó en alrededor de tres horas o más. La oxidación al aire ambiente también fue efectiva. El anticuerpo re–oxidado se dializó en 20 mM de succinato de sodio, pH 5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA y se almacenó congelado a –20°C.

Conjugación de Tio–Mabs con intermediario de ligador–antibióticos: Los tio–anticuerpos desbloqueados, re–oxidados (TioMab) se hicieron reaccionar con un exceso molar de 6–8 veces del intermediario de ligador–antibiótico de la Tabla 2 (a partir de una solución madre de DMSO con una concentración de 20 mM) en 50 mM Tris, pH 8, hasta que la reacción se completó (16–24 horas), según se determinó por análisis LC–MS de la mezcla de reacción.

Los conjugados anticuerpo–antibiótico (AAC) en bruto se aplicaron luego a una columna de intercambio de cationes tras la dilución con 20 mM de succinato

de sodio, pH 5. La columna se lavó tres veces con al menos 10 volúmenes de columna de 20 mM succinato de sodio, pH 5, y el anticuerpo se eluyó con PBS. Los AAC se formularon en 20 mM His/acetato, pH 5, con 240 mM sacarosa usando columnas de filtración de gel. Los AAC se caracterizaron por espectroscopia UV para determinar la concentración de proteína, SEC analítica (cromatografía por exclusión de tamaño) para el análisis de agregación y LC–MS antes y después del tratamiento con lisina C endopeptidasa.

La cromatografí por exclusión de tamaño se realizó usando una columna Shodex KW802.5 en 0,2M de fosfato de potasio, pH 6,2, con 0,25 mM de cloruro de potasio y 15% IPA, a una velocidad de flujo de 0,75 ml/min. El estado de agregación de AAC se determinó por integración de la absorbancia de área pico eluida a 280 nm.

Se realizó el análisis por LC–MS usando un instrumento Agilent QTOF 6520 ESI. A modo de ejemplo, un AAC generado usando esta química se trató con 1:500 p/p de endoproteinasa Lys C (Promega) en Tris, pH 7,5, durante 30 min a 37°C. Los fragmentos de escisión resultantes se cargaron en una columna de 1000A, 8 um PLRP–S, calentada hasta 80°C y se eluyó con un gradiente de 30% B a 40% B en 5 minutos. Fase móvil A: H_2O con 0,05% TFA. Fase móvil B: acetonitrilo con 0,04% TFA. Velocidad de flujo: 0,5 ml/min. La elución de proteína se monitoreó por detección de absorbancia UV a 280 nm previo a la ionización por electroaspersión y análisis MS. La resolución cromatográfica del fragmento Fc no conjugado, Fab residual no conjugado y antibiótico–Fab generalmente se alcanzó. Los espectros m/z obtenidos se dilucidaron usando software Mass Hunter™ (Agilent Technologies) para calcular la masa de los fragmentos de anticuerpo.

Ejemplo 25 Identificación y purificación de estafopaína B como la proteasa responsable de la escisión

El sobrenadante de un cultivo de 3 litros, durante toda la noche, de Wood46 se concentró y se sometió a intercambio de búfer usando TFF (10 kDa) en 50 mM de fosfato de sodio, pH 7. La muestra se cargó en Q Sefarosa FF, y las proteínas se separaron por cromatografía usando un gradiente de 0–300 mM de NaCl en 50 mM de fosfato de sodio, pH 7. Las fracciones activas se identificaron por incubación con tioFAB S4497–MC–GGAFAGGG–(pipBOR) (“péptido central” divulgado como SEC. ID NRO.: 126) de la Figura 27 y se evaluó la escisión del ligador en el sitio esperado por análisis LC–MS. Las fracciones activas se combinaron y se suplementaron con sulfato de amonio hasta una concentración de 2M. Las proteínas se purificaron adicionalmente por cromatografía de interacción hidrofóbica en fenil sefarosa, usando un gradiente de 2–0M sulfato de amonio en 50 mM de TRIS, pH 7,5. Nuevamente, las fracciones activas se identificaron usando el compuesto herramienta. Estas fracciones se combinaron y se purificaron adicionalmente en Mono Q en 50 mM de acetato de sodio, pH 5,5, usando un gradiente de sal de 0–1M NaCl. Las fracciones activas de este paso cromatográfico se identificaron como antes, se combinaron y se aplicaron a cromatografía por exclusión de tamaño en PBS. Las fracciones activas fueron identificadas, y se determinó que contenían una única proteína de interés por SDS–PAGE.

Las fracciones activas enriquecidas de la purificación con Q sefarosa se caracterizaron para identificar la clase de proteasa responsable de la actividad. Se halló que la proteasa es inhibida por N–etilmaleimida, lo cual indica que la enzima probablemente sea una cisteína proteasa. Tras revisar las cisteína proteasas secretadas conocidas de *Staphylococcus aureus,* se identificó que la estafopaína B tenía similar especificidad de sustrato respecto de la especificidad observada en la selección REPLi (Kalinska, M., T. Kantyka, *et al.* (2012). Biochimie 94(2): 318). Se adquirió estafopaína B purificada (Sigma–Aldrich) y se incubó con tioFAB

S4497–MC–GGAFAGGG–(pipBOR) (“péptido central” divulgado como SEC. ID NRO.: 126) de la Figura 27. Se halló que la estafopaína B escinde el ligador en el mismo sitio que la proteasa activa purificada a partir del sobrenadante de Wood46. La estafopaína B y la proteasa activa purificada a partir del sobrenadante del cultivo se incubaron con Alexa Fluor® 488 C_5 maleimida (Invitrogen, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific Inc.) para marcar las cisteínas de sitio activo. Las muestras se corrieron en SDS–PAGE para identificar la proteasa como estafopaína B. Los geles de SDS–PAGE de las fracciones activas de la purificación SEC se corrieron junto con la estafopaína B purificada, con y sin Alexa Fluor 488.

Las fracciones activas enriquecidas para la purificación con Q sefarosa también se analizaron por espectrometría de masa proteómica. Diez microgramos de fracciones activas B11, B12 y C02, y diez microgramos de fracciones activas 1, 2 y 3, y diez microgramos de una fracción inactiva se corrieron en SDS–PAGE. Las bandas se extirparon y se sometieron a digestión con tripsina hasta el día siguiente. Las muestras digeridas se analizaron por LC–MS/MS, y los resultados de espectros de masa en tándem se presentaron para una búsqueda en la base de datos usando el algoritmo de búsqueda Mascot. La estafopaína B obtuvo el puesto más alto entre las cisteína proteasas presentes en las fracciones activas. La autolisina, que también es una cisteína proteasa, también aparece en la parte superior de la lista, con la mayor abundancia de péptidos únicos producidos en la fracción inactiva, el control negativo, por lo tanto la autolisina se sacó de consideración. El análisis proteómico por espectros de masa de las fracciones activas a partir de las purificaciones con Q sefarosa muestra una gran abundancia de estafopaína B. Los datos de soporte se filtraron para las proteínas de *S. aureus* y se calificaron por número de péptidos en la fracción activa 1.

La proteasa activa se purificó a partir del sobrenadante del cultivo de Wood46 de *S. aureus*. Las células se cultivaron hasta el día siguiente a 37°C en 3 litros de TSB. Las células se eliminaron por centrifugación a 10.000 x g durante 10 min. El sobrenadante se recolectó y se hizo pasar a través de dos filtros de 0,22 um. Luego, se concentró y se sometió a intercambio de búfer en 50 mM de fosfato de sodio, pH 7, usando TFF con una membrana de 10 kD. La muestra se concentró diez veces hasta un volumen de 300 ml. La muestra se cargó en Q sefarosa FF (GE Healthcare Biosciences AB), y las proteínas se separaron por cromatografía usando un gradiente de 0–300 mM de NaCl en 50 mM de fosfato de sodio, pH 7. Las fracciones activas se combinaron y se suplementaron con sulfato de amonio a una concentración de 2M. Las proteínas se purificaron adicionalmente por cromatografía de interacción hidrofóbica en fenil sefarosa (GE Healthcare Biosciences AB) usando un gradiente de 2–0M sulfato de amonio en 50 mM de TRIS, pH 7,5. Las fracciones activas se combinaron y se purificaron adicionalmente en Mono Q (GE Healthcare Biosciences AB) en 50 mM de acetato de sodio, pH 5,5, usando un gradiente de sal de 0–1M NaCl. Las fracciones activas de este paso cromatográfico se identificaron como antes, se combinaron y se aplicaron a una cromatografía por exclusión de tamaño (Zenix–150, Sepax Technologies) en PBS.

Para identificar fracciones que contenían nuestra proteasea activa de interés, se transfirió 100 ul de cada fracción a una placa de 96 cavidades, donde se incubó con 25 ug de THIOFAB 4497 mal–GGAFAGGG–DNA31 (“péptido central” divulgado como SEC. ID NRO.: 126). Las fracciones de cada paso cromatográfico se analizaron en cuanto a su actividad, y se usó 100 ul independientemente de la concentración de proteína. Las muestras se incurbaron hasta el día siguiente a 37°C y posteriormente se analizaron por LC–MS para identificar fracciones en las cuales se había producido la escisión de proteasa del

ligador–antibiótico. Las fracciones activas combinadas de la cromatografia con Q sefarosa FF se midieron para obtener una concentración de proteína total de 14 mg/ml. Se diluyó 200 µg de la combinación hasta 2 mg/ml en PBS, y se incubó con y sin N–etilmaleimida (NEM, Sigma) a una concentración final de 0,1 mM. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Se agregó 25 ug de THIOFAB 4497 mal–GGGAFAGGG–DNA31 (“péptido central” divulgado como SEC. ID NRO.: 126) a ambas muestras y se incubaron a 37°C durante 2 horas. A las 2 horas, las muestars se analizaron por LC–MS para identificar si se había producido la escisión de proteasa del ligador–antibiótico. Se incubó aproximadamente 50 ul de las fracciones activas de SEC con 0,1 mM de Alexa Fluor 488 C_5 maleimida (Invitrogen) durante 1 hora, independientemente de la concentración de proteína, para el marcado. Los ensayos de escisión con proteasas purificadas se realizaron incubadno 5 uM del conjugado tioFAB con 50 nM de proteasa en un volumen final de 100 ul. Los ensayos se realizaron en PBS, pH 7,2, 4 mM de L–Cys, 2,5 mM de EDTA, o en 100 mM de citrato de sodio, pH 5, 100 mM de NaCl, 4 mM de L–Cys, 2,5 mM de EDTA. Las muestars se incubaron durante 2 horas a 37°C. A las 2 horas, las reacciones de escisión se extinguieron por dilución 1:1 con TFA 1%. Las muestras posteriormente se corrieron en LC–MS para determinar el porcentaje de escisión del ligador. El porcentaje de escisión se determinó integrando los cromatogramas de A_{280} de las especies escindidas e intactas. Los restos de antibiótico o cromóforo agregados al término C de los ligadores añaden una significativa hidrofobicidad, de modo tal que tioFAB con ligadores intactos y tioFAB con ligadores escindidos se resuelven a la condición basal.

Para el análisis proteómico de fracciones enriquecidas, diez microgramos de fracciones activas enriquecidas de la purificación con Q Sepharose® (GE Healthcare Life Sciences) se cargaron en un gel Bis–Tris 4–12% (Life

Technologies). Las líneas de gel enteras se extirparon y se dividieron de arriba abajo en 11 bandas. Las bandas de gel se limpiaron con 50% acetonitrilo/50 mM bicarbonato de amonio, se redujeron con ditiotreitol (50 mM de concentración final) durante 30 minutos a 50ºC, y se alquilaron con iodoacetamida (50 mM de concentración final) a temperatura ambiente en la oscuridad durante 30 minutos. Las muestras luego se digirieron a 37°C hasta el día siguiente con 0,02 µg/µl de tripsina (Promega) en 50 mM de bicarbonato de amonio. Las muestras digeridas se inyectaron en una columna capilar de 100 µm de diámetro interno (columna NanoAcquity UPLC, 100 µm x 100 mm, 1,7 µm, BEH130 C18, Waters Corp) y se separaron por cromatografía capilar en fase inversa en un sistema NanoAcquity UPLC (Waters Corp). Las muestras se cargaron en ácido trifluoroacático 0,1% en agua y se eluyeron con un gradiente de 2–90% de búfer B (donde el búfer A es 0,1% ácido fórmico/ 2% acetonitrilo/ 98% agua y el búfer B es 0,1% ácido fórmico/ 2% agua/ 98% acetonitrilo) a 1,00 µl/min, con un tiempo de análisis total de 45 minutos. Los péptidos se eluyeron directamente en un espectrómetro de masa LTQ–Orbitrap XL (ThermoFisher) y se ionizaron usando una fuente ADVANCE (Michrom–Bruker) con voltaje de rociado de 1,4 kV. Los datos de espectros de masa se adquirieron usando un método que comprenía un escaneo MS completo (375–1600 m/z) en el Orbitrap a una resolución de 60.000 M/ΔM a m/z 400, seguido por la disociación inducida por colisión (CID) de los 8 iones superiores más abundantes detectados en el escaneo MS completo en un ciclo repetido durante todo el gradiente LC en la trampa de iones lineal. Los resultados de espectros de masa en tándem se presentaron para la búsqueda en la base de datos usando el algoritmo de búsqueda Mascot®, versión 2.3.02 (Matrix Sciences) contra una base de datos de blanco señuelo concatenados, Uniprot ver 2010_12, que comprende proteínas de *S. aureus* y contaminantes de laboratorio comunes. Los datos se investigaron con especificidad tríptica, modificaciones variables de

carbamidometilación de cisteína (+57.0215 Da) y oxidación de metionina (+15.995 Da), permitiendo 2 escisiones erróneas, 20 ppm de masa iónica precursora y 0,5 Da de tolerancia de masa iónica de fragmento especificada. Las coincidencias espectrales de péptidos se filtraron usando un algoritmo discriminante lineal (LDA) a una velocidad de falso descubrimiento (FDR) de 1%.

Ejemplo 26 Escisión de estafopaína de péptidos tioFab FRET y AAC

Se incubó 5 µM de tioFAB 4497 MP–LAFGA–QSY7 (“péptido central” divulgado como SEC. ID NRO.: 135) y tioFAB 4497 MP–LAFAA–QSY7 (“péptido central” divulgado como SEC. ID NRO.: 136) (Figura 30) con 50 nM de proteasa en PBS, pH 7,2, 4 mM de L–Cys, 2,5 mM de EDTA durante 2 horas a 37 °C. A las 2 horas, las reacciones de escisión se extinguieron por dilución 1:1 con TFA 1%. Las muestras posteriormente se corrieron en LC–MS para determinar el porcentaje de escisión del ligador. Todas las proteasas evaluadas escindieron los dos ligadores, aunque en distintos grados y ubicaciones (Tabla 4). La estafopaína A y la estafopaína B escinden los ligadores en los mismos sitios: MP–LAFG↓A–QSY7 (“péptido central” divulgado como SEC. ID NRO.: 135) y MP–LAFA↓A–QSY7 (“péptido central” divulgado como SEC. ID NRO.: 136). La estafopaína B alcanza un 100% de escisión de ambos ligadores a la concentración indicada. La catepsina B también alcanzó un 100% de escisión para ambos ligadores en estas condiciones, aunque los sitios de escisión estuvieron mezclados. La catepsina B escindió mal–LAFGA–QSY7 (“péptido central” divulgado como SEC. ID NRO.: 135) exclusivamente en MP–LAFG↓A–QSY7 (“péptido central” divulgado como SEC. ID NRO.: 135), mientras que escindió mal–LAFAA–QSY7 (“péptido central” divulgado como SEC. ID NRO.: 136) en MP–LAFA↓A–QSY7 (“péptido central” divulgado como SEC. ID NRO.: 136) y MP–LAFAA↓–QSY7 (“péptido central” divulgado como SEC. ID NRO.: 136). La escisión de MP–LAFAA–QSY7 (“péptido central” divulgado como SEC. ID NRO.: 136) por estafopaína A fue del 23%,

mientras que la escisión de m MP–LAFGA–QSY7 (“péptido central” divulgado como SEC. ID NRO.: 135) fue del 38%.

Se incubó 5 µM de AAC–193 con 50 nM de proteasa en PBS, pH 7,2, 4 mM de L–Cys, 2,5 mM de EDTA o 100 mM de citrato de sodio, pH 5, 100 mM de NaCl, 4 mM de L–Cys, 2,5 mM de EDTA durante 2 horas a 37 °C. A las 2 horas, las reacciones de escisión se extinguieron por dilución 1:1 con TFA 1%. Las muestras posteriormente se corrieron en LC–MS para determinar el porcentaje de escisión del ligador. El ligador–antibiótico optimizado fue eficientemente escindido por todas las proteasas evaluadas. Tras la escisión por estafopaína A y estafopaína B, se liberó piperazino–rifamicina libre. La estafopaína B alcanzó un 100% de escisión a pH 5 y 7,2. La estafopaína A mostró un 100% de escisión a pH 5 y un 64% de escisión a pH 7,2.

Ejemplo 27 El conjugado de anticuerpo–antibiótico, tio–S4497 LC v8–MP–LAFG–PABC–(piperazinoBOR) (“péptido central” divulgado como SEC. ID NRO.: 128) AAC–215, inhibe *S. aureus in vitro*

Se suspendieron 1 x 10^8 bacterias Wood46 de fase estacionaria en 10 µL de búfer HB (solución salina equilibrada de Hanks suplementada con 0,1% albúmina sérica bovina) que contenía 100 µg/ml de tio–S4497 LC v8–MP–LAFG–PABC–(piperazinoBOR) (“péptido central” divulgado como SEC. ID NRO.: 128) AAC–215 o tio–S4497–HC–A118C–MC–vc–PABC–(piperazBOR) AAC–126. Este último usa un ligador escindible por catepsina B de valina–citrulina (vc) para entregar el mismo antibiótico.

Luego de 1 hora, las muestras se diluyeron 10 veces mediante la adición de 90 µL de HB, o 90 uL de catepsina B (10 µg/ml de Catepsina B en 20 mM de acetato de sodio, 1 mM de EDTA, 5 mM de L–cisteína, pH 5) y se incubaron a 37 ºC durante otras 3 horas. La liberación del antibiótico activo se infirió determinando si la incubación de AAC con las bacteria era capaz de inhibir el

posterior crecimiento bacteriano. Las suspensiones de bacterias/AAC se colocaron directamente en placas de agar de soja tríptico y el crecimiento bacteriano se visualizó luego de la incubación hasta el día siguiente a 37ºC. El fármaco activo se libera del AAC conjugado con MC–LAFG–PAB–(piperazinoBOR) ("péptido central" divulgado como SEC. ID NRO.: 128) intermediario de ligador–antibiótico.

Las bacterias que se incubaron sin AAC crecieron bien y no se vieron afectadas por el tratamiento con catepsina B. Las bacterias tratadas con AAC–126 que contenía el ligador escindible por catepsina B, valina–citrulina (vc), crecieron bien luego de la incubación en búfer HB solo, pero no pudieron crecer tras el tratamiento con AAC–126 + Catepsina B, lo cual indica que se requería el tratamiento con la enzima para liberar el antibiótico activo. Por el contrario, las bacterias incubadas con AAC–215 que contenía el ligador escindible por estafopaína LAFG (SEC. ID NRO.: 128) no lograron crecer luego de la incubación con búfer HB solo, lo cual sugiere que la suspensión bacteriana contenía una actividad enzimática que era suficiente para liberar el antibiótico activo del ligador escindible por estafopaína AAC.

Ejemplo 28 El conjugado anticuerpo–antibiótico, tio–S4497 HC v1–MP–LAFG–PABC–(piperazinoBOR) ("péptido central" divulgado como SEC. ID NRO.: 128) AAC–193 mata MRSA intracelular en un ensayo de macrófagos:

La cepa USA300 de *S. aureus* se incubó con distintas dosis (100 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml o 0,1 µg/ml) de anticuerpo S4497 solo, tio–S4497 HC WT (v8) (SEC. ID NRO.: 137), LC V205C–MC–vc–PAB–(dimetilpipBOR) ("péptido central" divulgado como SEC. ID NRO.: 128) AAC–192, o tio–S4497 HC v1–MP–LAFG–PABC–(piperazinoBOR) AAC–193 para permitir la unión del AAC a las bacterias (Figura 31).

S4497 HC WT (v8) 446aa

EVQ LVE SGG GLV QPG GSL RLS CSA SGF SFN SFW MHW VRQ VPG KGL VWI SFT NNE GTT TAY

ADS VRG RFI ISR DNA KNT LYL EMN NLR GED TAV YYC ARG DGG LDD WGQ GTL VTV SSA STK

GPS VFP LAP SSK STS GGT AAL GCL VKD YFP EPV TVS WNS GAL TSG VHT FPA VLQ SSG LYS

LSS VVT VPS SSL GTQ TYI CNV NHK PSN TKV DKK VEP KSC DKT HTC PPC PAP ELL GGP SVF

LFP PKP KDT LMI SRT PEV TCV VVD VSH EDP EVK FNW YVD GVE VHN AKT KPR EEQ YNS TYR

VVS VLT VLH QDW LNG KEY KCK VSN KAL PAP IEK TIS KAK GQP REP QVY TLP PSR EEM TKN

QVS LTC LVK GFY PSD IAV EWE SNG QPE NNY KTT PPV LDS DGS FFL YSK LTV DKS RWQ QGN

VFS CSV MHE ALH NHY TQK SLS LSP GK

(SEC. ID NRO.: 137)

Luego de 1 hora de incubación, las bacterias opsonizadas se alimentaron a macrófagos murinos y se incubaron a 37 ºC durante 2 horas para permitir la fagocitosis. Luego de que se completara la fagocitosis, la mezcla de infección se reemplazó por medio de crecimiento normal suplementado con 50 µg/ml de gentamicina para matar toda bacteria extracelular remanente, y el número total de bacterias intracelulares sobrevivientes se determinó 2 días después por colocación de diluciones en serie de los lisados de macrófagos en placas de agar de soja tríptico (Figura 31). El AAC escindible por estafopaína fue capaz de matar USA300 intracelular con una potencia similar a la del AAC escindible por

catepsina B. La línea de puntos gris indica el límite de detección del ensayo (10 CFU/cavidad).

Ejemplo 29 Los AAC apuntan a una destrucción antibiótica de *S. aureus* a través de la unión específica de antígeno del anticuerpo:

La cepa Wood46 de *S. aureus* se eligió ya que no expresa la proteína A, una molécula que se une a la región Fc de los anticuerpos IgG. La cepa Wood46 de *S. aureus* se incubó con 10 µg/ml o 0,5 µg/ml de anticuerpo S4497, AAC de control de isotipo que contiene un ligador escindible de catepsina B, tio–trastuzumab HC A118C–MC–vc–PAB–(dimetil–pipBOR) AAC–101, tio–S4497 HC WT (v8), LC V205C–MC–vc–PAB–(dimetilpipBOR) AAC–192, AAC de control de isotipo que contiene un ligador escindible de estafopaína tio–trastuzumab HC A118C–MP–LAFG–PABC–(piperazinoBOR) ("péptido central" divulgado como SEC. ID NRO.: 128), o tio–S4497 HC v1–MP–LAFG–PABC–(piperazinoBOR) ("péptido central" divulgado como SEC. ID NRO: 128) AAC–193 durante 1 hora para permitir la unión de los AAC a las bacterias (Figura 32). Para limitar la unión no específica de los AAC, las bacterias opsonizadas fueron centrifugadas, lavadas una vez y resuspendidas en búfer antes de ser alimentadas a macrófagos murinos. Luego de completada la fagocitosis, la mezcla de infección se reemplazó por medio de crecimiento normal suplementado con 50 µg/ml de gentamicina para matar toda bacteria extracelular remanente, y el número total de bacterias intracelulares sobrevivientes se determinó 2 días después por colocación de diluciones en serie de los lisados de macrófagos en placas de agar de soja tríptico (Figura 32). El AAC que contenía un ligador escindible por estafopaína, AAC–193, fue capaz de matar todas las bacterias intracelular detectables, mientras que el AAC de control de isotipo no mostró actividad. El ensayo de macrófagos demuestra que los AAC escindibles por estafopaína son capaces de matar bacterias intracelulares. El conjugado de anticuerpo–antibiótico, tio–S4497 LC v8–

MP–LAFG–PABC–(piperazinoBOR) (“péptido central” divulgado como SEC. ID NRO.: 128) AAC–215 es eficaz en un modelo de infección por MRSA *in vivo*.

Los ratones CB17.SCID fueron reconstituidos con IgG humana usando un régimen de dosificación optimizado para obtener niveles constantes de al menos 10 mg/ml de IgG humana en suero. Los ratones fueron tratados con anticuerpo 4497 (50 mg/kg), AAC–215 con ligador escindible por estafopaína (50 mg/kg) o un control de isotipo, anti–gD AAC que contenía un ligador escindible por estafopaína (50 mg/kg). Los ratones recibieron una dosis única de AAC–215 el Día 1 post–infección por inyección intravenosa. Todos fueron sacrificados el Día 4 post–infección, y el número total de bacterias sobrevivientes en 2 riñones (Figura 33) o en el corazón (Figura 34) se determinó por colocación en placas. El tratamiento con AAC–215 que contenía un ligador escindible por estafopaína redujo la carga bacteriana por debajo del límite de detección en 6 de los 8 ratones tratados, mientras que el AAC de control de isotipo mostró limitada actividad. La línea de puntos indica el límite de detección del ensayo (333 CFU/ratón).

Ejemplo 30 Crecimiento de *S. aureus* y perfil de actividad de proteasa:

Se cultivó *Staphylococcus aureus* cepa Wood46 (ATCC10832) hasta el día siguiente a 37 °C en caldo de soja tríptico (TSB) con agitación. Los cultivos se centrifugaron a 10.000 x g durante 10 min. El sobrenadante se recolectó y se hizo pasar por dos filtros de 0,22 um.

Perfil de actividad de proteasa de *S. aureus*: Se concentró 150 ml de sobrenadante de cultivo y se sometió a intercambio de búfer en solución salina abuferada con fosfato (PBS) usando TFF (Millipore Pellicon XL Cassette Biomax 10kDa) hasta un volumen final de 38 ml, con una concentración total final de proteína de 1 mg/ml. El ensayo de actividad de proteasa del sobrenadante de Wood46 se realizó usando la *Rapid Endopeptidase Profiling Library* o REPLi (Mimotopes, Victoria, Australia). La biblioteca consiste en 3375 péptidos

fluorogénicos internamente extinguidos en un formato de 96 cavidades dispuestos en 512 grupos. Los péptidos de la biblioteca contienen la secuencia MCA–Gly–Gly–Gly–Xaa–Yaa–Zaa–Gly–Gly–DPA–Lys–Lys (SEC. ID NRO.: 132), donde MCA corresponde a ácido 7–metoxicumarin–4–acético (donante fluorescente) y DPA corresponde a ácido N^b–(2,4–dinitrofenil)–L–2,3–diaminopropiónico (aceptor de fluorescencia). Las cavidades que contenían 5 nmol de los péptidos FRET se solubilizaron en 5 ul de 50% acetonitrilo (Sigma). Se agregó 50 µl (microlitros) del sobrenadante de Wood46 concentrado y 50 ul de PBS a cada cavidad. Las placas se incubaron a 37 °C y las mediciones de fluorescencia se hicieron a los 0, 30, 60, 140 y 170 minutos. Los datos de fluorescencia se obtuvieron en un Tecan Saphire^2, excitación λ 320 nm/ emisión λ 400 nm. Las veces de cambio de la intensidad de fluorescencia en los puntos finales se calcularon como $F_{final}/F_{inicial}$.

Los sitios de escisión de sustrato se determinaron por LC–MS realizada con un Agilent Q–TOF usando una fuente de ESI**.** Se inyectó 10 ul de cada cavidad y se separó por cromatografía en fase inversa en una columna Waters Xbridge OST C18 2,5 um (4,6 x 50 mm) usando un sistema de HPLC Agilent 1260. Las muestras se eluyeron con un gradiente de 2–90% de Búfer B (donde el Búfer A es 0,05% ácido trifluoroacético/ 99,95% agua, y el Búfer B es 0,04% ácido trifluoroacético/ 99,96% acetonitrilo) a 500 µl/min, con un tiempo de análisis total de 20 minutos. Los péptidos se eluyeron directamente en un espectrómetro de masa Q–TOF. Los productos de escisión fueron asignados sobre la base de la comparación de los pesos moleculares observados, con masas calculadas correspondientes a la escisión en cada sitio posible.

Ejemplo 31 Síntesis de ligador peptídico maleimido FRET:

El péptido maleimido FRET, (MP–Lys(TAMRA)–Gly–Gly–Ala–Phe–Ala–Gly–Gly–Gly–Lys(fluoresceína) (“péptido central” divulgado como SEC. ID NRO.: 125) de la Figura 26 se sintetizó por química de fase sólida Fmoc estándar

usando un sintetizador de péptidos PS3 (Protein Technologies, Inc.). Se usó 0,1 mmol de resina Fmoc–Lys(Boc)–Rink amida (Novabiochem) para generar una carboxamida C terminal. Se agregó Fmoc–Lys(Mtt)–OH (Novabiochem) al primer residuo N–terminal para permitir la química de cadena lateral adicional luego de la remoción del grupo Mtt. Se adosó un aceptor de fluorescencia, 5(6)–carboxi tetrametilrodamina, o TAMRA (Novabiochem), a esta amina de cadena lateral en la resina luego de remover el grupo Mtt mediante tres lavados consecutivos de 30 min de 1% TFA en diclorometano con 3% triisopropilsilano (TIS). La reacción se dejó acanzar durante 20 horas. Luego de este paso, el grupo Fmoc terminal se remueve con 20% piperidina en DMF y se acopla con ácido maleimido–propiónico (Bachem AG) por HBTU. Los péptidos intermediarios marcados con TAMRA se escindieron de la resina con 95:2,5:2,5 ácido trifluoroacético (TFA)/ TIS/ agua (v/v/v) durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación suave. La solución de escisión se filtró y se evaporó bajo corriente de nitrógeno para remover el TFA. Los intermediarios en bruto disueltos en una mezcla de agua y acetonitrilo se sometieron a purificación adicional por HPLC de fase inversa con una columna Jupiter 5µ C4 (5 µm, 10 mm x 250 mm) de Phenomenex. Luego de la liofilización, los intermediarios purificados se hicieron reaccionar con 10 eq. De NHS–fluoresceína (Thermo Scientific) en 50/50 de solución salina abuferada con fosfato (PBS)/ dimetilformamida (DMF) (v/v) durante 20 horas para marcar la amina libre en la lisina C terminal. El péptido FRET luego se purificó y se liofilicó como se describió antes. Todas las mezclas de reacción y los productos finales se analizaron y confirmaron por LC–MS.

Síntesis de fase sólida de ligadores: Todos los ligadores descritos se sintetizaron usando química de fase sólida Fmoc estándar usando un sintetizador de péptidos PS3 (Protein Technologies, Inc.). Se usó 0,1 mM de resina Fmoc–aminoácido–Wang (Novabiochem) para todos los ligadores, para generar un

carboxilo C terminal. Los ligadores se purificaron como se describe antes. La unión de la amina QSY7 (Invitrogen) se logró haciendo reaccionar ligadores purificados con 1,1 veces de exceso molar de amina QSY7, 1,1 veces de exceso molar de HATU y 2,2 veces de exceso molar de DIEA en DMF hasta el día siguiente a temperatura ambiente. Las especies de ligador–QSY7 luego se purificaron como se describe antes. Todas las mezclas de reacción y los productos finales se analizaron y confirmaron por LC–MS.

Ejemplo 32 Ensayos celulares de escisión FRET:

Los cultivos de Wood46 y USA300 se inocularon con una dilución 1:200 de cultivos durante toda la noche (0,1 ml en 20 ml) en TSB y se incubaron a 37°C con agitación. Las cepas se cultivaron hasta fase exponencial de crecimiento y se colocaron en placas a densidades celulares de 10^8 células/ml y 10^7 células/ml en caldo de soja tríptico (TSB). Se agregaron conjugados de tioMAB péptido FRET a las cavidades a una concentración final de péptido FRET de 2 µM. Las placas se incubaron a 37 °C y la fluorescencia se monitoreó en el tiempo, excitación λ 495 nm/ emisión λ 518 nm, durante 210 minutos.

Escisión de tioFAB péptido FRET y tioFAB mal–GGAFAGGG–DNA31 (“péptido central” divulgado como SEC. ID NRO.: 126) por sobrenantante activo concentrado: tioFAB S4497 conjugado con MP–Lys(TAMRA)–Gly–Gly–Ala–Phe–Ala–Gly–Gly–Gly–Lys(fluoresceína) (“péptido central” divulgado como SEC. ID NRO.: 125) o MP–Gly–Gly–Ala–Phe–Ala–Gly–Gly–Gly–(pipBOR) LA–59 (“péptido central” divulgado como SEC. ID NRO.: 126) se incubaron con sobrenadante de Wood46 concentrado que se había procesado como se describe antes. Se mezcló tioFAB S4497 y sobrenadante 1:1 sobre la base de los miligramos (25 µg de tioFAB S4497 con 25 µg de sobrenadante proteináceo) en PBS. Las muestras se incubaron durante 2 horas a 37 °C. A las 2 horas, la reacción se extinguió por

dilución 1:1 con 0,1% TFA. Las muestras se analizaron por LC–MS para determinar la canridad de escisión y productos de escisión.

Aunque la anterior invención ha sido descrita en cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo a los fines de la claridad de entendimiento, las descripciones y los ejemplos no deben interpretarse como una limitación al alcance de la invención. Las divulgaciones de todas las patentes y bibliografía científica citada en la presente se incorporan expresamente en su totalidad por referencia.

LISTADO DE SECIENCIAS

<110> GENENTECH, INC.

<120> ANTICUERPOS TEICOICOS ANTI-PARED Y CONJUGADOS

<130> P4960R1-WO

<140>
<141>

<150> 61/829,461
<151> 2013-05-31

<160> 180

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 1
Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Ser Arg Ala Asn Asn Asn Tyr Tyr Val
1 5 10 15

Ala

<210> 2
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 2
Trp Ala Ser Thr Arg Glu Phe
1 5

<210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 3
Gln Gln Tyr Tyr Thr Ser Arg Arg Thr
1 5

<210> 4
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 4
Asp Tyr Tyr Met His
1 5

<210> 5
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 5
Trp Ile Asn Pro Lys Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Arg Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 6
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 6
Asp Cys Gly Ser Gly Gly Leu Arg Asp Phe
1 5 10

<210> 7
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 7
Arg Ser Asn Gln Asn Leu Leu Ser Ser Ser Asn Asn Asn Tyr Leu Ala
1 5 10 15

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

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 8
Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 9
<211> 9

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 9
Gln Gln Tyr Tyr Ala Asn Pro Arg Thr
1 5

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

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 10
Asp Tyr Tyr Ile His
1 5

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

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 11
Trp Ile Asn Pro Asn Thr Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Gln Lys Phe Arg
1 5 10 15

Asp

<210> 12
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 12
Asp Cys Gly Arg Gly Gly Leu Arg Asp Ile
1 5 10

<210> 13
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 13
Lys Ser Asn Gln Asn Val Leu Ala Ser Ser Asn Asp Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 14
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 14
Trp Ala Ser Ile Arg Glu Ser
1 5

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

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 15
Gln Gln Tyr Tyr Thr Asn Pro Arg Thr
1 5

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

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 16
Asp Tyr Tyr Ile His
1 5

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

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 17
Trp Ile Asn Pro Asn Thr Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 18

<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 18
Asp Cys Gly Asn Ala Gly Leu Arg Asp Ile
1 5 10

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

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 19
Lys Ser Ser Gln Asn Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 20
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 20
Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 21
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 21
Gln Gln Tyr Tyr Thr Ser Pro Pro Tyr Thr
1 5 10

<210> 22
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 22

Ser Tyr Trp Ile Gly
1 5

<210> 23
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 23
Ile Ile His Pro Gly Asp Ser Lys Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 24
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 24
Leu Tyr Cys Ser Gly Gly Ser Cys Tyr Ser Asp Arg Ala Phe Ser Ser
1 5 10 15

Leu Gly Ala Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Gly Val
20 25

<210> 25
<211> 113
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
polypeptide"

<400> 25
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

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

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Phe Gly Val
50 55 60

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

Ile Asn Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Tyr Thr Ser Arg Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 26
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético polypeptide"

<400> 26
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Arg Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Gly Asp Thr Ser Ile Ser Ala Ala Tyr
65 70 75 80

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

Val Lys Asp Cys Gly Ser Gly Gly Leu Arg Asp Phe Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 27
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético polypeptide"

<400> 27
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ser Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
85 90 95

Tyr Ala Asn Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 28
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético polypeptide"

<400> 28
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Arg Val Glu Val Lys Arg Pro Gly Thr
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Thr Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Arg Asp Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ala Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Lys Asp Cys Gly Arg Gly Gly Leu Arg Asp Ile Trp Gly Pro Gly
100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 29
<211> 113
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético polypeptide"

<400> 29

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

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

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

Pro Leu Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ile Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

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

Ile Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Tyr Thr Asn Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Phe
100 105 110

Asn

<210> 30
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético polypeptide"

<400> 30
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Thr
1 5 10 15

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

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

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Thr Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ala Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Lys Asp Cys Gly Asn Ala Gly Leu Arg Asp Ile Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 31
<211> 114
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético polypeptide"

<400> 31
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Tyr Tyr Thr Ser Pro Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu
100 105 110

Ile Glu

<210> 32
<211> 138
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético polypeptide"

<400> 32
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

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

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Leu Tyr Cys Ser Gly Gly Ser Cys Tyr Ser Asp Arg Ala Phe
100 105 110

Ser Ser Leu Gly Ala Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Gly Val Trp
115 120 125

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 33
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 33
Arg Ala Ser Gln Thr Ile Ser Gly Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 34
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 34
Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser
1 5

<210> 35
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 35
Gln Gln Tyr Lys Ser Tyr Ser Phe Asn
1 5

<210> 36
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 36
Ser Tyr Asp Ile Asn
1 5

<210> 37
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 37
Trp Met Asn Ala Asn Ser Gly Asn Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 38
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 38
Ser Ser Ile Leu Val Arg Gly Ala Leu Gly Arg Tyr Phe Asp Leu
1 5 10 15

<210> 39
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 39
Arg Ala Ser Gln Thr Ile Ser Gly Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 40
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 40
Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser
1 5

<210> 41
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 41
Gln Gln Tyr Lys Ser Tyr Ser Phe Asn
1 5

<210> 42
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 42
Ser Tyr Asp Ile Asn
1 5

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

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 43
Trp Met Asn Ala Asn Ser Gly Asn Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 44
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 44
Ser Ser Ile Leu Val Arg Gly Ala Leu Gly Arg Tyr Phe Asp Leu
1 5 10 15

<210> 45
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 45
Arg Ala Ser Gln Phe Val Ser Arg Thr Ser Leu Ala
1 5 10

<210> 46
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 46
Glu Thr Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 47
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 47
His Lys Tyr Gly Ser Gly Pro Arg Thr
1 5

<210> 48
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 48
Asn Tyr Asp Phe Ile
1 5

<210> 49
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 49
Trp Met Asn Pro Asn Ser Tyr Asn Thr Gly Tyr Gly Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 50
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 50
Ala Val Arg Gly Gln Leu Leu Ser Glu Tyr
1 5 10

<210> 51
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 51
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 52
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 52
Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 53
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 53
Gln Lys Tyr Gly Ser Thr Pro Arg Pro
1 5

<210> 54
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 54
Ser Tyr Asp Ile Asn
1 5

<210> 55
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 55
Trp Met Asn Pro Asn Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Arg Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 56
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 56
Glu Arg Trp Ser Lys Asp Thr Gly His Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
1 5 10 15

Val

<210> 57
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 57
Arg Ala Ser Leu Asp Ile Thr Asn His Leu Ala
1 5 10

<210> 58
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 58
Glu Ala Ser Ile Leu Gln Ser
1 5

<210> 59
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 59
Glu Lys Cys Asn Ser Thr Pro Arg Thr
1 5

<210> 60
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 60
Asn Tyr Asp Ile Asn
1 5

<210> 61
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 61
Trp Met Asn Pro Ser Ser Gly Arg Thr Gly Tyr Ala Pro Lys Phe Arg
1 5 10 15

Gly

<210> 62
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 62
Gly Gly Gly Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Asn Tyr His Ile Ser Gly Leu
1 5 10 15

Asp Val

<210> 63
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 63
Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Ala Ile Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 64
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 64
Gly Val Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 65
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 65
Gln Leu Tyr Thr Ser Ser Arg Ala Leu Thr
1 5 10

<210> 66
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 66
Ala Tyr Ala Met Asn
1 5

<210> 67
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 67
Ser Ile Thr Lys Asn Ser Asp Ser Leu Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 68
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 68
Leu Ala Ala Arg Ile Met Ala Thr Asp Tyr
1 5 10

<210> 69

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

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 69
Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Gly Leu Gly
1 5 10

<210> 70
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 70
Pro Ala Ser Thr Leu Glu Ser
1 5

<210> 71
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 71
Leu Gln Asp His Asn Tyr Pro Pro Thr
1 5

<210> 72
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 72
Tyr Tyr Ser Met Ile
1 5

<210> 73
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 73
Ser Ile Asp Ser Ser Ser Arg Tyr Leu Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 74
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 74
Asp Gly Asp Asp Ile Leu Ser Val Tyr Arg Gly Ser Gly Arg Pro Phe
1 5 10 15

Asp Tyr

<210> 75
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 75
Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Gly Leu Gly
1 5 10

<210> 76
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 76
Pro Ala Ser Thr Leu Glu Ser
1 5

<210> 77
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 77
Leu Gln Asp His Asn Tyr Pro Pro Ser
1 5

<210> 78
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 78
Tyr Tyr Ser Met Ile
1 5

<210> 79
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 79
Ser Ile Asp Ser Ser Ser Arg Tyr Arg Tyr Tyr Thr Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 80
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 80
Asp Gly Asp Asp Ile Leu Ser Val Tyr Gln Gly Ser Gly Arg Pro Phe
1 5 10 15

Asp Tyr

<210> 81
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 81
Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Thr Asn Val Ala
1 5 10

<210> 82
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 82
Gly Ala Ser Thr Arg Ala Ser
1 5

<210> 83
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 83
Leu Gln Tyr Asn Thr Trp Pro Arg Thr
1 5

<210> 84
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 84
Thr Asn Asp Met Ser
1 5

<210> 85
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 85
Thr Ile Ile Gly Ile Asp Asp Thr Thr His Tyr Ala Asp Ser Val Arg
1 5 10 15

Gly

<210> 86
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 86
Asn Ser Gly Ile Tyr Ser Phe
1 5

<210> 87
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 87
Arg Ala Ser Gln Asp Ile Gly Ser Ser Leu Ala
1 5 10

<210> 88
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 88
Ala Thr Ser Thr Leu Gln Ser
1 5

<210> 89
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 89
Gln Gln Leu Asn Asn Tyr Val His Ser
1 5

<210> 90
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 90
Asp Tyr Ala Met Gly
1 5

<210> 91
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 91
Val Val Thr Gly His Ser Tyr Arg Thr His Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 92
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 92
Arg Ile Trp Ser Tyr Gly Asp Asp Ser Phe Asp Val
1 5 10

<210> 93
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 93
Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Asp Arg Leu Ala
1 5 10

<210> 94
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 94
Trp Ala Ser Asn Leu Glu Gly
1 5

<210> 95
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 95
Gln Gln Tyr Lys Ser Gln Trp Ser
1 5

<210> 96
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 96
Ser Tyr Ala Met Asn
1 5

<210> 97
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 97
Tyr Ile Ser Ser Ile Glu Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
1 5 10 15

<210> 98
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 98
Asp Arg Leu Val Asp Val Pro Leu Ser Ser Pro Asn Ser
1 5 10

<210> 99
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 99
Lys Ser Ser Gln Ser Ile Phe Arg Thr Ser Arg Asn Lys Asn Leu Leu
1 5 10 15

Asn

<210> 100
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 100
Trp Ala Ser Thr Arg Lys Ser
1 5

<210> 101
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 101
Gln Gln Tyr Phe Ser Pro Pro Tyr Thr
1 5

<210> 102
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético péptido"

<400> 102
Ser Phe Trp Met His
1 5

<210> 103
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético péptido"

<400> 103
Phe Thr Asn Asn Glu Gly Thr Thr Thr Ala Tyr Ala Asp Ser Val Arg
1 5 10 15

Gly

<210> 104
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético péptido"

<400> 104
Gly Asp Gly Gly Leu Asp Asp
1 5

<210> 105
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético péptido"

<400> 105
Arg Ala Ser Gln Phe Thr Asn His Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 106
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 106
Val Ala Ser Asn Leu Gln Ser
1 5

<210> 107
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 107
Gln Gln Ser Tyr Arg Thr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 108
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 108
Ser Gly Tyr Tyr Asn
1 5

<210> 109
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 109
Tyr Ile Leu Ser Gly Ala His Thr Asp Ile Lys Ala Ser Leu Gly Ser
1 5 10 15

<210> 110
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 110
Ser Gly Val Tyr Ser Lys Tyr Ser Leu Asp Val
1 5 10

<210> 111
<211> 107
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
polypeptide"

<400> 111
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ile Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Ser Gly Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Ala Glu Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser 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 Phe Gly Ile Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Lys Ser Tyr Ser Phe
85 90 95

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

<210> 112
<211> 124
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
polypeptide"

<220>
<221> VARIANT
<222> (1)..(1)
<223> /replace="Glu"

<220>
<221> VARIANT
<222> (2)..(2)
<223> /replace="Ile" or "Val"

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(124)
<223> /nota="Variant residues given in the sequence have no
preference with respect to those in the annotations for
variant positions"

<400> 112
Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

```
Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Pro Glu Trp Met
        35                  40                  45

Gly Trp Met Asn Ala Asn Ser Gly Asn Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe
    50                  55                  60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Gly Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

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

Ala Arg Ser Ser Ile Leu Val Arg Gly Ala Leu Gly Arg Tyr Phe Asp
            100                 105                 110

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


<210> 113
<211> 214
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
      polypeptide"

<400> 113
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ile Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                   10                  15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Ser Gly Trp
            20                  25                  30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Ala Glu Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser 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 Phe Gly Ile Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Lys Ser Tyr Ser Phe
                85                  90                  95

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 114
<211> 453
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético polypeptide"

<400> 114

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

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

Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Pro Glu Trp Met
        35                  40                  45

Gly Trp Met Asn Ala Asn Ser Gly Asn Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe
    50                  55                  60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Gly Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

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

Ala Arg Ser Ser Ile Leu Val Arg Gly Ala Leu Gly Arg Tyr Phe Asp
            100                 105                 110

Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
        115                 120                 125

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

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

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
                165                 170                 175

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

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
195 200 205

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
210 215 220

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
405 410 415

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

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

Ser Leu Ser Pro Gly
450

<210> 115
<211> 214
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético polypeptide"

<400> 115
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ile Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Ser Gly Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Ala Glu Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser 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 Phe Gly Ile Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Lys Ser Tyr Ser Phe
85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 116
<211> 453
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético polypeptide"

<220>
<221> VARIANT
<222> (2)..(2)
<223> /replace="Ile" or "Val"

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(453)
<223> /nota="Variant residues given in the sequence have no preference with respect to those in the annotations for variant positions"

<400> 116
Glu Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Pro Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Met Asn Ala Asn Ser Gly Asn Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Gly Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Ser Ile Leu Val Arg Gly Ala Leu Gly Arg Tyr Phe Asp
100 105 110

Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
115 120 125

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

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

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
165 170 175

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

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
195 200 205

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
210 215 220

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
                405                 410                 415

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

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

Ser Leu Ser Pro Gly
    450


<210> 117
<211> 453
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
      polypeptide"


<220>
<221> VARIANT
<222> (2)..(2)
<223> /replace="Ile" or "Val"

<220>
<221> misc_feature
```

<222> (1)..(453)
<223> /nota="Variant residues given in the sequence have no preference with respect to those in the annotations for variant positions"

<400> 117

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

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

Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Pro Glu Trp Met
        35                  40                  45

Gly Trp Met Asn Ala Asn Ser Gly Asn Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe
    50                  55                  60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Gly Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

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

Ala Arg Ser Ser Ile Leu Val Arg Gly Ala Leu Gly Arg Tyr Phe Asp
            100                 105                 110

Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Cys Ser Thr Lys
        115                 120                 125

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

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

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
                165                 170                 175

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

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
        195                 200                 205

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
    210                 215                 220

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
225                 230                 235                 240

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

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

```
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
        275                 280                 285

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

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

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

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

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

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

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

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
                405                 410                 415

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

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

Ser Leu Ser Pro Gly
    450
```

<210> 118
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético péptido"

<400> 118
Gly Glu Gly Gly Leu Asp Asp
1   5

<210> 119
<211> 113
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético polypeptide"

<400> 119

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

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

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

Pro Pro Arg Leu Leu Ile His Trp Ala Ser Thr Arg Lys Ser Gly Val
    50                  55                  60

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

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

Tyr Phe Ser Pro Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
            100                 105                 110

Lys
```

<210> 120
<211> 116
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético polypeptide"

<400> 120

```
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 Ser Ala Ser Gly Phe Ser Phe Asn Ser Phe
            20                  25                  30

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

Ser Phe Thr Asn Asn Glu Gly Thr Thr Thr Ala Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

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

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

Ala Arg Gly Asp Gly Gly Leu Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
            100                 105                 110

Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 121
<211> 220
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético polypeptide"

<400> 121
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

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

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

Pro Pro Arg Leu Leu Ile His Trp Ala Ser Thr Arg Lys Ser Gly Val
50 55 60

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

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

Tyr Phe Ser Pro Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
115 120 125

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
130 135 140

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
145 150 155 160

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
165 170 175

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
180 185 190

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

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215 220

<210> 122
<211> 445
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético polypeptide"

<400> 122
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 Ser Ala Ser Gly Phe Ser Phe Asn Ser Phe
20 25 30

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

Ser Phe Thr Asn Asn Glu Gly Thr Thr Thr Ala Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Glu Gly Gly Leu Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
340 345 350

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

<210> 123
<211> 220
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético polypeptide"

<400> 123
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

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

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

Pro Pro Arg Leu Leu Ile His Trp Ala Ser Thr Arg Lys Ser Gly Val
50 55 60

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

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

Tyr Phe Ser Pro Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
115 120 125

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
130 135 140

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
145 150 155 160

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
165 170 175

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
180 185 190

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

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215 220

<210> 124
<211> 444
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético polypeptide"

<400> 124
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 Ser Ala Ser Gly Phe Ser Phe Asn Ser Phe
20 25 30

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

Ser Phe Thr Asn Asn Glu Gly Thr Thr Thr Ala Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Glu Gly Gly Leu Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

```
Thr Val Ser Ser Cys Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
        115                 120                 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
    130                 135                 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145                 150                 155                 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
                165                 170                 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
            180                 185                 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
        195                 200                 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
    210                 215                 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
225                 230                 235                 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
                245                 250                 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
            260                 265                 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
        275                 280                 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
    290                 295                 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305                 310                 315                 320

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
                325                 330                 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
            340                 345                 350

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
        355                 360                 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
    370                 375                 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385                 390                 395                 400
```

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440

<210> 125
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético péptido"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Lys(TAMRA)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> Lys(fluorescein)

<400> 125
Lys Gly Gly Ala Phe Ala Gly Gly Gly Lys
1 5 10

<210> 126
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético péptido"

<400> 126
Gly Gly Ala Phe Ala Gly Gly Gly
1 5

<210> 127
<211> 448
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético polypeptide"

<400> 127
Gln Met Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

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

Tyr Tyr Asn Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Gly Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

```
Ala Tyr Ile Leu Ser Gly Ala His Thr Asp Ile Lys Ala Ser Leu Gly
    50                  55                  60

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

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

Arg Ser Gly Val Tyr Ser Lys Tyr Ser Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
        115                 120                 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
    130                 135                 140

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

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
                165                 170                 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
            180                 185                 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
        195                 200                 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
    210                 215                 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225                 230                 235                 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
                245                 250                 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
            260                 265                 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
        275                 280                 285

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

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305                 310                 315                 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
                325                 330                 335
```

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

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

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

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

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

<210> 128
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 128
Leu Ala Phe Gly
1

<210> 129
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> Ile(me)

<400> 129
Gly Pro Ile Leu Phe Phe
1 5

<210> 130
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 130
Gly Pro Ile Leu Phe Phe
1 5

<210> 131
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético péptido"

<400> 131
Gly Gly Ala Phe Ala
1 5

<210> 132
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético péptido"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(6)
<223> Any amino acid

<220>
<221> MOD_RES
<222> (9)..(9)
<223> DPA

<400> 132
Gly Gly Gly Xaa Xaa Xaa Gly Gly Xaa Lys Lys
1 5 10

<210> 133
<211> 450
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético polypeptide"

<400> 133
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

Ser Val Val Thr Gly His Ser Tyr Arg Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

```
Lys Gly Arg Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe
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 Arg Ile Trp Ser Tyr Gly Asp Asp Ser Phe Asp Val Trp Gly
            100                 105                 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
        115                 120                 125

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

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

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

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
            180                 185                 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
        195                 200                 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
    210                 215                 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
225                 230                 235                 240

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

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

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

Pro Gly
450

<210> 134
<211> 450
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético polypeptide"

<400> 134
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val 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 Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Tyr Ile Ser Ser Ile Glu Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

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

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

Arg Asp Arg Leu Val Asp Val Pro Leu Ser Ser Pro Asn Ser Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

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

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

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

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
            180                 185                 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
        195                 200                 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
    210                 215                 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
225                 230                 235                 240

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
                405                 410                 415

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

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

Pro Gly
450

<210> 135
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético péptido"

<400> 135
Leu Ala Phe Gly Ala
1 5

<210> 136
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético péptido"

<400> 136
Leu Ala Phe Ala Ala
1 5

<210> 137
<211> 446
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético polypeptide"

<400> 137
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 Ser Ala Ser Gly Phe Ser Phe Asn Ser Phe
20 25 30

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

Ser Phe Thr Asn Asn Glu Gly Thr Thr Thr Ala Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Asp Gly Gly Leu Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

```
Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
        115                 120                 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
    130                 135                 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145                 150                 155                 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
                165                 170                 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
            180                 185                 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
        195                 200                 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
    210                 215                 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
225                 230                 235                 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
                245                 250                 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
            260                 265                 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
        275                 280                 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
    290                 295                 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305                 310                 315                 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
                325                 330                 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
            340                 345                 350

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
        355                 360                 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
    370                 375                 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385                 390                 395                 400
```

```
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
                405                 410                 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
            420                 425                 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
        435                 440                 445


<210> 138
<211> 445
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
      polypeptide"

<400> 138
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 Ser Ala Ser Gly Phe Ser Phe Asn Ser Phe
            20                  25                  30

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

Ser Phe Thr Asn Asn Glu Gly Thr Thr Thr Ala Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

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

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

Ala Arg Gly Asp Gly Gly Leu Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
            100                 105                 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
        115                 120                 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
    130                 135                 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145                 150                 155                 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
                165                 170                 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
            180                 185                 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
        195                 200                 205
```

```
Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
    210                 215                 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
225                 230                 235                 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
                245                 250                 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
            260                 265                 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
        275                 280                 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
    290                 295                 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305                 310                 315                 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
                325                 330                 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
            340                 345                 350

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
        355                 360                 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
    370                 375                 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385                 390                 395                 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
                405                 410                 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
            420                 425                 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
        435                 440                 445


<210> 139
<211> 453
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
      polypeptide"

<400> 139
Glu Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1               5                   10                  15
```

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

Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Pro Glu Trp Met
        35                  40                  45

Gly Trp Met Asn Ala Asn Ser Gly Asn Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe
    50                  55                  60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Gly Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

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

Ala Arg Ser Ser Ile Leu Val Arg Gly Ala Leu Gly Arg Tyr Phe Asp
            100                 105                 110

Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Cys Ser Thr Lys
        115                 120                 125

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

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

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
                165                 170                 175

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

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
        195                 200                 205

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
    210                 215                 220

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
225                 230                 235                 240

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

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

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

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
    290                 295                 300
```

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

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

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

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

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

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

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
                405                 410                 415

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

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

Ser Leu Ser Pro Gly
    450


<210> 140
<211> 453
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
      polypeptide"

<400> 140
Glu Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1               5                   10                  15

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

Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Pro Glu Trp Met
        35                  40                  45

Gly Trp Met Asn Ala Asn Ser Gly Asn Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe
    50                  55                  60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Gly Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

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

```
Ala Arg Ser Ser Ile Leu Val Arg Gly Ala Leu Gly Arg Tyr Phe Asp
            100                 105                 110

Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
        115                 120                 125

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

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

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
                165                 170                 175

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

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
        195                 200                 205

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
    210                 215                 220

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
225                 230                 235                 240

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
405 410 415

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

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

Ser Leu Ser Pro Gly
450

<210> 141
<211> 453
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético polypeptide"

<400> 141
Glu Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Pro Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Met Asn Ala Asn Ser Gly Asn Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Gly Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Ser Ile Leu Val Arg Gly Ala Leu Gly Arg Tyr Phe Asp
100 105 110

Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Cys Ser Thr Lys
115 120 125

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

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

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
165 170 175

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

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
        195                 200                 205

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
    210                 215                 220

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
225                 230                 235                 240

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
                405                 410                 415

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

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

Ser Leu Ser Pro Gly
    450
```

<210> 142

<211> 453
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético polypeptide"

<400> 142
Glu Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Pro Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Met Asn Ala Asn Ser Gly Asn Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Gly Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Ser Ile Leu Val Arg Gly Ala Leu Gly Arg Tyr Phe Asp
100 105 110

Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
115 120 125

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

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

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
165 170 175

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

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
195 200 205

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
210 215 220

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
                405                 410                 415

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

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

Ser Leu Ser Pro Gly
    450
```

<210> 143
<211> 453
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético polypeptide"

<400> 143

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

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

Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Pro Glu Trp Met
        35                  40                  45
```

```
Gly Trp Met Asn Ala Asn Ser Gly Asn Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe
    50                  55                  60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Gly Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

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

Ala Arg Ser Ser Ile Leu Val Arg Gly Ala Leu Gly Arg Tyr Phe Asp
            100                 105                 110

Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Cys Ser Thr Lys
        115                 120                 125

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

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

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
                165                 170                 175

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

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
        195                 200                 205

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
    210                 215                 220

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
225                 230                 235                 240

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
405 410 415

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

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

Ser Leu Ser Pro Gly
450

<210> 144
<211> 453
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético polypeptide"

<400> 144
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Pro Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Met Asn Ala Asn Ser Gly Asn Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Gly Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Ser Ile Leu Val Arg Gly Ala Leu Gly Arg Tyr Phe Asp
100 105 110

Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
115 120 125

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

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

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
                165                 170                 175

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

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
        195                 200                 205

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
    210                 215                 220

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
225                 230                 235                 240

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
                405                 410                 415
```

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

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

Ser Leu Ser Pro Gly
    450
```

<210> 145
<211> 220
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético polypeptide"

<400> 145

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

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

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

Pro Pro Arg Leu Leu Ile His Trp Ala Ser Thr Arg Lys Ser Gly Val
    50                  55                  60

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

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

Tyr Phe Ser Pro Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
            100                 105                 110

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
        115                 120                 125

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
    130                 135                 140

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
145                 150                 155                 160

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
                165                 170                 175

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
            180                 185                 190

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

Ser Pro Cys Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215 220

<210> 146
<211> 445
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético polypeptide"

<400> 146
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 Ser Ala Ser Gly Phe Ser Phe Asn Ser Phe
20 25 30

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

Ser Phe Thr Asn Asn Glu Gly Thr Thr Thr Ala Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Asp Gly Gly Leu Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
340 345 350

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

<210> 147
<211> 445
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético polypeptide"

<400> 147
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 Ser Ala Ser Gly Phe Ser Phe Asn Ser Phe
20 25 30

```
Trp Met His Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Ile
        35                  40                  45

Ser Phe Thr Asn Asn Glu Gly Thr Thr Thr Ala Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

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

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

Ala Arg Gly Glu Gly Gly Leu Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
            100                 105                 110

Thr Val Ser Ser Cys Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
        115                 120                 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
    130                 135                 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145                 150                 155                 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
                165                 170                 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
            180                 185                 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
        195                 200                 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
    210                 215                 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
225                 230                 235                 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
                245                 250                 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
            260                 265                 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
        275                 280                 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
    290                 295                 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305                 310                 315                 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
                325                 330                 335
```

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
340 345 350

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

<210> 148
<211> 330
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 148
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 149
<211> 330
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 149
Cys Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

```
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
            100                 105                 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
        115                 120                 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
    130                 135                 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145                 150                 155                 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
                165                 170                 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
            180                 185                 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
        195                 200                 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
    210                 215                 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225                 230                 235                 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
                245                 250                 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
            260                 265                 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
        275                 280                 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
    290                 295                 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305                 310                 315                 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                325                 330


<210> 150
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 150
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1               5                   10                  15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
            20                  25                  30
```

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 151
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 151
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Cys Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 152
<211> 42
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético oligonucleotide"

<400> 152
cccagactgc accagctgga tctctgaatg tactccagtt gc 42

<210> 153
<211> 41
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético oligonucleotide"

<400> 153
ccagactgca ccagctgcac ctctgaatgt actccagttg c 41

<210> 154
<211> 61
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético oligonucleotide"

<400> 154
ccagggttcc ctggccccaw tmgtcaagtc cascwkcacc tcttgcacag taatagacag 60

c 61

<210> 155
<211> 52
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético oligonucleotide"

<400> 155
cctggcccca gtcgtcaagt cctccttcac ctcttgcaca gtaatagaca gc 52

<210> 156
<211> 116
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético polypeptide"

<400> 156
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 Ser Ala Ser Gly Phe Ser Phe Asn Ser Phe
20 25 30

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

Ser Phe Thr Asn Asn Glu Gly Thr Thr Thr Ala Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Glu Gly Gly Leu Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 157
<211> 445
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético polypeptide"

<400> 157
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 Ser Ala Ser Gly Phe Ser Phe Asn Ser Phe
20 25 30

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

Ser Phe Thr Asn Asn Glu Gly Thr Thr Thr Ala Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Glu Gly Gly Leu Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
340 345 350

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

<210> 158
<211> 214
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético polypeptide"

<400> 158
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ile Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Ser Gly Trp

```
            20                  25                  30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Ala Glu Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser 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 Phe Gly Ile Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Lys Ser Tyr Ser Phe
                85                  90                  95

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210


<210> 159
<211> 215
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
      polypeptide"

<400> 159
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1               5                   10                  15

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

Ser Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Arg Leu Leu
        35                  40                  45
```

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys His Lys Tyr Gly Ser Gly Pro
85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 160
<211> 215
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético polypeptide"

<400> 160
Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 161
<211> 214
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético polypeptide"

<400> 161
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Ser Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Leu Asp Ile Thr Asn His
20 25 30

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

Tyr Glu Ala Ser Ile 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 Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Glu Lys Cys Asn Ser Thr Pro Arg
85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 162
<211> 216
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético polypeptide"

<400> 162
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

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

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Glu Pro Gly Arg Ala Pro Thr Leu Leu
35 40 45

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 163
<211> 214
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético polypeptide"

<400> 163
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asp His Asn Tyr Pro Pro
85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 164
<211> 214
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético polypeptide"

<400> 164
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asp His Asn Tyr Pro Pro
85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 165
<211> 214
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético polypeptide"

<400> 165
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 166
<211> 214
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético polypeptide"

<400> 166
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Gly Ser Ser
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu Asn Asn Tyr Val His
85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 167
<211> 213
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético polypeptide"

<400> 167
Glu Thr Thr Leu 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 Gly Asp Arg
20 25 30

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

Tyr Trp Ala Ser Asn Leu Glu Gly Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Asp Asp Leu Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Lys Ser Gln Trp Ser
85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 168
<211> 214
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético polypeptide"

<400> 168
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Phe Thr Asn His Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Ser Arg Leu Glu Met Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 169
<211> 453
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
polypeptide"

<400> 169
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

```
Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Pro Glu Trp Met
        35                  40                  45

Gly Trp Met Asn Ala Asn Ser Gly Asn Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe
    50                  55                  60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Gly Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

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

Ala Gly Ser Ser Ile Leu Val Arg Gly Ala Leu Gly Arg Tyr Phe Asp
            100                 105                 110

Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
        115                 120                 125

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

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

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
                165                 170                 175

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

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
        195                 200                 205

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
    210                 215                 220

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
225                 230                 235                 240

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
405 410 415

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

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

Ser Leu Ser Pro Gly
450

<210> 170
<211> 448
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético polypeptide"

<400> 170
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Leu Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Ile Ile Asn Tyr
20 25 30

Asp Phe Ile Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Pro Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Met Asn Pro Asn Ser Tyr Asn Thr Gly Tyr Gly Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Trp Asp Ser Ser Met Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ala Val Arg Gly Gln Leu Leu Ser Glu Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

```
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
        115                 120                 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
    130                 135                 140

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

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
                165                 170                 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
            180                 185                 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
        195                 200                 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
    210                 215                 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225                 230                 235                 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
                245                 250                 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
            260                 265                 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
        275                 280                 285

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

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305                 310                 315                 320

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

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

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

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

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

```
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
                405                 410                 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
            420                 425                 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
        435                 440                 445
```

<210> 171
<211> 455
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético polypeptide"

<400> 171

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

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

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

Gly Trp Met Asn Pro Asn Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Arg Phe
    50                  55                  60

Gln Gly Arg Leu Thr Met Thr Lys Asn Thr Ser Ile Asn Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

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

Ala Thr Glu Arg Trp Ser Lys Asp Thr Gly His Tyr Tyr Tyr Tyr Gly
            100                 105                 110

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

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

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

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

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

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
        195                 200                 205
```

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

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
225                 230                 235                 240

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
                245                 250                 255

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

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
        275                 280                 285

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
    290                 295                 300

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

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
                325                 330                 335

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

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

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
    370                 375                 380

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
385                 390                 395                 400

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
                405                 410                 415

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

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

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
    450                 455


<210> 172
<211> 456
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
      polypeptide"
```

<400> 172
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Arg Pro Gly Ala
1   5   10   15

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

Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
        35   40   45

Gly Trp Met Asn Pro Ser Ser Gly Arg Thr Gly Tyr Ala Pro Lys Phe
    50   55   60

Arg Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Ser Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65   70   75   80

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

Ala Arg Gly Gly Gly Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Asn Tyr His Ile Ser
            100   105   110

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

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

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

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

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

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

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

Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
225   230   235   240

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
                245   250   255

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

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
        275   280   285

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
290 295 300

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

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
325 330 335

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

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

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
370 375 380

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
385 390 395 400

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
405 410 415

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
420 425 430

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
450 455

<210> 173
<211> 448
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético polypeptide"

<400> 173
Gln Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Gly Gly Leu Ile Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

Ser Ser Ile Thr Lys Asn Ser Asp Ser Leu Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Thr Leu Ala Ala Arg Ile Met Ala Thr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
        115                 120                 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
    130                 135                 140

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

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
                165                 170                 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
            180                 185                 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
        195                 200                 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
    210                 215                 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225                 230                 235                 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
                245                 250                 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
            260                 265                 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
        275                 280                 285

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

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305                 310                 315                 320

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

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

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

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

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

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

<210> 174
<211> 456
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético polypeptide"

<400> 174
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

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

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

Ser Ser Ile Asp Ser Ser Ser Arg Tyr Leu Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Gly Asp Asp Ile Leu Ser Val Tyr Arg Gly Ser Gly Arg
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
225                 230                 235                 240

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
                245                 250                 255

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

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
        275                 280                 285

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
    290                 295                 300

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

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
                325                 330                 335

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

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

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
    370                 375                 380

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
385                 390                 395                 400

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
                405                 410                 415

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
            420                 425                 430

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
    450                 455
```

<210> 175

<211> 456
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético polypeptide"

<400> 175
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Asn Pro Gly Glu
1 5 10 15

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

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

Ser Ser Ile Asp Ser Ser Ser Arg Tyr Arg Tyr Tyr Thr Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Gly Asp Asp Ile Leu Ser Val Tyr Gln Gly Ser Gly Arg
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
225 230 235 240

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
245 250 255

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

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
        275                 280                 285

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
    290                 295                 300

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

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
                325                 330                 335

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

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

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
    370                 375                 380

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
385                 390                 395                 400

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
                405                 410                 415

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
            420                 425                 430

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
    450                 455


<210> 176
<211> 445
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
      polypeptide"

<400> 176
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Gly Gly Leu Glu Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

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

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

```
Ser Thr Ile Ile Gly Ile Asp Asp Thr Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

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

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

Val Lys Asn Ser Gly Ile Tyr Ser Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
            100                 105                 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
        115                 120                 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
    130                 135                 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145                 150                 155                 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
                165                 170                 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
            180                 185                 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
        195                 200                 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
    210                 215                 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
225                 230                 235                 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
                245                 250                 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
            260                 265                 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
        275                 280                 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
    290                 295                 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305                 310                 315                 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
                325                 330                 335
```

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
340 345 350

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

<210> 177
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 177
Ala Arg Gly Asp Gly Gly Leu
1 5

<210> 178
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 178
Ala Arg Gly Asp Ala Gly Leu
1 5

<210> 179
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 179
Ala Arg Gly Glu Gly Gly Leu
1 5

<210> 180

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

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia artificial: Sintético
péptido"

<400> 180
Ala Arg Gly Ala Gly Gly Leu
1 5

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal anti-WTA (ácido teicoico de pared) aislado que comprende una cadena ligera (L) y una cadena pesada (H), en donde:

(a) la cadena L comprende la CDR L1 que comprende la secuencia de KSSQSVLSRANNNYYVA (SEQ ID NO:1), CDR L2 que comprende la secuencia de WASTREF (SEQ ID NO:2), y CDR L3 que comprende la secuencia de QQYYTSRRT (SEQ ID NO:3); y la cadena H comprende la CDR H1 que comprende la secuencia de DYYMH (SEQ ID NO:4), CDR H2 que comprende la secuencia de WINPKSGGTNYAQRFQG (SEQ ID NO:5), y CDR H3 que comprende la secuencia de DCGSGGLRDF (SEQ ID NO:6);

(b) la cadena L comprende la CDR L1 que comprende la secuencia de RSNQNLLSSSNNNYLA (SEQ ID NO:7), CDR L2 que comprende la secuencia de WASTRES (SEQ ID NO:8), y CDR L3 que comprende la secuencia de QQYYANPRT (SEQ ID NO:9); y la cadena H comprende la CDR H1 que comprende la secuencia de DYYIH (SEQ ID NO:10), CDR H2 que comprende la secuencia de WINPNTGGTYYAQKFRD (SEQ ID NO:11), y CDR H3 que comprende la secuencia de DCGRGGLRDI (SEQ ID NO:12);

(c) la cadena L comprende la CDR L1 que comprende la secuencia de KSNQNVLASSNDKNYLA (SEQ ID NO:13), CDR L2 que comprende la secuencia de WASIRES (SEQ ID NO:14), y CDR L3 que comprende la secuencia de QQYYTNPRT (SEQ ID NO:15); y la cadena H comprende la CDR H1 que comprende la secuencia de DYYIH (SEQ ID NO:16), CDR H2 que comprende la

secuencia de WINPNTGGTNYAQKFQG (SEQ ID NO:17), y CDR H3 que comprende la secuencia de DCGNAGLRDI (SEQ ID NO:18); o

(d) la cadena L comprende la CDR L1 que comprende la secuencia de KSSQNVLYSSNNKNYLA (SEQ ID NO:19), CDR L2 que comprende la secuencia de WASTRES (SEQ ID NO:20), y CDR L3 que comprende la secuencia de QQYYTSPPYT (SEQ ID NO:21); y la cadena H comprende la CDR H1 que comprende la secuencia de SYWIG (SEQ ID NO:22), CDR H2 que comprende la secuencia de IIHPGDSKTRYSPSFQG (SEQ ID NO:23), y CDR H3 que comprende la secuencia de LYCSGGSCYSDRAFSSLGAGGYYYYGMGV (SEQ ID NO:24).

2. Un anticuerpo monoclonal anti-WTA aislado que comprende una cadena de región variable pesada (VH), en donde la VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia sobre la longitud de la secuencia VH seleccionada de la SEQ ID NO. 26, SEQ ID NO. 28, SEQ ID NO. 30, y SEQ ID NO. 32.

3. El anticuerpo de la reivindicación 2, que comprende adicionalmente una región variable de cadena L (VL) en donde la VL comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia sobre la longitud de la secuencia VL seleccionada de la SEQ ID NO. 25, SEQ ID NO. 27, SEQ ID NO. 29, y SEQ ID NO. 31.

4. Un anticuerpo monoclonal anti-WTA aislado que comprende una región variable de cadena ligera (VL), en donde la VL comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia

sobre la longitud de la secuencia VL seleccionada de la SEQ ID NO. 25, SEQ ID NO. 27, SEQ ID NO. 29, y SEQ ID NO. 31.

5. El anticuerpo de la reivindicación 3, en donde el anticuerpo comprende:

(i) la VL comprende la secuencia de la SEQ ID NO. 25 y la VH comprende la secuencia de la SEQ ID NO. 26;

(ii) la VL comprende la secuencia de la SEQ ID NO. 27 y la VH comprende la secuencia de la SEQ ID NO. 28;

(iii) la VL comprende la secuencia de la SEQ ID NO. 29 y la VH comprende la secuencia de la SEQ ID NO. 30; o

(iv) la VL comprende la secuencia de la SEQ ID NO. 31 y la VH comprende la secuencia de la SEQ ID NO. 32.

6. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el anticuerpo es un fragmento de unión a antígeno que carece de una región Fc.

7. El anticuerpo de la reivindicación 6, en donde el anticuerpo es un F(ab) o $F(ab')_2$.

8. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el anticuerpo comprende adicionalmente una región constante de cadena pesada y/o una región constante de cadena ligera, en donde la región

constante de cadena pesada y/o la región constante de cadena ligera comprenden uno o más aminoácidos que se sustituyen con residuos de cisteína.

9. El anticuerpo de la reivindicación 8, en donde la región constante de cadena pesada comprende sustitución de aminoácidos A118C, y/o la región constante de cadena ligera comprende sustitución de aminoácidos V205C, en donde la numeración es de acuerdo con la numeración EU.

10. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el anticuerpo comprende adicionalmente una región constante de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:149 y/o una región constante de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:151.

11. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el anticuerpo comprende adicionalmente una región constante de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:149 y una región constante de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:150.

12. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el anticuerpo comprende adicionalmente una región constante de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:148 y una región constante de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:151.

13. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde el anticuerpo une el WTA alfa.

14. Un anticuerpo monoclonal anti-WTA (ácido teicoico de pared) aislado que comprende una cadena ligera (L) y una cadena pesada (H), en donde:

(a) la cadena L comprende la CDR L1 que comprende la secuencia de RASQTISGWLA (SEQ ID NO:33), CDR L2 que comprende la secuencia de KASTLES (SEQ ID NO:34), y CDR L3 que comprende la secuencia de QQYKSYSFN (SEQ ID NO:35); y la cadena H comprende la CDR H1 que comprende la secuencia de SYDIN (SEQ ID NO:36), CDR H2 que comprende la secuencia de WMNANSGNTGYAQKFQG (SEQ ID NO:37), y CDR H3 que comprende la secuencia de SSILVRGALGRYFDL (SEQ ID NO:38);

(b) la cadena L comprende la CDR L1 que comprende la secuencia de RASQTISGWLA (SEQ ID NO:39), CDR L2 que comprende la secuencia de KASTLES (SEQ ID NO:40), y CDR L3 que comprende la secuencia de QQYKSYSFN (SEQ ID NO:41); y la cadena H comprende la CDR H1 que comprende la secuencia de SYDIN (SEQ ID NO:42), CDR H2 que comprende la secuencia de WMNANSGNTGYAQKFQG (SEQ ID NO:43), y CDR H3 que comprende la secuencia de SSILVRGALGRYFDL (SEQ ID NO:44);

(c) la cadena L comprende la CDR L1 que comprende la secuencia de RASQFVSRTSLA (SEQ ID NO:45), CDR L2 que comprende la secuencia de ETSSRAT (SEQ ID NO:46), y CDR L3 que comprende la secuencia de HKYGSGPRT (SEQ ID NO:47); y la cadena H comprende la CDR H1 que comprende la secuencia de NYDFI (SEQ ID NO:48), CDR H2 que comprende la

secuencia de WMNPNSYNTGYGQKFQG (SEQ ID NO:49), y CDR H3 que comprende la secuencia de AVRGQLLSEY (SEQ ID NO:50);

(d) la cadena L comprende la CDR L1 que comprende la secuencia de RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO:51), CDR L2 que comprende la secuencia de DASSRAT (SEQ ID NO:52), y CDR L3 que comprende la secuencia de QKYGSTPRP (SEQ ID NO:53); y la cadena H comprende la CDR H1 que comprende la secuencia de SYDIN (SEQ ID NO:54), CDR H2 que comprende la secuencia de WMNPNSGNTNYAQRFQG (SEQ ID NO:55), y CDR H3 que comprende la secuencia de ERWSKDTGHYYYYGMDV (SEQ ID NO:56);

(e) la cadena L comprende la CDR L1 que comprende la secuencia de RASLDITNHLA (SEQ ID NO:57), CDR L2 que comprende la secuencia de EASILQS (SEQ ID NO:58), y CDR L3 que comprende la secuencia de EKCNSTPRT (SEQ ID NO:59); y la cadena H comprende la CDR H1 que comprende la secuencia de NYDIN (SEQ ID NO:60), CDR H2 que comprende la secuencia de WMNPSSGRTGYAPKFRG (SEQ ID NO:61), y CDR H3 que comprende la secuencia de GGGYYDSSGNYHISGLDV (SEQ ID NO:62);

(f) la cadena L comprende la CDR L1 que comprende la secuencia de RASQSVGAIYLA (SEQ ID NO:63), CDR L2 que comprende la secuencia de GVSNRAT (SEQ ID NO:64), y CDR L3 que comprende la secuencia de QLYTSSRALT (SEQ ID NO:65); y la cadena H comprende la CDR H1 que comprende la secuencia de AYAMN (SEQ ID NO:66), CDR H2 que comprende la secuencia de SITKNSDSLYYADSVKG (SEQ ID NO:67), y CDR H3 que comprende la secuencia de LAARIMATDY (SEQ ID NO:68);

(g) la cadena L comprende la CDR L1 que comprende la secuencia de RASQGIRNGLG (SEQ ID NO:69), CDR L2 que comprende la secuencia de PASTLES (SEQ ID NO:70), y CDR L3 que comprende la secuencia de LQDHNYPPT (SEQ ID NO:71); y la cadena H comprende la CDR H1 que comprende la secuencia de YYSMI (SEQ ID NO:72), CDR H2 que comprende la secuencia de SIDSSSRYLYYADSVKG (SEQ ID NO:73), y CDR H3 que comprende la secuencia de DGDDILSVYRGSGRPFDY (SEQ ID NO:74);

(h) la cadena L comprende la CDR L1 que comprende la secuencia de RASQGIRNGLG (SEQ ID NO:75), CDR L2 que comprende la secuencia de PASTLES (SEQ ID NO:76), y CDR L3 que comprende la secuencia de LQDHNYPPS (SEQ ID NO:77); y la cadena H comprende la CDR H1 que comprende la secuencia de YYSMI (SEQ ID NO:78), CDR H2 que comprende la secuencia de SIDSSSRYRYYTDSVKG (SEQ ID NO:79), y CDR H3 que comprende la secuencia de DGDDILSVYQGSGRPFDY (SEQ ID NO:80);

(i) la cadena L comprende la CDR L1 que comprende la secuencia de RASQSVRTNVA (SEQ ID NO:81), CDR L2 que comprende la secuencia de GASTRAS (SEQ ID NO:82), y CDR L3 que comprende la secuencia de LQYNTWPRT (SEQ ID NO:83); y la cadena H comprende la CDR H1 que comprende la secuencia de TNDMS (SEQ ID NO:84), CDR H2 que comprende la secuencia de TIIGIDDTTHYADSVRG (SEQ ID NO:85), y CDR H3 que comprende la secuencia de NSGIYSF (SEQ ID NO:86)

(j) la cadena L comprende la CDR L1 que comprende la secuencia de RASQDIGSSLA (SEQ ID NO:87), CDR L2 que comprende la secuencia de ATSTLQS (SEQ ID NO:88), y CDR L3 que comprende la secuencia de

QQLNNYVHS (SEQ ID NO:89); y la cadena H comprende la CDR H1 que comprende la secuencia de DYAMG (SEQ ID NO:90), CDR H2 que comprende la secuencia de VVTGHSYRTHYADSVKG (SEQ ID NO:91), y CDR H3 que comprende la secuencia de RIWSYGDDSFDV (SEQ ID NO:92);

(k) la cadena L comprende la CDR L1 que comprende la secuencia de RASQSIGDRLA (SEQ ID NO:93), CDR L2 que comprende la secuencia de WASNLEG (SEQ ID NO:94), y CDR L3 que comprende la secuencia de QQYKSQWS (SEQ ID NO:95); y la cadena H comprende la CDR H1 que comprende la secuencia de SYAMN (SEQ ID NO:96), CDR H2 que comprende la secuencia de YISSIETIYYADSVKG (SEQ ID NO:97), y CDR H3 que comprende la secuencia de DRLVDVPLSSPNS (SEQ ID NO:98);

(l) la cadena L comprende la CDR L1 que comprende la secuencia de KSSQSIFRTSRNKNLLN (SEQ ID NO:99), CDR L2 que comprende la secuencia de WASTRKS (SEQ ID NO:100), y CDR L3 que comprende la secuencia de QQYFSPPYT (SEQ ID NO:101); y la cadena H comprende la CDR H1 que comprende la secuencia de SFWMH (SEQ ID NO:102), CDR H2 que comprende la secuencia de FTNNEGTTTAYADSVRG (SEQ ID NO:103), y CDR H3 que comprende la secuencia de GDGGLDD (SEQ ID NO:104);

(m) la cadena L comprende la CDR L1 que comprende la secuencia de RASQFTNHYLN (SEQ ID NO:105), CDR L2 que comprende la secuencia de VASNLQS (SEQ ID NO:106), y CDR L3 que comprende la secuencia de QQSYRTPYT (SEQ ID NO:107); y la cadena H comprende la CDR H1 que comprende la secuencia de SGYYN (SEQ ID NO:108), CDR H2 que comprende

la secuencia de YILSGAHTDIKASLGS (SEQ ID NO:109), y CDR H3 que comprende la secuencia de SGVYSKYSLDV (SEQ ID NO:110); o

(n) la cadena L comprende la CDR L1 que comprende la secuencia de KSSQSIFRTSRNKNLLN (SEQ ID NO:99), CDR L2 que comprende la secuencia de WASTRKS (SEQ ID NO:100), y CDR L3 que comprende la secuencia de QQYFSPPYT (SEQ ID NO:101); y la cadena H comprende la CDR H1 que comprende la secuencia de SFWMH (SEQ ID NO:102), CDR H2 que comprende la secuencia de FTNNEGTTTAYADSVRG (SEQ ID NO:103), y CDR H3 que comprende la secuencia de GEGGLDD (SEQ ID NO:118).

15. Un anticuerpo monoclonal anti-WTA aislado que comprende una cadena de región variable pesada (VH), en donde la VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia sobre la longitud de la secuencia VH de la SEQ ID NO. 112, en donde Xaa en la posición 1 en la SEQ ID NO. 112 es Q o E, y Xaa en la posición 2 en la SEQ ID NO. 112 es M, I o V.

16. El anticuerpo de la reivindicación 11, que comprende adicionalmente una región variable de cadena ligera (VL), en donde la VL comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia sobre la longitud de la secuencia VL de la SEQ ID NO. 111.

17. Un anticuerpo monoclonal anti-WTA aislado que comprende una región variable de cadena ligera (VL), en donde la VL comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia sobre la longitud de la secuencia VL de la SEQ ID NO. 111.

18. El anticuerpo de la reivindicación 15, en donde la VH comprende la secuencia de la SEQ ID NO. 112 y la VL comprende la secuencia de la SEQ ID NO. 111, en donde Xaa en la posición 1 en la SEQ ID NO. 112 es Q o E, y Xaa en la posición 2 en la SEQ ID NO. 112 es M, I o V.

19. Un anticuerpo monoclonal anti-WTA aislado que comprende una cadena de región variable pesada (VH), en donde la VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia sobre la longitud de la secuencia VH SEQ ID NO. 120 o SEQ ID NO. 156.

20. El anticuerpo de la reivindicación 17, que comprende adicionalmente una región variable de cadena ligera (VL), en donde la VL comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia sobre la longitud de la secuencia VL SEQ ID NO. 119.

21. Un anticuerpo monoclonal anti-WTA aislado que comprende una región variable de cadena ligera (VL), en donde la VL comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia sobre la longitud de la secuencia VL SEQ ID NO. 119.

22. Un anticuerpo monoclonal anti-WTA aislado que comprende una región variable de cadena ligera (VL) y una cadena de región variable pesada (VH), en donde la VL comprende la secuencia de la SEQ ID NO. 119 y la VH comprende la secuencia SEQ ID NO. 120. o SEQ ID NO. 156.

23. Un anticuerpo monoclonal anti-WTA aislado que comprende una región variable de cadena ligera (VL), en donde la VL comprende una secuencia que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia sobre la longitud de la secuencia VL seleccionada de la secuencia VL de la SEQ ID NO. 158, SEQ ID NO. 159, SEQ ID NO. 160, SEQ ID NO. 161, SEQ ID NO. 162, SEQ ID NO. 163, SEQ ID NO. 164, SEQ ID NO. 165, SEQ ID NO. 166, SEQ ID NO. 167, y SEQ ID NO. 168.

24. Un anticuerpo monoclonal anti-WTA aislado que comprende una cadena de región variable pesada (VH) que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia sobre la longitud de la secuencia VH seleccionada de la secuencia VH de la SEQ ID NO. 127, SEQ ID NO. 133, SEQ ID NO. 134, SEQ ID NO. 169, SEQ ID NO. 170, SEQ ID NO. 171, SEQ ID NO. 172, SEQ ID NO. 173, SEQ ID NO. 174, SEQ ID NO. 175, y SEQ ID NO. 176.

25. Un anticuerpo monoclonal anti-WTA aislado que comprende una región variable de cadena ligera (VL) y una cadena de región variable pesada (VH), en donde:

(a) la VL del anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia sobre la longitud de la secuencia VL de la SEQ ID NO. 158, y la VH del anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia sobre la longitud de la secuencia VH de la SEQ ID NO. 169;

(b) la VL del anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia sobre la longitud de la secuencia VL de la SEQ ID NO. 159, y la VH del anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia sobre la longitud de la secuencia VH de la SEQ ID NO. 170;

(c) la VL del anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia sobre la longitud de la secuencia VL de la SEQ ID NO. 160, y la VH del anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia sobre la longitud de la secuencia VH de la SEQ ID NO. 171;

(d) la VL del anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia sobre la longitud de la secuencia VL de la SEQ ID NO. 161, y la VH del anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia sobre la longitud de la secuencia VH de la SEQ ID NO. 172;

(e) la VL del anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia sobre la longitud de la secuencia VL de la SEQ ID NO. 162, y la VH del anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia sobre la longitud de la secuencia VH de la SEQ ID NO. 173;

(f) la VL del anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia sobre la longitud de la secuencia VL de la SEQ ID NO. 163, y la VH del anticuerpo comprende una secuencia de

aminoácidos que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia sobre la longitud de la secuencia VH de la SEQ ID NO. 174;

(g) la VL del anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia sobre la longitud de la secuencia VL de la SEQ ID NO. 164, y la VH del anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia sobre la longitud de la secuencia VH de la SEQ ID NO. 175;

(h) la VL del anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia sobre la longitud de la secuencia VL de la SEQ ID NO. 165, y la VH del anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia sobre la longitud de la secuencia VH de la SEQ ID NO. 176;

(i) la VL del anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia sobre la longitud de la secuencia VL de la SEQ ID NO. 166, y la VH del anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia sobre la longitud de la secuencia VH de la SEQ ID NO. 133;

(j) la VL del anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia sobre la longitud de la secuencia VL de la SEQ ID NO. 167, y la VH del anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia sobre la longitud de la secuencia VH de la SEQ ID NO. 134; o

(k) la VL del anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia sobre la longitud de la secuencia VL de la SEQ ID NO. 168, y la VH del anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia sobre la longitud de la secuencia VH de la SEQ ID NO. 127.

26. Un anticuerpo monoclonal anti-WTA aislado que comprende una región variable de cadena ligera (VL) y una cadena de región variable pesada (VH), en donde:

(a) la VL del anticuerpo comprende la secuencia VL de la SEQ ID NO. 158, y la VH del anticuerpo comprende la secuencia VH de la SEQ ID NO. 169;

(b) la VL del anticuerpo comprende la secuencia VL de la SEQ ID NO. 159, y la VH del anticuerpo comprende la secuencia VH de la SEQ ID NO. 170;

(c) la VL del anticuerpo comprende la secuencia VL de la SEQ ID NO. 160, y la VH del anticuerpo comprende la secuencia VH de la SEQ ID NO. 171;

(d) la VL del anticuerpo comprende la secuencia VL de la SEQ ID NO. 161, y la VH del anticuerpo comprende la secuencia VH de la SEQ ID NO. 172;

(e) la VL del anticuerpo comprende la secuencia VL de la SEQ ID NO. 162, y la VH del anticuerpo comprende la secuencia VH de la SEQ ID NO. 173;

(f) la VL del anticuerpo comprende la secuencia VL de la SEQ ID NO. 163, y la VH del anticuerpo comprende la secuencia VH de la SEQ ID NO. 174;

(g) la VL del anticuerpo comprende la secuencia VL de la SEQ ID NO. 164, y la VH del anticuerpo comprende la secuencia VH de la SEQ ID NO. 175;

(h) la VL del anticuerpo comprende la secuencia VL de la SEQ ID NO. 165, y la VH del anticuerpo comprende la secuencia VH de la SEQ ID NO. 176;

(i) la VL del anticuerpo comprende la secuencia VL de la SEQ ID NO. 166, y la VH del anticuerpo comprende la secuencia VH de la SEQ ID NO. 133;

(j) la VL del anticuerpo comprende la secuencia VL de la SEQ ID NO. 167, y la VH comprende la secuencia VH de la SEQ ID NO. 134;

(k) la VL del anticuerpo comprende la secuencia VL de la SEQ ID NO. 168, y la VH comprende la secuencia VH de la SEQ ID NO. 127;

(l) la VL del anticuerpo comprende la secuencia VL de la SEQ ID NO. 113, y la VH comprende la secuencia VH de la SEQ ID NO. 114; o

(m) la VL del anticuerpo comprende la secuencia VL de la SEQ ID NO. 121, y la VH comprende la secuencia VH de la SEQ ID NO. 138.

27. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 26, en donde el anticuerpo es un fragmento de unión a antígeno que carece de una región Fc.

28. El anticuerpo de la reivindicación 27, en donde el anticuerpo es un F(ab) o $F(ab')_2$.

29. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 28, en donde el anticuerpo comprende adicionalmente una región constante de cadena pesada y/o una región constante de cadena ligera, en donde la región constante de cadena pesada y/o la región constante de cadena ligera comprenden uno o más aminoácidos que se sustituyen con residuos de cisteína.

30. El anticuerpo de la reivindicación 29, en donde la región constante de cadena pesada comprende sustitución de aminoácidos A118C, y/o la región constante de cadena ligera comprende sustitución de aminoácidos V205C, en donde la numeración es de acuerdo con la numeración EU.

31. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 26, en donde el anticuerpo comprende adicionalmente una región constante de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:149 y/o una región constante de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:151.

32. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 26, en donde el anticuerpo comprende adicionalmente una región constante de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:149 y una región constante de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:150.

33. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 26, en donde el anticuerpo comprende adicionalmente una región constante de cadena

pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:148 y una región constante de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:151.

34. Un anticuerpo monoclonal anti-WTA aislado que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde la cadena pesada del anticuerpo comprende la secuencia de la SEQ ID NO. 114, SEQ ID NO. 116, o SEQ ID NO. 117, y la cadena ligera del anticuerpo comprende la secuencia de la SEQ ID NO. 113; en donde el aminoácido Xaa en la posición 2 de la SEQ ID NO. 116 o SEQ ID NO. 117 es M, I, o V.

35. Un anticuerpo monoclonal anti-WTA aislado que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde la cadena pesada del anticuerpo comprende la secuencia de la SEQ ID NO. 114, SEQ ID NO. 116, o SEQ ID NO. 117, y la cadena ligera del anticuerpo comprende la secuencia de la SEQ ID NO. 115; en donde el aminoácido Xaa en la posición 2 de la SEQ ID NO. 116 o SEQ ID NO. 117 es M, I, o V.

36. Un anticuerpo monoclonal anti-WTA aislado que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde la cadena pesada del anticuerpo comprende la secuencia seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO. 139, SEQ ID NO. 140, SEQ ID NO. 141, SEQ ID NO. 142, SEQ ID NO. 143, y SEQ ID NO. 144; y la cadena ligera del anticuerpo comprende la secuencia de la SEQ ID NO. 113.

37. Un anticuerpo monoclonal anti-WTA aislado que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde la cadena pesada del anticuerpo

comprende la secuencia seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO. 139, SEQ ID NO. 140, SEQ ID NO. 141, SEQ ID NO. 142, SEQ ID NO. 143, y SEQ ID NO. 144; y la cadena ligera del anticuerpo comprende la secuencia de la SEQ ID NO. 115.

38. Un anticuerpo monoclonal anti-WTA aislado que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la cadena pesada comprende la secuencia de la SEQ ID NO:146, SEQ ID NO: 147, SEQ ID NO. 157 o SEQ ID NO. 124, y la cadena ligera comprende la secuencia de la SEQ ID NO. 121 o SEQ ID NO. 123.

39. Un anticuerpo monoclonal anti-WTA aislado que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la cadena pesada comprende la secuencia de la SEQ ID NO:146, SEQ ID NO: 147, SEQ ID NO. 157 o SEQ ID NO. 124, y la cadena ligera comprende la secuencia de la SEQ ID NO. 145.

40. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 39, en donde el anticuerpo une el WTA beta.

41. Un anticuerpo que se une al mismo epítopo como el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 40.

42. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 41, en donde el anticuerpo se produce en una célula anfitriona en el cultivo celular.

43. El anticuerpo de la reivindicación 42, en donde la célula anfitriona es una célula de ovario de hámster Chino (CHO).

44. Una composición que comprende un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 43 y un portador farmacéuticamente aceptable.

45. Un ácido nucleico que codifica un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 41.

46. Un vector que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 45.

47. Una célula anfitriona aislada que comprende un ácido nucleico que codifica un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 41.

48. Un método para producir un anticuerpo que comprende cultivar una célula anfitriona de la reivindicación 47 bajo condiciones adecuadas para expresión del ácido nucleico; y recuperar el anticuerpo producido por la célula.

49. Un compuesto conjugado de anticuerpo-antibiótico que comprende un anticuerpo de anti-ácido teicoico de pared (WTA) de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 43, adherido de forma covalente mediante un ligador de péptido a un antibiótico del tipo rifamicina.

50. El compuesto conjugado de anticuerpo-antibiótico de la reivindicación 49 en donde el anticuerpo comprende: i) CDRs de cadena L y cadena H de la SEQ ID NOs 99-104 o la CDRs de cadena L y cadena H de la SEQ ID

NOs. 33-38; o ii) la VL de la SEQ ID NO. 119 o SEQ ID NO. 123 emparejado con la VH de la SEQ ID NO. 120 o SEQ ID NO. 156; o iii) la VL de la SEQ ID NO. 111 emparejado con la VH de la SEQ ID NO. 112.

51. El compuesto conjugado de anticuerpo-antibiótico de la reivindicación 49 o 50, en donde el anticuerpo de anti-ácido teicoico de pared (WTA) se une al *Staphylococcus aureus*.

52. El compuesto conjugado de anticuerpo-antibiótico de la reivindicación 51, en donde el anticuerpo de anti-ácido teicoico de pared (WTA) se une al *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA).

53. El conjugado de anticuerpo - antibiótico de una cualquiera de las reivindicaciones 49 a 52, en donde el antibiótico del tipo rifamicina es un antibiótico del rifalazilo.

54. El conjugado de anticuerpo - antibiótico de una cualquiera de las reivindicaciones 49 a 53, en donde el antibiótico del tipo rifamicina comprende una amina cuaternaria adherida al ligador de péptido.

55. El conjugado de anticuerpo - antibiótico de una cualquiera de las reivindicaciones 49 a 54, en donde el ligador de péptido se adhiere a una cisteína o una cisteína diseñada por ingeniería del anticuerpo de anti-ácido teicoico de pared (WTA).

56. El conjugado de anticuerpo - antibiótico de una cualquiera de las reivindicaciones 49 a 55, en donde el ligador de péptido es una endopeptidasa ede *S. aureus* o ligador clivable de proteasa cisteína.

57. El conjugado de anticuerpo - antibiótico de la reivindicación 56, en donde el ligador de péptido es una estafopaina B o un ligador clivable de estafopaina.

58. El conjugado de anticuerpo - antibiótico de la reivindicación 56, en donde el ligador de péptido es un ligador clivable B de catepsina de proteasa humana.

59. El conjugado de anticuerpo - antibiótico de la reivindicación 58, en donde el ligador de péptido es un ligador dipéptido de val-cit.

60. El conjugado de anticuerpo - antibiótico de la reivindicación 49 tiene la fórmula:

$Ab–(L–abx)_p$

en donde:

Ab es el anticuerpo de anti-ácido teicoico de pared;

L es el ligador de péptido que tiene la fórmula:

–Str–Pep–Y–

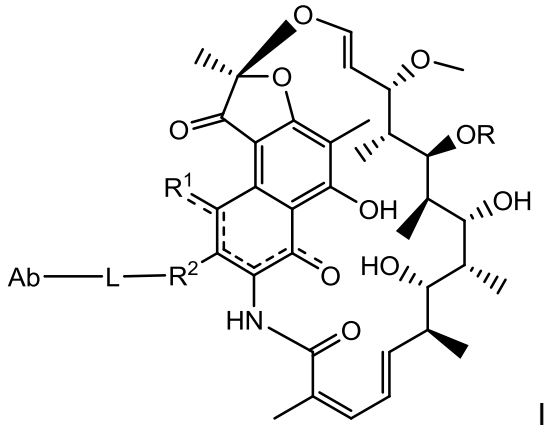
donde Str es una unidad extensora; Pep es un péptido de dos a doce residuos aminoácidos, y Y es una unidad separadora;

abx es el antibiótico del tipo rifamicina; y

p es un entero desde 1 hasta 8.

61. El conjugado de anticuerpo - antibiótico de la reivindicación 60, en donde p es 2 a 4.

62. El compuesto conjugado de anticuerpo-antibiótico de la reivindicación 49 que tiene la Fórmula I:



I

en donde:

las líneas punteadas indican un enlace opcional;

R es H, alquilo C_1-C_{12}, o $C(O)CH_3$;

R^1 es OH;

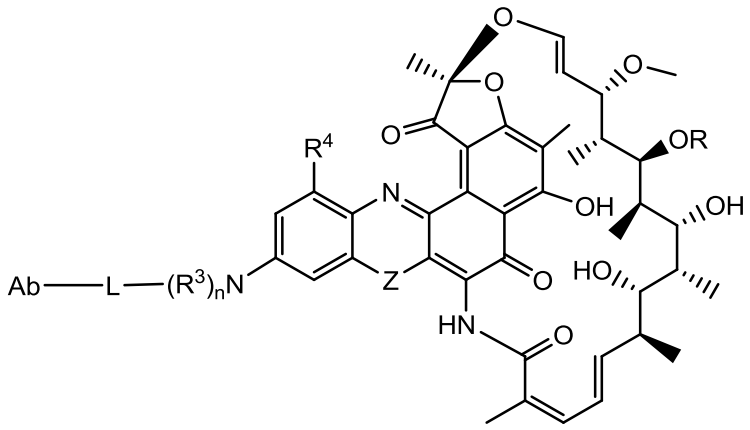
R^2 es CH=N–(heterociclilo), en donde el heterociclilo se sustituye opcionalmente con uno o más grupos independientemente seleccionados de $C(O)CH_3$, alquilo C_1-C_{12}, heteroarilo C_1–C_{12}, heterociclilo C_2–C_{20}, arilo C_6-C_{20}, y carbociclilo C_3–C_{12};

o R^1 y R^2 forman un heteroarilo o heterociclilo fusionado de cinco o seis miembros, y opcionalmente forman un anillo heteroarilo, heterociclilo, arilo, o carbociclilo de seis miembros espiro o fusionado, en donde el anillo heteroarilo, heterociclilo, arilo, o carbociclilo de seis miembros espiro o fusionado se sustituye opcionalmente con H, F, Cl, Br, I, alquilo C_1-C_{12}, o OH;

L es el ligador de péptido adherido a R^2 o el heteroarilo o heterociclilo fusionado formado por R^1 y R^2; y

Ab es el anticuerpo de anti-ácido teicoico de pared (WTA).

63. El compuesto conjugado de anticuerpo-antibiótico de la reivindicación 62 tiene la fórmula:



en donde

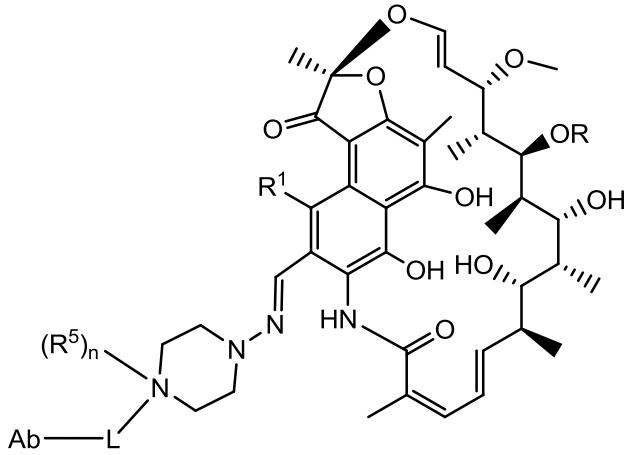
R^3 se selecciona independientemente H y alquilo C_1-C_{12};

n es 1 o 2;

R^4 se selecciona de H, F, Cl, Br, I, alquilo C_1-C_{12}, y OH; y

Z se selecciona de NH, N(alquilo C_1-C_{12}), O y S.

64. El compuesto conjugado de anticuerpo-antibiótico de la reivindicación 62 tiene la fórmula:

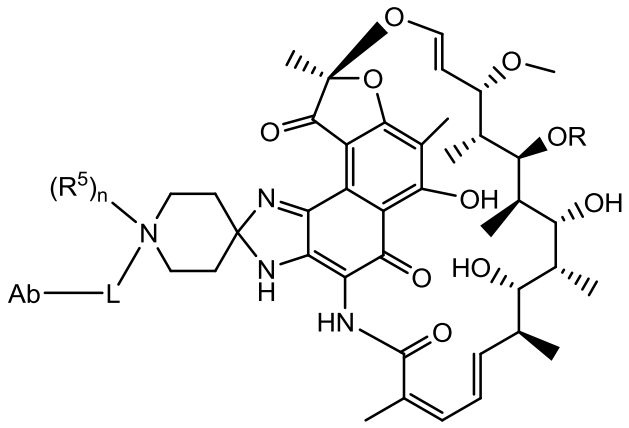


en donde

R^5 se selecciona de H y alquilo C_1-C_{12}; y

n es 0 o 1.

65. El compuesto conjugado de anticuerpo-antibiótico de la reivindicación 62 tiene la fórmula:

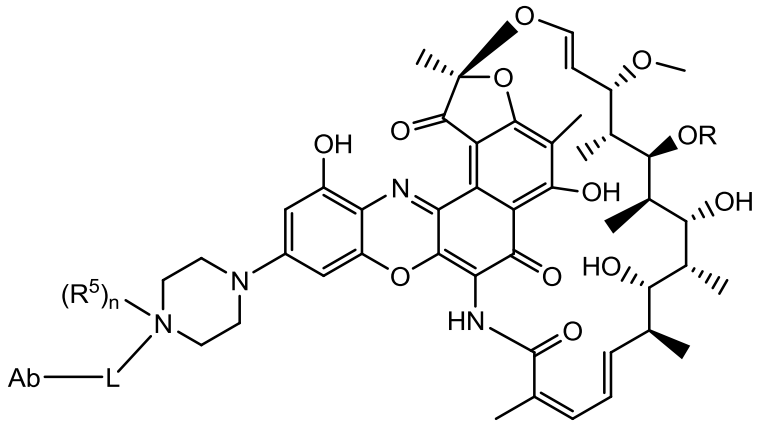


en donde

R^5 se selecciona de H y alquilo C_1-C_{12}; y

n es 0 o 1.

66. El compuesto conjugado de anticuerpo-antibiótico de la reivindicación 62 tiene la fórmula:

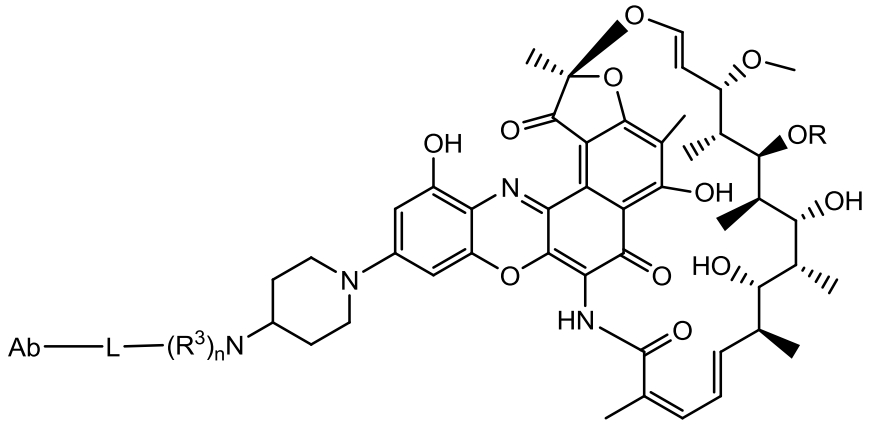


en donde

R^5 se selecciona independientemente H y alquilo C_1-C_{12}; y

n es 0 o 1.

67. El compuesto conjugado de anticuerpo-antibiótico de la reivindicación 62 tiene la fórmula:

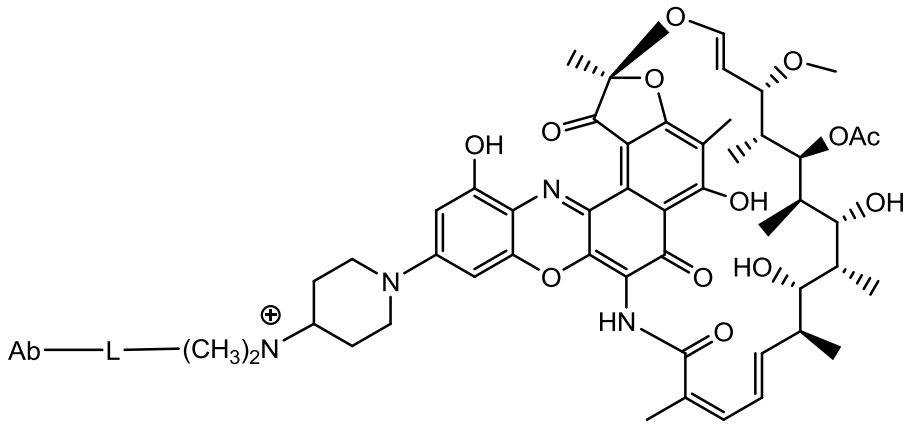


en donde

R^3 se selecciona independientemente H y alquilo C_1-C_{12}; y

n es 1 o 2.

68. El compuesto conjugado de anticuerpo-antibiótico de la reivindicación 62 tiene la fórmula:



.

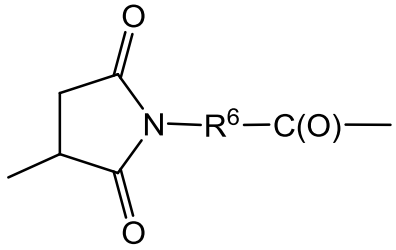
69. El compuesto conjugado de anticuerpo-antibiótico de la reivindicación 49, en donde el ligador de péptido tiene la fórmula:

–Str–Pep–Y–

donde Str es una unidad extensora adherida de forma covalente a el anticuerpo de anti-ácido teicoico de pared (WTA); Pep es un péptido de dos a doce residuos

aminoácidos, y Y es una unidad separadora adherida de forma covalente a el antibiótico del tipo rifamicina.

70. El conjugado de anticuerpo - antibiótico de la reivindicación 69, en donde Str tiene la fórmula:



en donde R^6 se selecciona del grupo que consiste de alquileno C_1-C_{10}-, -carbociclo C_3-C_8, -O-(alquilo C_1-C_8)-, -arileno-, -alquileno C_1-C_{10}-arileno-, -arileno-alquileno C_1-C_{10}-, -alquileno C_1-C_{10}-(carbociclo C_3-C_8)-, -(carbociclo C_3-C_8)-alquileno C_1-C_{10}-, -heterociclo C_3-C_8-, -alquileno C_1-C_{10}-(heterociclo C_3-C_8)-, -(heterociclo C_3-C_8)-alquileno C_1-C_{10}-, $-(CH_2CH_2O)_r-$, y $-(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$; y r es un entero que varía de 1 a 10.

71. El conjugado de anticuerpo - antibiótico de la reivindicación 70, en donde R^6 es $-(CH_2)_5-$.

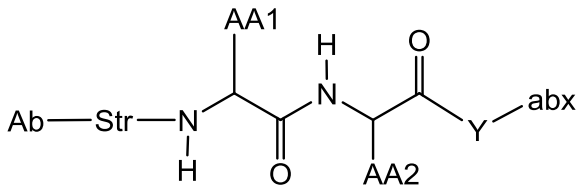
72. El conjugado de anticuerpo - antibiótico de la reivindicación 69, en donde Pep comprende dos a doce residuos aminoácidos independientemente seleccionados de glicina, alanina, fenilalanina, lisina, arginina, valina, y citrulina.

73. El conjugado de anticuerpo - antibiótico de la reivindicación 72, en donde el Pep se selecciona de valina-citrulina (val-cit, vc); fenilalanina-lisina (fk); GGAFAGGG (SEQ ID NO: 126); tpm-cit; GPImeLFF (SEQ ID NO: 129);

valina-citrulina-fenilalanina (val-cit-phe); GGAFA (SEQ ID NO: 131); y LAFG (SEQ ID NO: 128).

74. El conjugado de anticuerpo - antibiótico de la reivindicación 69, en donde Y comprende para-aminobencilo o para-aminobenciloxicarbonilo.

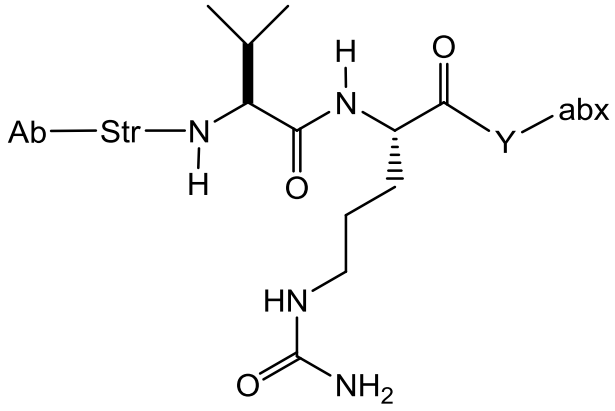
75. El conjugado de anticuerpo - antibiótico de la reivindicación 49 tiene la fórmula:



donde AA1 y AA2 se seleccionan independientemente de una cadena lateral de aminoácidos.

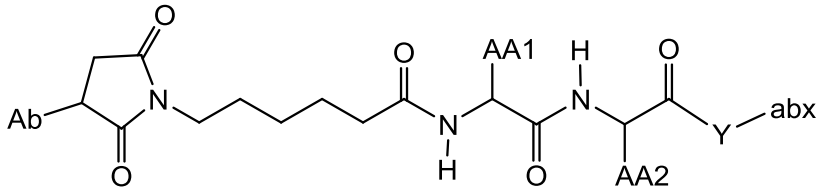
76. El conjugado de anticuerpo - antibiótico de la reivindicación 75, en donde la cadena lateral de aminoácidos se selecciona independientemente H, $-CH_3$, $-CH_2(C_6H_5)$, $-CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2CH_2NHC(NH)NH_2$, $-CHCH(CH_3)CH_3$, y $-CH_2CH_2CH_2NHC(O)NH_2$.

77. El conjugado de anticuerpo - antibiótico de la reivindicación 75 tiene la fórmula:



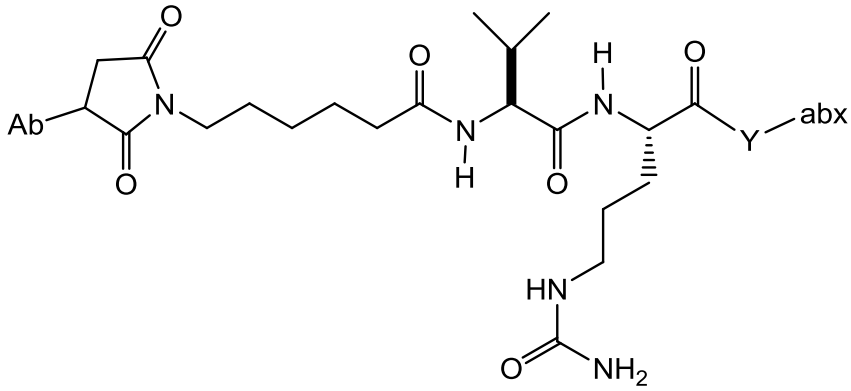
.

78. El conjugado de anticuerpo - antibiótico de la reivindicación 75 tiene la fórmula:



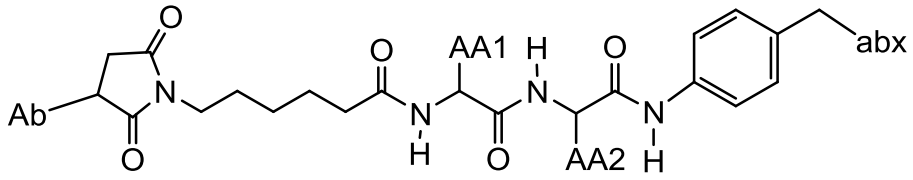
.

79. El conjugado de anticuerpo - antibiótico de la reivindicación 78 tiene la fórmula:



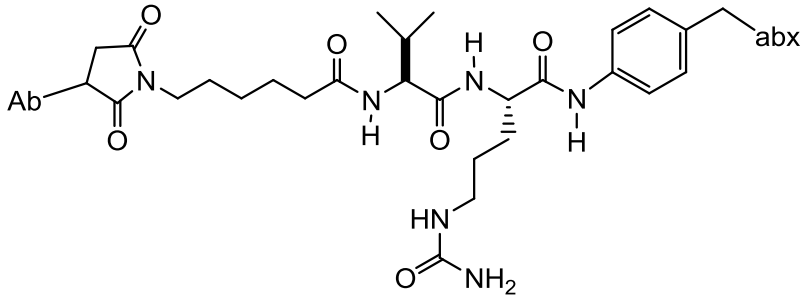
.

80. El conjugado de anticuerpo - antibiótico de la reivindicación 75 tiene la fórmula:



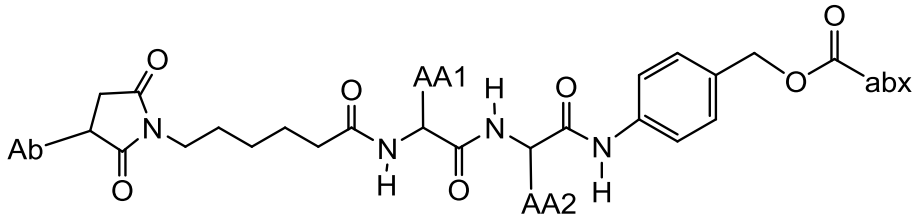
.

81. El conjugado de anticuerpo - antibiótico de la reivindicación 80 tiene la fórmula:

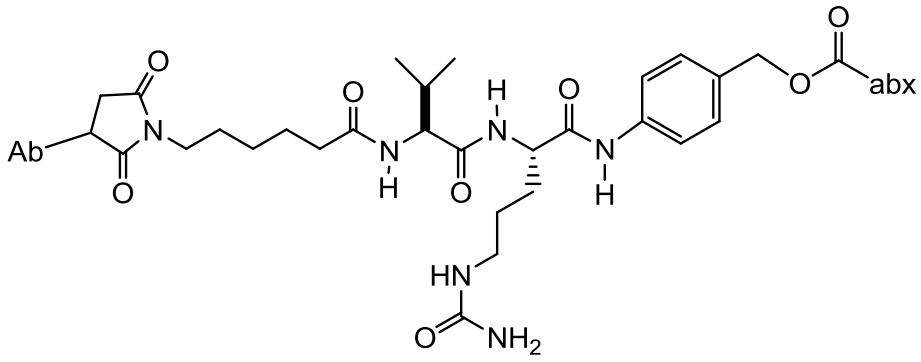


.

82. El conjugado de anticuerpo - antibiótico de la reivindicación 75 tiene la fórmula:

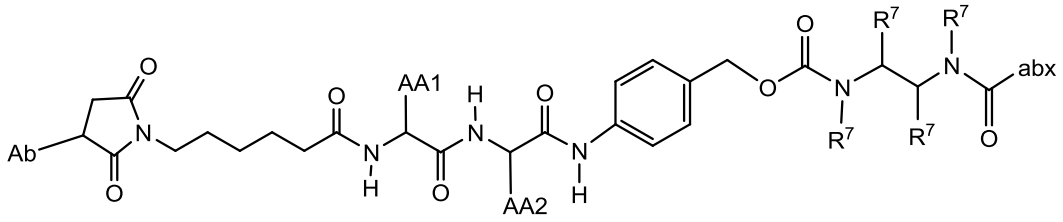


83. El conjugado de anticuerpo - antibiótico de la reivindicación 82 tiene la fórmula:



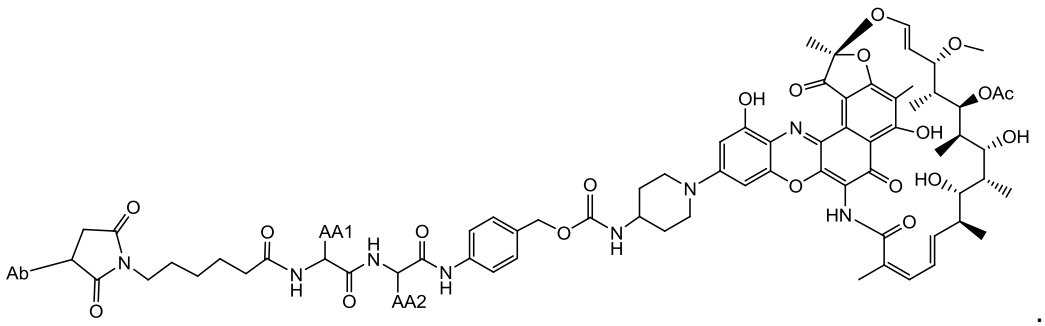
.

84. El conjugado de anticuerpo - antibiótico de la reivindicación 75 tiene la fórmula:

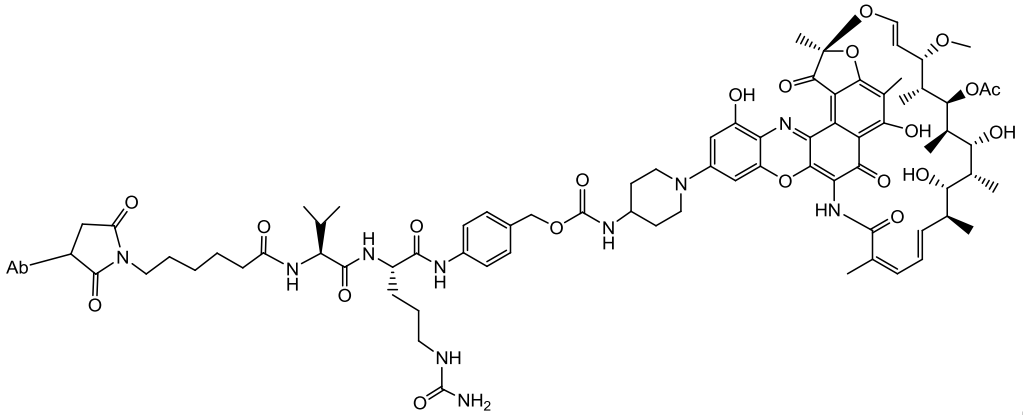


donde R^7 se selecciona independientemente H y alquilo C_1-C_{12}.

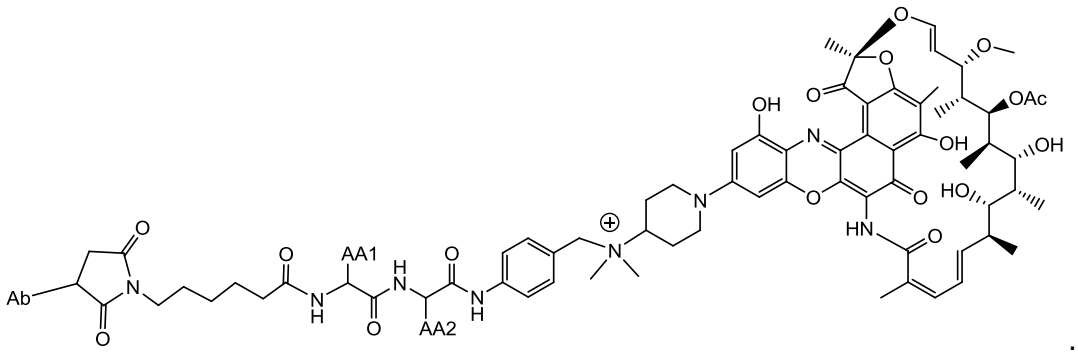
85. El compuesto conjugado de anticuerpo-antibiótico de la reivindicación 75 tiene la fórmula:



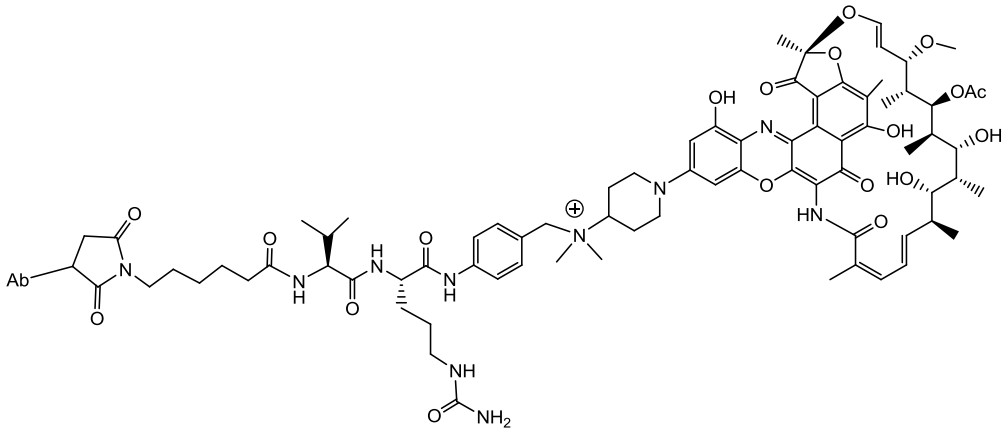
86. El compuesto conjugado de anticuerpo-antibiótico de la reivindicación 85 tiene la fórmula:



87. El compuesto conjugado de anticuerpo-antibiótico de la reivindicación 75 tiene la fórmula:



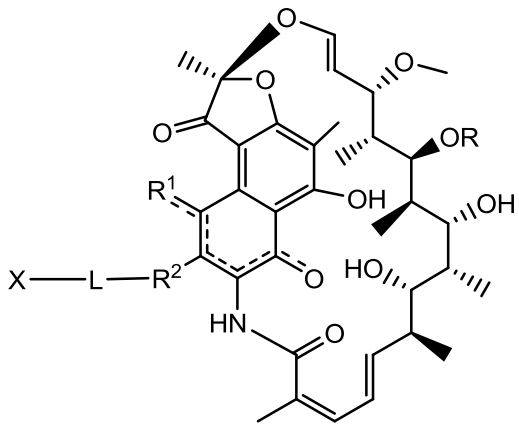
88. El compuesto conjugado de anticuerpo-antibiótico de la reivindicación 87 tiene la fórmula:



89. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto conjugado de anticuerpo-antibiótico de una cualquiera de las reivindicaciones 49 a 88, y un portador farmacéuticamente aceptable, deslizante, diluyente, o excipiente.

90. Un proceso para elaborar el compuesto conjugado de anticuerpo-antibiótico de una cualquiera de las reivindicaciones 49 a 88 que comprende conjugar un antibiótico del tipo rifamicina con un anticuerpo de anti-ácido teicoico de pared (WTA).

91. Un intermedio ligador de antibiótico tiene la Fórmula II:



II

en donde:

las líneas punteadas indican un enlace opcional;

R es H, alquilo C_1-C_{12}, o $C(O)CH_3$;

R^1 es OH;

R^2 es CH=N–(heterociclilo), en donde el heterociclilo se sustituye opcionalmente con uno o más grupos independientemente seleccionados de $C(O)CH_3$, alquilo C_1-C_{12}, heteroarilo C_1–C_{12}, heterociclilo C_2–C_{20}, arilo C_6-C_{20}, y carbociclilo C_3–C_{12};

o R^1 y R^2 forman un heteroarilo o heterociclilo fusionado de cinco o seis miembros, y opcionalmente forman un anillo heteroarilo, heterociclilo, arilo, o carbociclilo de seis miembros espiro o fusionado, en donde el anillo heteroarilo, heterociclilo, arilo, o carbociclilo de seis miembros espiro o fusionado se sustituye opcionalmente con H, F, Cl, Br, I, alquilo C_1-C_{12}, o OH;

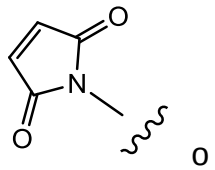
L es un ligador de péptido adherido a R^2 o el heteroarilo o heterociclilo fusionado formado por R^1 y R^2; y tiene la fórmula:

–Str–Pep–Y–

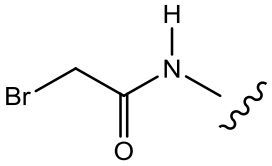
donde Str es una unidad extensora; Pep es un péptido de dos a doce residuos aminoácidos, y Y es una unidad separadora; y

X es un grupo funcional seleccionado de maleimida, tiol, amino, bromuro, bromoacetamido, yodoacetamido, p-toluenosulfonato, yoduro, hidroxilo, carboxilo, disulfuro piridilo, y N-hidroxisuccinimida.

92. El intermedio ligador de antibiótico de la reivindicación 91,en donde X es

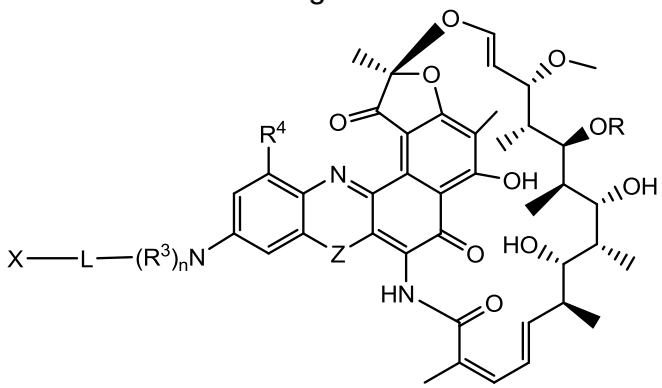


o



.

93. El intermedio ligador de antibiótico de la reivindicación 91 tiene la fórmula:



en donde

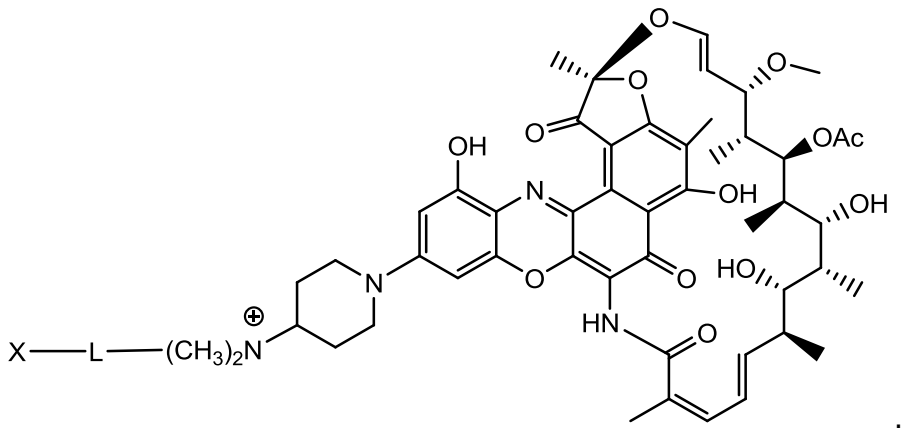
R^3 se selecciona independientemente H y alquilo C_1-C_{12};

n es 1 o 2;

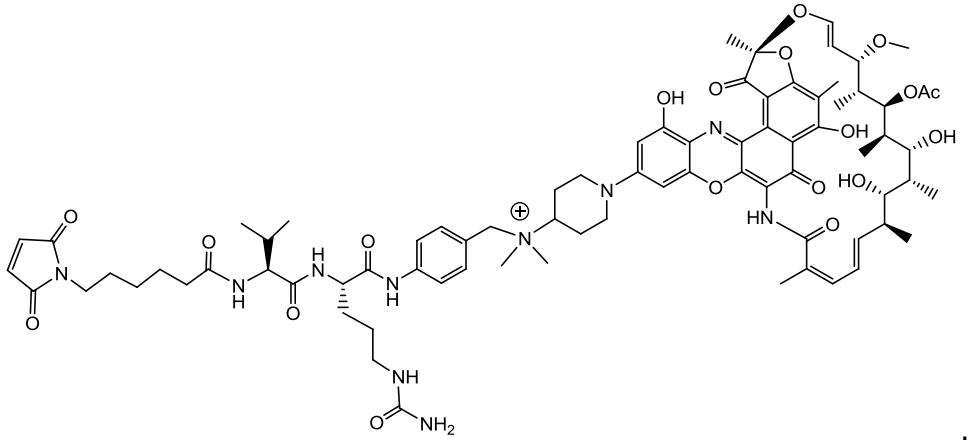
R^4 se selecciona de H, F, Cl, Br, I, alquilo C_1-C_{12}, y OH; y

Z se selecciona de NH, N(alquilo C_1-C_{12}), O y S.

94. El intermedio ligador de antibiótico de la reivindicación 93 tiene la fórmula:



95. El intermedio ligador de antibiótico de la reivindicación 93 tiene la fórmula:



96. Un método para tratar una infección bacteriana que comprende administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto conjugado de anticuerpo-antibiótico que comprende un anticuerpo de anti-ácido teicoico de pared (WTA) adherido de forma covalente mediante un ligador de péptido a un antibiótico del tipo rifamicina.

97. Un método para tratar una infección bacteriana que comprende administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un conjugado de anticuerpo-antibiótico de una cualquiera de las reivindicaciones 49 a 88.

98. El método de la reivindicación 96 o 97, en donde el paciente ha sido diagnosticado con una infección por Staph aureau.

99. El método de la reivindicación 98, en donde la carga bacteriana en el paciente se reduce por el tratamiento.

100. Un método intracelular para matar Staph aureus en las células anfitrionas de un paciente infectado con staph aureus sin matar las células anfitrionas que comprende administrar un conjugado de anti-WTA antibiótico de una cualquiera de las reivindicaciones 49 a 88.

101. El método de la reivindicación 100, en donde se matan las células bacterianas persistentes.

102. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 96-100, en donde el paciente es un humano.

103. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 96-102, que comprende adicionalmente administrar un segundo agente terapéutico.

104. El método de la reivindicación 103, en donde el segundo agente terapéutico es un antibiótico.

105. El método de la reivindicación 104, en donde el antibiótico se selecciona de la clase estructural que consiste de (i) aminoglicósidos; (ii) beta-lactamas; (iii) macrólidos/péptidos cíclicos; (iv) tetraciclinas; (v) fluoroquinolinas/fluoroquinolonas; y (vi) oxazolidinonas.

106. El método de la reivindicación 104, en donde el antibiótico se selecciona del grupo que consiste de clindamicina, novobiocina, retapamulina, daptomicina, GSK-2140944, CG-400549, sitafloxacina, teicoplanina, triclosán, naptiridona, radezolid, doxorubicina, ampicilina, vancomicina, imipenem, doripenem, gemcitabina, dalbavancina, y azitromicina.

107. Un equipo para tratar una infección bacteriana, que comprende:

a) la composición farmacéutica de la reivindicación 89; e

b) instrucciones de uso.

RESUMEN

La invención proporciona anticuerpos anti–ácido teicoico de pared y conjugados antibióticos de ellos, y métodos para su uso.

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

UNDER SECRETARY OF COMMERCE FOR INTELLECTUAL PROPERTY AND
DIRECTOR OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

NOVEMBER 1, 2013

PTAS

ALEX ANDRUS
1 DNA WAY
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080

502553067

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
NOTICE OF RECORDATION OF ASSIGNMENT DOCUMENT

THE ENCLOSED DOCUMENT HAS BEEN RECORDED BY THE ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH OF THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE. A COMPLETE COPY IS AVAILABLE AT THE ASSIGNMENT SEARCH ROOM ON THE REEL AND FRAME NUMBER REFERENCED BELOW.

PLEASE REVIEW ALL INFORMATION CONTAINED ON THIS NOTICE. THE INFORMATION CONTAINED ON THIS RECORDATION NOTICE REFLECTS THE DATA PRESENT IN THE PATENT AND TRADEMARK ASSIGNMENT SYSTEM. IF YOU SHOULD FIND ANY ERRORS OR HAVE QUESTIONS CONCERNING THIS NOTICE, YOU MAY CONTACT THE ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH AT 571-272-3350. PLEASE SEND REQUEST FOR CORRECTION TO: U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE, MAIL STOP: ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH, P.O. BOX 1450, ALEXANDRIA, VA 22313.

RECORDATION DATE: 10/31/2013 REEL/FRAME: 031520/0588
NUMBER OF PAGES: 3

BRIEF: ASSIGNMENT OF ASSIGNORS INTEREST (SEE DOCUMENT FOR DETAILS).

DOCKET NUMBER: PR5537

ASSIGNOR:
STRANDH, MAGNUS DOC DATE: 10/24/2013

ASSIGNOR:
KOEFOED, KLAUS DOC DATE: 10/24/2013

ASSIGNOR:
ANDERSEN, PETER S. DOC DATE: 10/24/2013

ASSIGNEE:
SYMPHOGEN A/S
ELEKTROVEJ BUILDING 375
LYNGBY, DENMARK DK-2800

APPLICATION NUMBER: 61829466 FILING DATE: 05/31/2013
PATENT NUMBER: ISSUE DATE:
TITLE: ANTI-WALL TEICHOIC ANTIBODIES AND CONJUGATES

ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH
PUBLIC RECORDS DIVISION

Docket No. **PR5537**

ASSIGNMENT

WHEREAS, Magnus Strandh, Klaus Koefoed, and Peter S. Andersen (each an "ASSIGNOR"), have invented a new and useful invention in

ANTI-WALL TEICHOIC ANTIBODIES AND CONJUGATES

for which an application Serial No. **61/829,466** (Docket No. **PR5537**) for Letters Patent has been filed by them on **May 31, 2013**; and

WHEREAS, SYMPHOGEN A/S, having a place of business at Elektrovej Building 375, DK-2800 Lyngby, Denmark is desirous of acquiring an interest in and to said invention, and in and to the Letters Patents to be obtained therefor;

NOW, THEREFORE, be it known by all whom it may concern;

That for good and valuable consideration the receipt of which is hereby acknowledged, the undersigned ASSIGNOR(S) have and do hereby sell, assign, transfer and set over unto the said SYMPHOGEN A/S, its successors and assigns, the full and exclusive right, title and interest, including all rights under the Paris Convention for the Protection of Industrial Property, in and to said invention, and in and to any and all applications filed and Letters Patents granted and issued therefor, or any continuation, division, renewal, or substitute thereof, and as to Letters Patents any reissue or re-examination thereof, not only for, to, and in the United States of America, its territories and possessions, but for, to and in all other countries; and it has been and is hereby authorized and requested that the appropriate government agencies issue said Letters Patents to said SYMPHOGEN A/S, in accordance with this Assignment.

The undersigned ASSIGNOR(S) covenant and agree to cooperate with SYMPHOGEN A/S, to enable said SYMPHOGEN A/S to enjoy to the fullest extent the right, title and interest herein conveyed in the United States and foreign countries. Such cooperation by the undersigned ASSIGNOR(S) includes prompt production of pertinent facts and documents, giving of testimony, execution of petitions, oaths, specifications, declarations or other papers, and other assistance, all to the extent deemed necessary or desirable by said SYMPHOGEN A/S, (a) for perfecting the right, title and interest herein conveyed; (b) for prosecuting any of said applications; (c) for filing and prosecuting applications for reissuance of any of said patents; (d) for interference or other priority proceedings involving said invention; and (e) for legal proceedings involving said invention and any applications therefor and any patents granted thereon, including without limitation opposition proceedings, cancellation proceedings, priority contests, public use proceedings, infringement actions and court actions; provided, however, that the expense incurred by the undersigned ASSIGNOR(S) in providing such cooperation shall be paid for by said SYMPHOGEN A/S.

The terms and covenants of this assignment shall inure to the benefit of said SYMPHOGEN A/S, its successors, assigns and other legal representatives, and shall be binding upon the undersigned ASSIGNOR(S), their respective heirs, legal representatives and assigns.

The undersigned ASSIGNOR(S) hereby warrant and represent that they have not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

IN WITNESS WHEREOF I/we undersign as follows;

Oct 24, 2013

Magnus Strandh — Date

Mailing address:
Elektrovej Building 375
DK-2800 Lyngby
Citizenship: SE

Oct 24, 2013

Klaus Koefoed — Date

Mailing address:
Elektrovej Building 375
DK-2800 Lyngby
Citizenship: DK

Oct 24 2013

Peter S. Andersen — Date

Mailing address:
Elektrovej Building 375
DK-2800 Lyngby
Citizenship: DK

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

UNDER SECRETARY OF COMMERCE FOR INTELLECTUAL PROPERTY AND
DIRECTOR OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

NOVEMBER 1, 2013

PTAS

ALEX ANDRUS
1 DNA WAY
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080

502553080

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
NOTICE OF RECORDATION OF ASSIGNMENT DOCUMENT

THE ENCLOSED DOCUMENT HAS BEEN RECORDED BY THE ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH OF THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE. A COMPLETE COPY IS AVAILABLE AT THE ASSIGNMENT SEARCH ROOM ON THE REEL AND FRAME NUMBER REFERENCED BELOW.

PLEASE REVIEW ALL INFORMATION CONTAINED ON THIS NOTICE. THE INFORMATION CONTAINED ON THIS RECORDATION NOTICE REFLECTS THE DATA PRESENT IN THE PATENT AND TRADEMARK ASSIGNMENT SYSTEM. IF YOU SHOULD FIND ANY ERRORS OR HAVE QUESTIONS CONCERNING THIS NOTICE, YOU MAY CONTACT THE ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH AT 571-272-3350. PLEASE SEND REQUEST FOR CORRECTION TO: U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE, MAIL STOP: ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH, P.O. BOX 1450, ALEXANDRIA, VA 22313.

RECORDATION DATE: 10/31/2013

REEL/FRAME: 031520/0643
NUMBER OF PAGES: 2

BRIEF: ASSIGNMENT OF ASSIGNORS INTEREST (SEE DOCUMENT FOR DETAILS).

DOCKET NUMBER: PR5537

ASSIGNOR:
SYMPHOGEN A/S

DOC DATE: 10/28/2013

ASSIGNEE:
GENENTECH, INC.
1 DNA WAY
SOUTH SAN FRANCISCO, CALIFORNIA
94080

APPLICATION NUMBER: 61829466

FILING DATE: 05/31/2013

PATENT NUMBER:

ISSUE DATE:

TITLE: ANTI-WALL TEICHOIC ANTIBODIES AND CONJUGATES

ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH
PUBLIC RECORDS DIVISION

Docket No. **PR5537**

ASSIGNMENT

WHEREAS, SYMPHOGEN A/S, a DK company whose principal place of business is Elektrovej Building 375, DK-2800 Lyngby, Denmark (hereinafter "ASSIGNOR") has full right, title, and interest in and to a new and useful invention in:

ANTI-WALL TEICHOIC ANTIBODIES AND CONJUGATES

for which a provisional applications Serial No. **61/829,466** (Docket No. **PR5537**) has been filed by them on **May 31, 2013**; and;

WHEREAS, GENENTECH, INC., a corporation organized and existing under and by virtue of the laws of the State of Delaware, having a place of business at 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, is desirous of acquiring an interest in and to said invention, and in and to the Letters Patents to be obtained therefor;

NOW, THEREFORE, be it known by all whom it may concern;

That for good and valuable consideration the receipt of which is hereby acknowledged, the said ASSIGNOR has and does hereby sell, assign, transfer and set over unto the said GENENTECH, INC., its successors and assigns, the full and exclusive right, title and interest including all rights under the Paris Convention for the Protection of Industrial Property, in and to said invention, and in and to any and all Letters Patents to be granted and issued therefor or any continuation, division, renewal, or substitute thereof, and as to Letters Patents any reissue or re-examination thereof, not only for, to, and in the United States of America, its territories and possessions, but for, to and in all other countries; and it has been and is hereby authorized and requested that the appropriate government agencies issue said Letters Patents to said GENENTECH, INC., in accordance with this Assignment.

Said ASSIGNOR covenants and agrees to cooperate with GENENTECH, INC., to enable said GENENTECH, INC. to enjoy to the fullest extent the right, title and interest herein conveyed in the United States and foreign countries. Such cooperation by said ASSIGNOR includes prompt production of pertinent facts and documents, giving of testimony, execution of petitions, oaths, specifications, declarations or other papers, and other assistance all to the extent deemed necessary or desirable by said GENENTECH, INC., (a) for perfecting the right, title and interest herein conveyed; (b) for prosecuting any of said applications; (c) for filing and prosecuting applications for reissuance of any of said patents; (d) for interference or other priority proceedings involving said invention; and (e) for legal proceedings involving said invention and any applications therefor and any patents granted thereon, including without limitation opposition proceedings, cancellation proceedings, priority contests, public use proceedings, infringement actions and court actions; provided, however, that the expense incurred by said ASSIGNOR in providing such cooperation shall be paid for by said GENENTECH, INC.

The terms and covenants of this assignment shall inure to the benefit of said GENENTECH, INC., its successors, assigns and other legal representatives, and shall be binding upon said ASSIGNOR, their respective heirs, legal representatives and assigns.

Said ASSIGNOR hereby warrants and represents that they have not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

IN WITNESS WHEREOF we undersign as follows;

Lyngby, Denmark

Dated: 28-6-2013

CEO

For and on behalf of
Symphogen A/S

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
UNDER SECRETARY OF COMMERCE FOR INTELLECTUAL PROPERTY AND
DIRECTOR OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

NOVEMBER 1, 2013

PTAS

ALEX ANDRUS
1 DNA WAY
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080

502553040

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
NOTICE OF RECORDATION OF ASSIGNMENT DOCUMENT

THE ENCLOSED DOCUMENT HAS BEEN RECORDED BY THE ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH OF THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE. A COMPLETE COPY IS AVAILABLE AT THE ASSIGNMENT SEARCH ROOM ON THE REEL AND FRAME NUMBER REFERENCED BELOW.

PLEASE REVIEW ALL INFORMATION CONTAINED ON THIS NOTICE. THE INFORMATION CONTAINED ON THIS RECORDATION NOTICE REFLECTS THE DATA PRESENT IN THE PATENT AND TRADEMARK ASSIGNMENT SYSTEM. IF YOU SHOULD FIND ANY ERRORS OR HAVE QUESTIONS CONCERNING THIS NOTICE, YOU MAY CONTACT THE ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH AT 571-272-3350. PLEASE SEND REQUEST FOR CORRECTION TO: U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE, MAIL STOP: ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH, P.O. BOX 1450, ALEXANDRIA, VA 22313.

RECORDATION DATE: 10/31/2013

REEL/FRAME: 031520/0456
NUMBER OF PAGES: 8

BRIEF: ASSIGNMENT OF ASSIGNORS INTEREST (SEE DOCUMENT FOR DETAILS).

DOCKET NUMBER: PR5537

ASSIGNOR: BROWN, ERIC J.	DOC DATE: 10/14/2013
ASSIGNOR: FLYGARE, JOHN	DOC DATE: 10/14/2013
ASSIGNOR: HAZENBOS, WOUTER	DOC DATE: 10/14/2013
ASSIGNOR: LEHAR, SOPHIE M.	DOC DATE: 10/14/2013
ASSIGNOR: MARIATHASAN, SANJEEV	DOC DATE: 10/14/2013
ASSIGNOR: PILLOW, THOMAS H.	DOC DATE: 10/23/2013
ASSIGNOR: STABEN, LEANNA	DOC DATE: 10/14/2013

Docket No. **PR5537**

ASSIGNMENT

WHEREAS, Eric J. Brown, John Flygare, Wouter Hazenbos, Sophie M. Lehar, Sanjeev Mariathasan, Thomas H. Pillow, Leanna Staben and Richard Vandlen (each an "ASSIGNOR"), have invented a new and useful invention in

ANTI-WALL TEICHOIC ANTIBODIES AND CONJUGATES

for which an application Serial No. **61/829,466** (Docket No. **PR5537**) for Letters Patent has been filed by them on **May 31, 2013**; and

WHEREAS, GENENTECH, INC., a corporation organized and existing under and by virtue of the laws of the State of Delaware, having a place of business at 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, is desirous of acquiring an interest in and to said invention, and in and to the Letters Patents to be obtained therefor;

NOW, THEREFORE, be it known by all whom it may concern;

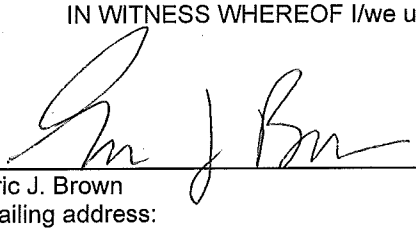
That for good and valuable consideration the receipt of which is hereby acknowledged, the undersigned ASSIGNOR(S) have and do hereby sell, assign, transfer and set over unto the said GENENTECH, INC., its successors and assigns, the full and exclusive right, title and interest, including all rights under the Paris Convention for the Protection of Industrial Property, in and to said invention, and in and to any and all applications filed and Letters Patents granted and issued therefor, or any continuation, division, renewal, or substitute thereof, and as to Letters Patents any reissue or re-examination thereof, not only for, to, and in the United States of America, its territories and possessions, but for, to and in all other countries; and it has been and is hereby authorized and requested that the appropriate government agencies issue said Letters Patents to said GENENTECH, INC., in accordance with this Assignment.

The undersigned ASSIGNOR(S) covenant and agree to cooperate with GENENTECH, INC., to enable said GENENTECH, INC. to enjoy to the fullest extent the right, title and interest herein conveyed in the United States and foreign countries. Such cooperation by the undersigned ASSIGNOR(S) includes prompt production of pertinent facts and documents, giving of testimony, execution of petitions, oaths, specifications, declarations or other papers, and other assistance, all to the extent deemed necessary or desirable by said GENENTECH, INC., (a) for perfecting the right, title and interest herein conveyed; (b) for prosecuting any of said applications; (c) for filing and prosecuting applications for reissuance of any of said patents; (d) for interference or other priority proceedings involving said invention; and (e) for legal proceedings involving said invention and any applications therefor and any patents granted thereon, including without limitation opposition proceedings, cancellation proceedings, priority contests, public use proceedings, infringement actions and court actions; provided, however, that the expense incurred by the undersigned ASSIGNOR(S) in providing such cooperation shall be paid for by said GENENTECH, INC.

The terms and covenants of this assignment shall inure to the benefit of said GENENTECH, INC., its successors, assigns and other legal representatives, and shall be binding upon the undersigned ASSIGNOR(S), their respective heirs, legal representatives and assigns.

The undersigned ASSIGNOR(S) hereby warrant and represent that they have not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

IN WITNESS WHEREOF I/we undersign as follows;

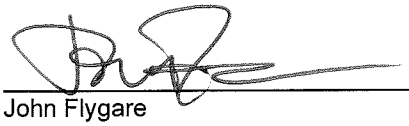


14 Oct 2013

Eric J. Brown — Date

Mailing address:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080

Citizenship: US

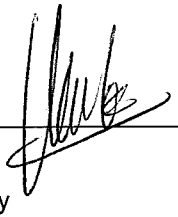


14 Oct 2013

John Flygare — Date

Mailing address:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080

Citizenship: US

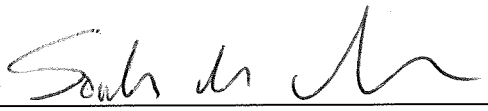


10/14/2013

Wouter Hazenbos — Date

Mailing address:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080

Citizenship: US

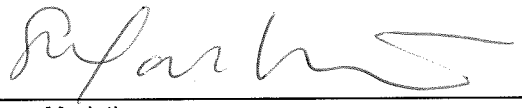


10/14/13

Sophie M. Lehar — Date

Mailing address:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080

Citizenship: US



10/14/2013

Sanjeev Mariathasan — Date

Mailing address:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080

Citizenship: CA

Thomas Pillow 10/23/13

Thomas H. Pillow
Mailing address:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080
Citizenship: US

Date

Leanna Staben 10/14/13

Leanna Staben
Mailing address:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080
Citizenship: US

Date

Richard Vandlen
Mailing address:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080
Citizenship: US

Date

Docket No. **PR5537**

ASSIGNMENT

WHEREAS, Eric J. Brown, John Flygare, Wouter Hazenbos, Sophie M. Lehar, Sanjeev Mariathasan, Thomas H. Pillow, Leanna Staben and Richard Vandlen (each an "ASSIGNOR"), have invented a new and useful invention in

ANTI-WALL TEICHOIC ANTIBODIES AND CONJUGATES

for which an application Serial No. **61/829,466** (Docket No. **PR5537**) for Letters Patent has been filed by them on **May 31, 2013**; and

WHEREAS, GENENTECH, INC., a corporation organized and existing under and by virtue of the laws of the State of Delaware, having a place of business at 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, is desirous of acquiring an interest in and to said invention, and in and to the Letters Patents to be obtained therefor;

NOW, THEREFORE, be it known by all whom it may concern;

That for good and valuable consideration the receipt of which is hereby acknowledged, the undersigned ASSIGNOR(S) have and do hereby sell, assign, transfer and set over unto the said GENENTECH, INC., its successors and assigns, the full and exclusive right, title and interest, including all rights under the Paris Convention for the Protection of Industrial Property, in and to said invention, and in and to any and all applications filed and Letters Patents granted and issued therefor, or any continuation, division, renewal, or substitute thereof, and as to Letters Patents any reissue or re-examination thereof, not only for, to, and in the United States of America, its territories and possessions, but for, to and in all other countries; and it has been and is hereby authorized and requested that the appropriate government agencies issue said Letters Patents to said GENENTECH, INC., in accordance with this Assignment.

The undersigned ASSIGNOR(S) covenant and agree to cooperate with GENENTECH, INC., to enable said GENENTECH, INC. to enjoy to the fullest extent the right, title and interest herein conveyed in the United States and foreign countries. Such cooperation by the undersigned ASSIGNOR(S) includes prompt production of pertinent facts and documents, giving of testimony, execution of petitions, oaths, specifications, declarations or other papers, and other assistance, all to the extent deemed necessary or desirable by said GENENTECH, INC., (a) for perfecting the right, title and interest herein conveyed; (b) for prosecuting any of said applications; (c) for filing and prosecuting applications for reissuance of any of said patents; (d) for interference or other priority proceedings involving said invention; and (e) for legal proceedings involving said invention and any applications therefor and any patents granted thereon, including without limitation opposition proceedings, cancellation proceedings, priority contests, public use proceedings, infringement actions and court actions; provided, however, that the expense incurred by the undersigned ASSIGNOR(S) in providing such cooperation shall be paid for by said GENENTECH, INC.

The terms and covenants of this assignment shall inure to the benefit of said GENENTECH, INC., its successors, assigns and other legal representatives, and shall be binding upon the undersigned ASSIGNOR(S), their respective heirs, legal representatives and assigns.

The undersigned ASSIGNOR(S) hereby warrant and represent that they have not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

IN WITNESS WHEREOF I/we undersign as follows;

Eric J. Brown Date
Mailing address:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080
Citizenship: US

John Flygare Date
Mailing address:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080
Citizenship: US

Wouter Hazenbos Date
Mailing address:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080
Citizenship: US

Sophie M. Lehar Date
Mailing address:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080
Citizenship: US

Sanjeev Mariathasan Date
Mailing address:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080
Citizenship: CA

Thomas H. Pillow — Date

Mailing address:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080
Citizenship: US

Leanna Staben — Date

Mailing address:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080
Citizenship: US

Richard Vandlen — Oct 14, 2013

Richard Vandlen — Date

Mailing address:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080
Citizenship: US

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
UNDER SECRETARY OF COMMERCE FOR INTELLECTUAL PROPERTY AND
DIRECTOR OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

NOVEMBER 1, 2013

PTAS

ALEX ANDRUS
1 DNA WAY
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080

502552964

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
NOTICE OF RECORDATION OF ASSIGNMENT DOCUMENT

THE ENCLOSED DOCUMENT HAS BEEN RECORDED BY THE ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH OF THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE. A COMPLETE COPY IS AVAILABLE AT THE ASSIGNMENT SEARCH ROOM ON THE REEL AND FRAME NUMBER REFERENCED BELOW.

PLEASE REVIEW ALL INFORMATION CONTAINED ON THIS NOTICE. THE INFORMATION CONTAINED ON THIS RECORDATION NOTICE REFLECTS THE DATA PRESENT IN THE PATENT AND TRADEMARK ASSIGNMENT SYSTEM. IF YOU SHOULD FIND ANY ERRORS OR HAVE QUESTIONS CONCERNING THIS NOTICE, YOU MAY CONTACT THE ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH AT 571-272-3350. PLEASE SEND REQUEST FOR CORRECTION TO: U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE, MAIL STOP: ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH, P.O. BOX 1450, ALEXANDRIA, VA 22313.

RECORDATION DATE: 10/31/2013

REEL/FRAME: 031520/0087
NUMBER OF PAGES: 8

BRIEF: ASSIGNMENT OF ASSIGNORS INTEREST (SEE DOCUMENT FOR DETAILS).

DOCKET NUMBER: PR4960

ASSIGNOR: BROWN, ERIC J.	DOC DATE: 10/14/2013
ASSIGNOR: FLYGARE, JOHN	DOC DATE: 10/14/2013
ASSIGNOR: HAZENBOS, WOUTER	DOC DATE: 10/14/2013
ASSIGNOR: LEHAR, SOPHIE M.	DOC DATE: 10/14/2013
ASSIGNOR: MARIATHASAN, SANJEEV	DOC DATE: 10/15/2013
ASSIGNOR: PILLOW, THOMAS H.	DOC DATE: 10/23/2013
ASSIGNOR: STABEN, LEANNA	DOC DATE: 10/14/2013

ASSIGNOR:
VANDLEN, RICHARD

DOC DATE: 10/14/2013

ASSIGNEE:
GENENTECH, INC.
1 DNA WAY
SOUTH SAN FRANCISCO, CALIFORNIA
94080

APPLICATION NUMBER: 61829461
PATENT NUMBER:
TITLE: ANTI-WALL TEICHOIC ANTIBODIES AND CONJUGATES

FILING DATE: 05/31/2013
ISSUE DATE:

ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH
PUBLIC RECORDS DIVISION

Docket No. **PR4960**

ASSIGNMENT

WHEREAS, Eric J. Brown, John Flygare, Wouter Hazenbos, Sophie M. Lehar, Sanjeev Mariathasan, Thomas H. Pillow, Leanna Staben and Richard Vandlen (each an "ASSIGNOR"), have invented a new and useful invention in

ANTI-WALL TEICHOIC ANTIBODIES AND CONJUGATES

for which an application Serial No. **61/829,461** (Docket No. **PR4960**) for Letters Patent has been filed by them on **May 31, 2013**; and

WHEREAS, GENENTECH, INC., a corporation organized and existing under and by virtue of the laws of the State of Delaware, having a place of business at 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, is desirous of acquiring an interest in and to said invention, and in and to the Letters Patents to be obtained therefor;

NOW, THEREFORE, be it known by all whom it may concern;

That for good and valuable consideration the receipt of which is hereby acknowledged, the undersigned ASSIGNOR(S) have and do hereby sell, assign, transfer and set over unto the said GENENTECH, INC., its successors and assigns, the full and exclusive right, title and interest, including all rights under the Paris Convention for the Protection of Industrial Property, in and to said invention, and in and to any and all applications filed and Letters Patents granted and issued therefor, or any continuation, division, renewal, or substitute thereof, and as to Letters Patents any reissue or re-examination thereof, not only for, to, and in the United States of America, its territories and possessions, but for, to and in all other countries; and it has been and is hereby authorized and requested that the appropriate government agencies issue said Letters Patents to said GENENTECH, INC., in accordance with this Assignment.

The undersigned ASSIGNOR(S) covenant and agree to cooperate with GENENTECH, INC., to enable said GENENTECH, INC. to enjoy to the fullest extent the right, title and interest herein conveyed in the United States and foreign countries. Such cooperation by the undersigned ASSIGNOR(S) includes prompt production of pertinent facts and documents, giving of testimony, execution of petitions, oaths, specifications, declarations or other papers, and other assistance, all to the extent deemed necessary or desirable by said GENENTECH, INC., (a) for perfecting the right, title and interest herein conveyed; (b) for prosecuting any of said applications; (c) for filing and prosecuting applications for reissuance of any of said patents; (d) for interference or other priority proceedings involving said invention; and (e) for legal proceedings involving said invention and any applications therefor and any patents granted thereon, including without limitation opposition proceedings, cancellation proceedings, priority contests, public use proceedings, infringement actions and court actions; provided, however, that the expense incurred by the undersigned ASSIGNOR(S) in providing such cooperation shall be paid for by said GENENTECH, INC.

The terms and covenants of this assignment shall inure to the benefit of said GENENTECH, INC., its successors, assigns and other legal representatives, and shall be binding upon the undersigned ASSIGNOR(S), their respective heirs, legal representatives and assigns.

The undersigned ASSIGNOR(S) hereby warrant and represent that they have not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

IN WITNESS WHEREOF I/we undersign as follows;

14 Oct 2013

Eric J. Brown — Date

Mailing address:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080

Citizenship: US

14 Oct 2013

John Flygare — Date

Mailing address:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080

Citizenship: US

10/14/2013

Wouter Hazenbos — Date

Mailing address:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080

Citizenship: US

10/14/13

Sophie M. Lehar — Date

Mailing address:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080

Citizenship: US

10/15/2013

Sanjeev Mariathasan — Date

Mailing address:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080

Citizenship: CA

Thomas H. Pillow — Date: 10/23/13

Thomas H. Pillow
Mailing address:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080
Citizenship: US

Leanna Staben — Date: 10/24/13

Leanna Staben
Mailing address:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080
Citizenship: US

Date

Richard Vandlen
Mailing address:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080
Citizenship: US

Docket No. **PR4960**

ASSIGNMENT

WHEREAS, Eric J. Brown, John Flygare, Wouter Hazenbos, Sophie M. Lehar, Sanjeev Mariathasan, Thomas H. Pillow, Leanna Staben and Richard Vandlen (each an "ASSIGNOR"), have invented a new and useful invention in

ANTI-WALL TEICHOIC ANTIBODIES AND CONJUGATES

for which an application Serial No. **61/829,461** (Docket No. **PR4960**) for Letters Patent has been filed by them on **May 31, 2013**; and

WHEREAS, GENENTECH, INC., a corporation organized and existing under and by virtue of the laws of the State of Delaware, having a place of business at 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, is desirous of acquiring an interest in and to said invention, and in and to the Letters Patents to be obtained therefor;

NOW, THEREFORE, be it known by all whom it may concern;

That for good and valuable consideration the receipt of which is hereby acknowledged, the undersigned ASSIGNOR(S) have and do hereby sell, assign, transfer and set over unto the said GENENTECH, INC., its successors and assigns, the full and exclusive right, title and interest, including all rights under the Paris Convention for the Protection of Industrial Property, in and to said invention, and in and to any and all applications filed and Letters Patents granted and issued therefor, or any continuation, division, renewal, or substitute thereof, and as to Letters Patents any reissue or re-examination thereof, not only for, to, and in the United States of America, its territories and possessions, but for, to and in all other countries; and it has been and is hereby authorized and requested that the appropriate government agencies issue said Letters Patents to said GENENTECH, INC., in accordance with this Assignment.

The undersigned ASSIGNOR(S) covenant and agree to cooperate with GENENTECH, INC., to enable said GENENTECH, INC. to enjoy to the fullest extent the right, title and interest herein conveyed in the United States and foreign countries. Such cooperation by the undersigned ASSIGNOR(S) includes prompt production of pertinent facts and documents, giving of testimony, execution of petitions, oaths, specifications, declarations or other papers, and other assistance, all to the extent deemed necessary or desirable by said GENENTECH, INC., (a) for perfecting the right, title and interest herein conveyed; (b) for prosecuting any of said applications; (c) for filing and prosecuting applications for reissuance of any of said patents; (d) for interference or other priority proceedings involving said invention; and (e) for legal proceedings involving said invention and any applications therefor and any patents granted thereon, including without limitation opposition proceedings, cancellation proceedings, priority contests, public use proceedings, infringement actions and court actions; provided, however, that the expense incurred by the undersigned ASSIGNOR(S) in providing such cooperation shall be paid for by said GENENTECH, INC.

The terms and covenants of this assignment shall inure to the benefit of said GENENTECH, INC., its successors, assigns and other legal representatives, and shall be binding upon the undersigned ASSIGNOR(S), their respective heirs, legal representatives and assigns.

The undersigned ASSIGNOR(S) hereby warrant and represent that they have not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

IN WITNESS WHEREOF I/we undersign as follows;

Eric J. Brown Date
Mailing address:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080
Citizenship: US

John Flygare Date
Mailing address:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080
Citizenship: US

Wouter Hazenbos Date
Mailing address:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080
Citizenship: US

Sophie M. Lehar Date
Mailing address:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080
Citizenship: US

Sanjeev Mariathasan Date
Mailing address:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080
Citizenship: CA

Thomas H. Pillow
Mailing address:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080
Citizenship: US

Date

Leanna Staben
Mailing address:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080
Citizenship: US

Date

Richard Vandlen Oct 14, 2013

Richard Vandlen
Mailing address:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080
Citizenship: US

Date

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

UNDER SECRETARY OF COMMERCE FOR INTELLECTUAL PROPERTY AND
DIRECTOR OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

NOVEMBER 1, 2013

PTAS

ALEX ANDRUS
1 DNA WAY
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080

502552984

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
NOTICE OF RECORDATION OF ASSIGNMENT DOCUMENT

THE ENCLOSED DOCUMENT HAS BEEN RECORDED BY THE ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH OF THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE. A COMPLETE COPY IS AVAILABLE AT THE ASSIGNMENT SEARCH ROOM ON THE REEL AND FRAME NUMBER REFERENCED BELOW.

PLEASE REVIEW ALL INFORMATION CONTAINED ON THIS NOTICE. THE INFORMATION CONTAINED ON THIS RECORDATION NOTICE REFLECTS THE DATA PRESENT IN THE PATENT AND TRADEMARK ASSIGNMENT SYSTEM. IF YOU SHOULD FIND ANY ERRORS OR HAVE QUESTIONS CONCERNING THIS NOTICE, YOU MAY CONTACT THE ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH AT 571-272-3350. PLEASE SEND REQUEST FOR CORRECTION TO: U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE, MAIL STOP: ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH, P.O. BOX 1450, ALEXANDRIA, VA 22313.

RECORDATION DATE: 10/31/2013 REEL/FRAME: 031520/0180
NUMBER OF PAGES: 3

BRIEF: ASSIGNMENT OF ASSIGNORS INTEREST (SEE DOCUMENT FOR DETAILS).

DOCKET NUMBER: PR4960

ASSIGNOR:
STRANDH, MAGNUS DOC DATE: 10/24/2013

ASSIGNOR:
KOEFOED, KLAUS DOC DATE: 10/24/2013

ASSIGNOR:
ANDERSEN, PETER S. DOC DATE: 10/24/2013

ASSIGNEE:
SYMPHOGEN A/S
ELEKTROVEJ BUILDING 375
LYNGBY, DENMARK DK-2800

APPLICATION NUMBER: 61829461 FILING DATE: 05/31/2013
PATENT NUMBER: ISSUE DATE:
TITLE: ANTI-WALL TEICHOIC ANTIBODIES AND CONJUGATES

ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH
PUBLIC RECORDS DIVISION

Docket No. **PR4960**

ASSIGNMENT

WHEREAS, Magnus Strandh, Klaus Koefoed, and Peter S. Andersen (each an "ASSIGNOR"), have invented a new and useful invention in

ANTI-WALL TEICHOIC ANTIBODIES AND CONJUGATES

for which an application Serial No. **61/829,461** (Docket No. **PR4960**) for Letters Patent has been filed by them on **May 31, 2013**; and

WHEREAS, SYMPHOGEN A/S, having a place of business at Elektrovej Building 375, DK-2800 Lyngby, Denmark is desirous of acquiring an interest in and to said invention, and in and to the Letters Patents to be obtained therefor;

NOW, THEREFORE, be it known by all whom it may concern;

That for good and valuable consideration the receipt of which is hereby acknowledged, the undersigned ASSIGNOR(S) have and do hereby sell, assign, transfer and set over unto the said SYMPHOGEN A/S, its successors and assigns, the full and exclusive right, title and interest, including all rights under the Paris Convention for the Protection of Industrial Property, in and to said invention, and in and to any and all applications filed and Letters Patents granted and issued therefor, or any continuation, division, renewal, or substitute thereof, and as to Letters Patents any reissue or re-examination thereof, not only for, to, and in the United States of America, its territories and possessions, but for, to and in all other countries; and it has been and is hereby authorized and requested that the appropriate government agencies issue said Letters Patents to said SYMPHOGEN A/S, in accordance with this Assignment.

The undersigned ASSIGNOR(S) covenant and agree to cooperate with SYMPHOGEN A/S, to enable said SYMPHOGEN A/S to enjoy to the fullest extent the right, title and interest herein conveyed in the United States and foreign countries. Such cooperation by the undersigned ASSIGNOR(S) includes prompt production of pertinent facts and documents, giving of testimony, execution of petitions, oaths, specifications, declarations or other papers, and other assistance, all to the extent deemed necessary or desirable by said SYMPHOGEN A/S, (a) for perfecting the right, title and interest herein conveyed; (b) for prosecuting any of said applications; (c) for filing and prosecuting applications for reissuance of any of said patents; (d) for interference or other priority proceedings involving said invention; and (e) for legal proceedings involving said invention and any applications therefor and any patents granted thereon, including without limitation opposition proceedings, cancellation proceedings, priority contests, public use proceedings, infringement actions and court actions; provided, however, that the expense incurred by the undersigned ASSIGNOR(S) in providing such cooperation shall be paid for by said SYMPHOGEN A/S.

The terms and covenants of this assignment shall inure to the benefit of said SYMPHOGEN A/S, its successors, assigns and other legal representatives, and shall be binding upon the undersigned ASSIGNOR(S), their respective heirs, legal representatives and assigns.

The undersigned ASSIGNOR(S) hereby warrant and represent that they have not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

IN WITNESS WHEREOF I/we undersign as follows;

Oct 24, 2013

Magnus Strandh — Date

Mailing address:
Elektrovej Building 375
DK-2800 Lyngby

Citizenship: SE

Oct. 24 2013

Klaus Koefoed — Date

Mailing address:
Elektrovej Building 375
DK-2800 Lyngby

Citizenship: DK

Okt 24 2013

Peter S. Andersen — Date

Mailing address:
Elektrovej Building 375
DK-2800 Lyngby

Citizenship: DK

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

UNDER SECRETARY OF COMMERCE FOR INTELLECTUAL PROPERTY AND
DIRECTOR OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

NOVEMBER 1, 2013

PTAS

ALEX ANDRUS
1 DNA WAY
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080

502552999

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
NOTICE OF RECORDATION OF ASSIGNMENT DOCUMENT

THE ENCLOSED DOCUMENT HAS BEEN RECORDED BY THE ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH OF THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE. A COMPLETE COPY IS AVAILABLE AT THE ASSIGNMENT SEARCH ROOM ON THE REEL AND FRAME NUMBER REFERENCED BELOW.

PLEASE REVIEW ALL INFORMATION CONTAINED ON THIS NOTICE. THE INFORMATION CONTAINED ON THIS RECORDATION NOTICE REFLECTS THE DATA PRESENT IN THE PATENT AND TRADEMARK ASSIGNMENT SYSTEM. IF YOU SHOULD FIND ANY ERRORS OR HAVE QUESTIONS CONCERNING THIS NOTICE, YOU MAY CONTACT THE ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH AT 571-272-3350. PLEASE SEND REQUEST FOR CORRECTION TO: U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE, MAIL STOP: ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH, P.O. BOX 1450, ALEXANDRIA, VA 22313.

RECORDATION DATE: 10/31/2013

REEL/FRAME: 031520/0282
NUMBER OF PAGES: 2

BRIEF: ASSIGNMENT OF ASSIGNORS INTEREST (SEE DOCUMENT FOR DETAILS).

DOCKET NUMBER: PR4960

ASSIGNOR:
SYMPHOGEN A/S

DOC DATE: 10/28/2013

ASSIGNEE:
GENENTECH, INC.
1 DNA WAY
SOUTH SAN FRANCISCO, CALIFORNIA
94080

APPLICATION NUMBER: 61829461
PATENT NUMBER:

FILING DATE: 05/31/2013
ISSUE DATE:

TITLE: ANTI-WALL TEICHOIC ANTIBODIES AND CONJUGATES

ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH
PUBLIC RECORDS DIVISION

Docket No. **PR4960**

ASSIGNMENT

WHEREAS, SYMPHOGEN A/S, a DK company whose principal place of business is Elektrovej Building 375, DK-2800 Lyngby, Denmark (hereinafter "ASSIGNOR") has full right, title, and interest in and to a new and useful invention in:

ANTI-WALL TEICHOIC ANTIBODIES AND CONJUGATES

for which a provisional applications Serial No. **61/829,461** (Docket No. **PR4960**) has been filed by them on **May 31, 2013**; and;

WHEREAS, GENENTECH, INC., a corporation organized and existing under and by virtue of the laws of the State of Delaware, having a place of business at 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, is desirous of acquiring an interest in and to said invention, and in and to the Letters Patents to be obtained therefor;

NOW, THEREFORE, be it known by all whom it may concern;

That for good and valuable consideration the receipt of which is hereby acknowledged, the said ASSIGNOR has and does hereby sell, assign, transfer and set over unto the said GENENTECH, INC., its successors and assigns, the full and exclusive right, title and interest including all rights under the Paris Convention for the Protection of Industrial Property, in and to said invention, and in and to any and all Letters Patents to be granted and issued therefor or any continuation, division, renewal, or substitute thereof, and as to Letters Patents any reissue or re-examination thereof, not only for, to, and in the United States of America, its territories and possessions, but for, to and in all other countries; and it has been and is hereby authorized and requested that the appropriate government agencies issue said Letters Patents to said GENENTECH, INC., in accordance with this Assignment.

Said ASSIGNOR covenants and agrees to cooperate with GENENTECH, INC., to enable said GENENTECH, INC. to enjoy to the fullest extent the right, title and interest herein conveyed in the United States and foreign countries. Such cooperation by said ASSIGNOR includes prompt production of pertinent facts and documents, giving of testimony, execution of petitions, oaths, specifications, declarations or other papers, and other assistance all to the extent deemed necessary or desirable by said GENENTECH, INC., (a) for perfecting the right, title and interest herein conveyed; (b) for prosecuting any of said applications; (c) for filing and prosecuting applications for reissuance of any of said patents; (d) for interference or other priority proceedings involving said invention; and (e) for legal proceedings involving said invention and any applications therefor and any patents granted thereon, including without limitation opposition proceedings, cancellation proceedings, priority contests, public use proceedings, infringement actions and court actions; provided, however, that the expense incurred by said ASSIGNOR in providing such cooperation shall be paid for by said GENENTECH, INC.

The terms and covenants of this assignment shall inure to the benefit of said GENENTECH, INC., its successors, assigns and other legal representatives, and shall be binding upon said ASSIGNOR, their respective heirs, legal representatives and assigns.

Said ASSIGNOR hereby warrants and represents that they have not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

IN WITNESS WHEREOF we undersign as follows;

Lyngby, Denmark

Dated: 28-10-2013

CEO

For and on behalf of
Symphogen A/S

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
UNDER SECRETARY OF COMMERCE FOR INTELLECTUAL PROPERTY AND
DIRECTOR OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

MAY 19, 2014

PTAS

ALEX ANDRUS
1 DNA WAY
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080

502812523

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
NOTICE OF RECORDATION OF ASSIGNMENT DOCUMENT

THE ENCLOSED DOCUMENT HAS BEEN RECORDED BY THE ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH OF THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE. A COMPLETE COPY IS AVAILABLE AT THE ASSIGNMENT SEARCH ROOM ON THE REEL AND FRAME NUMBER REFERENCED BELOW.

PLEASE REVIEW ALL INFORMATION CONTAINED ON THIS NOTICE. THE INFORMATION CONTAINED ON THIS RECORDATION NOTICE REFLECTS THE DATA PRESENT IN THE PATENT AND TRADEMARK ASSIGNMENT SYSTEM. IF YOU SHOULD FIND ANY ERRORS OR HAVE QUESTIONS CONCERNING THIS NOTICE, YOU MAY CONTACT THE ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH AT 571-272-3350. PLEASE SEND REQUEST FOR CORRECTION TO: U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE, MAIL STOP: ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH, P.O. BOX 1450, ALEXANDRIA, VA 22313.

RECORDATION DATE: 05/16/2014

REEL/FRAME: 032914/0352
NUMBER OF PAGES: 3

BRIEF: ASSIGNMENT OF ASSIGNORS INTEREST (SEE DOCUMENT FOR DETAILS).

DOCKET NUMBER: PR4960

ASSIGNOR:
MORISAKI, JOHN HIROSHI

DOC DATE: 05/16/2014

ASSIGNEE:
GENENTECH, INC.
1 DNA WAY
SOUTH SAN FRANCISCO, CALIFORNIA
94080

APPLICATION NUMBER: 61829461
PATENT NUMBER:

FILING DATE: 05/31/2013
ISSUE DATE:

TITLE: ANTI-WALL TEICHOIC ANTIBODIES AND CONJUGATES

ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH
PUBLIC RECORDS DIVISION

PATENT ASSIGNMENT COVER SHEET

Electronic Version v1.1
Stylesheet Version v1.2

EPAS ID: PAT2859117

SUBMISSION TYPE:	NEW ASSIGNMENT
NATURE OF CONVEYANCE:	ASSIGNMENT

CONVEYING PARTY DATA

Name	Execution Date
JOHN HIROSHI MORISAKI	05/16/2014

RECEIVING PARTY DATA

Name:	GENENTECH, INC.
Street Address:	1 DNA WAY
City:	SOUTH SAN FRANCISCO
State/Country:	CALIFORNIA
Postal Code:	94080

PROPERTY NUMBERS Total: 1

Property Type	Number
Application Number:	61829461

CORRESPONDENCE DATA

Fax Number: (650)952-9881

Correspondence will be sent to the e-mail address first; if that is unsuccessful, it will be sent via US Mail.

Phone: (650) 467-4255
Email: docketing-d@gene.com, ely@gene.com
Correspondent Name: ALEX ANDRUS
Address Line 1: 1 DNA WAY
Address Line 4: SOUTH SAN FRANCISCO, CALIFORNIA 94080

ATTORNEY DOCKET NUMBER:	PR4960
NAME OF SUBMITTER:	ALEX ANDRUS
SIGNATURE:	/ALEX ANDRUS/
DATE SIGNED:	05/16/2014

Total Attachments: 2
source=PR4960_Assignment_HiroshiMorisaki#page1.tif
source=PR4960_Assignment_HiroshiMorisaki#page2.tif

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
UNDER SECRETARY OF COMMERCE FOR INTELLECTUAL PROPERTY AND
DIRECTOR OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

MARCH 2, 2015

PTAS

ALEX ANDRUS
1 DNA WAY
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080

503199111

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
NOTICE OF RECORDATION OF ASSIGNMENT DOCUMENT

THE ENCLOSED DOCUMENT HAS BEEN RECORDED BY THE ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH OF THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE. A COMPLETE COPY IS AVAILABLE AT THE ASSIGNMENT SEARCH ROOM ON THE REEL AND FRAME NUMBER REFERENCED BELOW.

PLEASE REVIEW ALL INFORMATION CONTAINED ON THIS NOTICE. THE INFORMATION CONTAINED ON THIS RECORDATION NOTICE REFLECTS THE DATA PRESENT IN THE PATENT AND TRADEMARK ASSIGNMENT SYSTEM. IF YOU SHOULD FIND ANY ERRORS OR HAVE QUESTIONS CONCERNING THIS NOTICE, YOU MAY CONTACT THE ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH AT 571-272-3350. PLEASE SEND REQUEST FOR CORRECTION TO: U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE, MAIL STOP: ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH, P.O. BOX 1450, ALEXANDRIA, VA 22313.

RECORDATION DATE: 02/27/2015

REEL/FRAME: 035057/0023
NUMBER OF PAGES: 11

BRIEF: ASSIGNMENT OF ASSIGNORS INTEREST (SEE DOCUMENT FOR DETAILS).

DOCKET NUMBER: P5537R1-US/WO

ASSIGNOR:
BROWN, ERIC J. DOC DATE: 05/16/2014

ASSIGNOR:
FLYGARE, JOHN DOC DATE: 05/16/2014

ASSIGNOR:
HAZENBOS, WOUTER DOC DATE: 05/16/2014

ASSIGNOR:
LEHAR, SOPHIE M. DOC DATE: 05/16/2014

ASSIGNOR:
MARIATHASAN, SANJEEV DOC DATE: 05/16/2014

ASSIGNOR:
MORISAKI, JOHN HIROSHI DOC DATE: 05/16/2014

ASSIGNOR:
VANDLEN, RICHARD DOC DATE: 05/16/2014

ASSIGNOR:
PILLOW, THOMAS H. DOC DATE: 05/20/2014

ASSIGNOR:
STABEN, LEANNA DOC DATE: 05/21/2014

ASSIGNEE:
GENENTECH, INC.
1 DNA WAY
SOUTH SAN FRANCISCO, CALIFORNIA
94080

APPLICATION NUMBER: 14284619 FILING DATE: 05/22/2014
PATENT NUMBER: ISSUE DATE:
TITLE: ANTI-WALL TEICHOIC ANTIBODIES AND CONJUGATES

APPLICATION NUMBER: FILING DATE: 05/22/2014
PATENT NUMBER: ISSUE DATE:
PCT NUMBER: US2014039113
TITLE: ANTI-WALL TEICHOIC ANTIBODIES AND CONJUGATES

ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH
PUBLIC RECORDS DIVISION

PATENT ASSIGNMENT COVER SHEET

Electronic Version v1.1
Stylesheet Version v1.2

EPAS ID: PAT3245728

SUBMISSION TYPE:	NEW ASSIGNMENT
NATURE OF CONVEYANCE:	ASSIGNMENT

CONVEYING PARTY DATA

Name	Execution Date
ERIC J. BROWN	05/16/2014
JOHN FLYGARE	05/16/2014
WOUTER HAZENBOS	05/16/2014
SOPHIE M. LEHAR	05/16/2014
SANJEEV MARIATHASAN	05/16/2014
JOHN HIROSHI MORISAKI	05/16/2014
RICHARD VANDLEN	05/16/2014
THOMAS H. PILLOW	05/20/2014
LEANNA STABEN	05/21/2014

RECEIVING PARTY DATA

Name:	GENENTECH, INC.
Street Address:	1 DNA WAY
City:	SOUTH SAN FRANCISCO
State/Country:	CALIFORNIA
Postal Code:	94080

PROPERTY NUMBERS Total: 2

Property Type	Number
Application Number:	14284619
PCT Number:	US2014039113

CORRESPONDENCE DATA

Fax Number: (650)952-9881

Correspondence will be sent to the e-mail address first; if that is unsuccessful, it will be sent using a fax number, if provided; if that is unsuccessful, it will be sent via US Mail.

Phone: (650) 467-4255
Email: docketing-d@gene.com, ely@gene.com
Correspondent Name: ALEX ANDRUS
Address Line 1: 1 DNA WAY
Address Line 4: SOUTH SAN FRANCISCO, CALIFORNIA 94080

ATTORNEY DOCKET NUMBER:	P5537R1-US/WO

Docket No. P5537R1

ASSIGNMENT

WHEREAS, Eric J. Brown, John Flygare, Wouter Hazenbos, Sophie M. Lehar, Sanjeev Mariathasan, John Hiroshi Morisaki, Thomas H. Pillow, Leanna Staben and Richard Vandlen (each an "ASSIGNOR"), have invented a new and useful invention in

ANTI-WALL TEICHOIC ANTIBODIES AND CONJUGATES

for which United States non-provisional application Serial No. 14/284,619 [1] (Docket No. **P5537R1-US**) has been filed on May 22, 2014 [1]; and

for which International patent application No. PCT/US2014/039113 [1] (Docket No. **P5537R1-WO**) has been filed on May 22, 2014 [1];

which claim priority to United States provisional patent application Serial No. **61/829,466** (Docket No. **PR5537**) filed on **May 31, 2013**; and

WHEREAS, GENENTECH, INC., a corporation organized and existing under and by virtue of the laws of the State of Delaware, having a place of business at 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, is desirous of acquiring an interest in and to said invention, and in and to the Letters Patents to be obtained therefor;

NOW, THEREFORE, be it known by all whom it may concern;

That for good and valuable consideration the receipt of which is hereby acknowledged, the undersigned ASSIGNOR(S) have and do hereby sell, assign, transfer and set over unto said GENENTECH, INC., its successors and assigns, the undersigned ASSIGNOR(S)' full and exclusive right, title and interest, including all rights under the Paris Convention for the Protection of Industrial Property, in and to said invention, and in and to any and all applications filed and Letters Patents granted and issued therefor, or any continuation, division, renewal, or substitute thereof, and as to Letters Patents any reissue or re-examination thereof, not only for, to, and in the United States of America, its territories and possessions, but for, to and in all other countries; and it has been and is hereby authorized and requested that the appropriate government agencies issue said Letters Patents to said GENENTECH, INC., in accordance with this Assignment.

The undersigned ASSIGNOR(S) covenant and agree to cooperate with GENENTECH, INC., to enable said GENENTECH, INC. to enjoy to the fullest extent the undersigned ASSIGNOR(S)' right, title and interest herein conveyed in the United States and foreign countries. Such cooperation by the undersigned ASSIGNOR(S) includes prompt production of pertinent facts and documents, giving of testimony, execution of petitions, oaths, specifications, declarations or other papers, and other assistance, all to the extent deemed necessary or desirable by said GENENTECH, INC., (a) for perfecting the right, title and interest herein conveyed; (b) for prosecuting any of said applications; (c) for filing and prosecuting applications for reissuance of any of said patents; (d) for interference or other priority proceedings involving said invention; and (e) for legal proceedings involving said invention and any applications therefor and any patents granted thereon, including without limitation opposition proceedings, cancellation proceedings, priority contests, public use proceedings, infringement actions and court actions; provided, however, that the expense incurred by the undersigned ASSIGNOR(S) in providing such cooperation shall be paid for by said GENENTECH, INC.

---

[1] Assignor hereby authorizes Genentech, Inc., and their representatives and assigns to insert the application number and filing date information when they become known.

The terms and covenants of this assignment shall inure to the benefit of said GENENTECH, INC., its successors, assigns and other legal representatives, and shall be binding upon the undersigned ASSIGNOR(S), their respective heirs, legal representatives and assigns.

The undersigned ASSIGNOR(S) hereby warrant and represent that they have not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

IN WITNESS WHEREOF I/we undersign as follows;

5/16/14

Eric J. Brown — Date

Mailing address:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080
Citizenship: US

5/16/14

John Flygare — Date

Mailing address:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080
Citizenship: US

05/16/14

Wouter Hazenbos — Date

Mailing address:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080
Citizenship: US

5/16/14

Sophie M. Lehar — Date

Mailing address:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080
Citizenship: US

5/16/14

Sanjeev Mariathasan — Date
Mailing address:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080
Citizenship: CA

5/16/14

John Hiroshi Morisaki — Date
Mailing address:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080
Citizenship: US

Thomas H. Pillow — Date
Mailing address:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080
Citizenship: US

Leanna Staben — Date
Mailing address:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080
Citizenship: US

Richard Vandlen 5/16/14

Richard Vandlen — Date
Mailing address:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080
Citizenship: US

Docket No. P5537R1

ASSIGNMENT

WHEREAS, Eric J. Brown, John Flygare, Wouter Hazenbos, Sophie M. Lehar, Sanjeev Mariathasan, John Hiroshi Morisaki, Thomas H. Pillow, Leanna Staben and Richard Vandlen (each an "ASSIGNOR"), have invented a new and useful invention in

ANTI-WALL TEICHOIC ANTIBODIES AND CONJUGATES

for which United States non-provisional application Serial No. 14/284,619 [1] (Docket No. **P5537R1-US**) has been filed on May 22, 2014 [1]; and

for which International patent application No. PCT/US2014/039113 [1] (Docket No. **P5537R1-WO**) has been filed on May 22, 2014 [1];

which claim priority to United States provisional patent application Serial No. **61/829,466** (Docket No. **PR5537**) filed on **May 31, 2013**; and

WHEREAS, GENENTECH, INC., a corporation organized and existing under and by virtue of the laws of the State of Delaware, having a place of business at 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, is desirous of acquiring an interest in and to said invention, and in and to the Letters Patents to be obtained therefor;

NOW, THEREFORE, be it known by all whom it may concern;

That for good and valuable consideration the receipt of which is hereby acknowledged, the undersigned ASSIGNOR(S) have and do hereby sell, assign, transfer and set over unto said GENENTECH, INC., its successors and assigns, the undersigned ASSIGNOR(S)' full and exclusive right, title and interest, including all rights under the Paris Convention for the Protection of Industrial Property, in and to said invention, and in and to any and all applications filed and Letters Patents granted and issued therefor, or any continuation, division, renewal, or substitute thereof, and as to Letters Patents any reissue or re-examination thereof, not only for, to, and in the United States of America, its territories and possessions, but for, to and in all other countries; and it has been and is hereby authorized and requested that the appropriate government agencies issue said Letters Patents to said GENENTECH, INC., in accordance with this Assignment.

The undersigned ASSIGNOR(S) covenant and agree to cooperate with GENENTECH, INC., to enable said GENENTECH, INC. to enjoy to the fullest extent the undersigned ASSIGNOR(S)' right, title and interest herein conveyed in the United States and foreign countries. Such cooperation by the undersigned ASSIGNOR(S) includes prompt production of pertinent facts and documents, giving of testimony, execution of petitions, oaths, specifications, declarations or other papers, and other assistance, all to the extent deemed necessary or desirable by said GENENTECH, INC., (a) for perfecting the right, title and interest herein conveyed; (b) for prosecuting any of said applications; (c) for filing and prosecuting applications for reissuance of any of said patents; (d) for interference or other priority proceedings involving said invention; and (e) for legal proceedings involving said invention and any applications therefor and any patents granted thereon, including without limitation opposition proceedings, cancellation proceedings, priority contests, public use proceedings, infringement actions and court actions; provided, however, that the expense incurred by the undersigned ASSIGNOR(S) in providing such cooperation shall be paid for by said GENENTECH, INC.

---

[1] Assignor hereby authorizes Genentech, Inc., and their representatives and assigns to insert the application number and filing date information when they become known.

The terms and covenants of this assignment shall inure to the benefit of said GENENTECH, INC., its successors, assigns and other legal representatives, and shall be binding upon the undersigned ASSIGNOR(S), their respective heirs, legal representatives and assigns.

The undersigned ASSIGNOR(S) hereby warrant and represent that they have not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

IN WITNESS WHEREOF I/we undersign as follows;

Eric J. Brown Date
Mailing address:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080
Citizenship: US

John Flygare Date
Mailing address:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080
Citizenship: US

Wouter Hazenbos Date
Mailing address:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080
Citizenship: US

Sophie M. Lehar Date
Mailing address:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080
Citizenship: US

Sanjeev Mariathasan Date
Mailing address:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080
Citizenship: CA

John Hiroshi Morisaki Date
Mailing address:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080
Citizenship: US

Thomas H. Pillow 5/20/14
Thomas H. Pillow Date
Mailing address:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080
Citizenship: US

Leanna Staben Date
Mailing address:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080
Citizenship: US

Richard Vandlen Date
Mailing address:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080
Citizenship: US

Docket No. P5537R1

ASSIGNMENT

WHEREAS, Eric J. Brown, John Flygare, Wouter Hazenbos, Sophie M. Lehar, Sanjeev Mariathasan, John Hiroshi Morisaki, Thomas H. Pillow, Leanna Staben and Richard Vandlen (each an "ASSIGNOR"), have invented a new and useful invention in

ANTI-WALL TEICHOIC ANTIBODIES AND CONJUGATES

for which United States non-provisional application Serial No. 14/284,619[1] (Docket No. **P5537R1-US**) has been filed on May 22, 2014[1]; and

for which International patent application No. PCT/US2014/039113[1] (Docket No. **P5537R1-WO**) has been filed on May 22, 2014[1];

which claim priority to United States provisional patent application Serial No. **61/829,466** (Docket No. **PR5537**) filed on **May 31, 2013**; and

WHEREAS, GENENTECH, INC., a corporation organized and existing under and by virtue of the laws of the State of Delaware, having a place of business at 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, is desirous of acquiring an interest in and to said invention, and in and to the Letters Patents to be obtained therefor;

NOW, THEREFORE, be it known by all whom it may concern;

That for good and valuable consideration the receipt of which is hereby acknowledged, the undersigned ASSIGNOR(S) have and do hereby sell, assign, transfer and set over unto said GENENTECH, INC., its successors and assigns, the undersigned ASSIGNOR(S)' full and exclusive right, title and interest, including all rights under the Paris Convention for the Protection of Industrial Property, in and to said invention, and in and to any and all applications filed and Letters Patents granted and issued therefor, or any continuation, division, renewal, or substitute thereof, and as to Letters Patents any reissue or re-examination thereof, not only for, to, and in the United States of America, its territories and possessions, but for, to and in all other countries; and it has been and is hereby authorized and requested that the appropriate government agencies issue said Letters Patents to said GENENTECH, INC., in accordance with this Assignment.

The undersigned ASSIGNOR(S) covenant and agree to cooperate with GENENTECH, INC., to enable said GENENTECH, INC. to enjoy to the fullest extent the undersigned ASSIGNOR(S)' right, title and interest herein conveyed in the United States and foreign countries. Such cooperation by the undersigned ASSIGNOR(S) includes prompt production of pertinent facts and documents, giving of testimony, execution of petitions, oaths, specifications, declarations or other papers, and other assistance, all to the extent deemed necessary or desirable by said GENENTECH, INC., (a) for perfecting the right, title and interest herein conveyed; (b) for prosecuting any of said applications; (c) for filing and prosecuting applications for reissuance of any of said patents; (d) for interference or other priority proceedings involving said invention; and (e) for legal proceedings involving said invention and any applications therefor and any patents granted thereon, including without limitation opposition proceedings, cancellation proceedings, priority contests, public use proceedings, infringement actions and court actions; provided, however, that the expense incurred by the undersigned ASSIGNOR(S) in providing such cooperation shall be paid for by said GENENTECH, INC.

---

[1] Assignor hereby authorizes Genentech, Inc., and their representatives and assigns to insert the application number and filing date information when they become known.

The terms and covenants of this assignment shall inure to the benefit of said GENENTECH, INC., its successors, assigns and other legal representatives, and shall be binding upon the undersigned ASSIGNOR(S), their respective heirs, legal representatives and assigns.

The undersigned ASSIGNOR(S) hereby warrant and represent that they have not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

IN WITNESS WHEREOF I/we undersign as follows;

Eric J. Brown Date
Mailing address:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080
Citizenship: US

John Flygare Date
Mailing address:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080
Citizenship: US

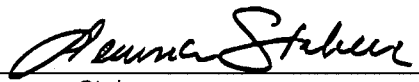
Wouter Hazenbos Date
Mailing address:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080
Citizenship: US

Sophie M. Lehar Date
Mailing address:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080
Citizenship: US

Sanjeev Mariathasan Date
Mailing address:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080
Citizenship: CA

John Hiroshi Morisaki Date
Mailing address:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080
Citizenship: US

Thomas H. Pillow Date
Mailing address:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080
Citizenship: US



5-21-2014

Leanna Staben Date
Mailing address:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080
Citizenship: US

Richard Vandlen Date
Mailing address:
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080
Citizenship: US

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
UNDER SECRETARY OF COMMERCE FOR INTELLECTUAL PROPERTY AND
DIRECTOR OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

MARCH 2, 2015

PTAS

ALEX ANDRUS
1 DNA WAY
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080

503199142

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
NOTICE OF RECORDATION OF ASSIGNMENT DOCUMENT

THE ENCLOSED DOCUMENT HAS BEEN RECORDED BY THE ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH OF THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE. A COMPLETE COPY IS AVAILABLE AT THE ASSIGNMENT SEARCH ROOM ON THE REEL AND FRAME NUMBER REFERENCED BELOW.

PLEASE REVIEW ALL INFORMATION CONTAINED ON THIS NOTICE. THE INFORMATION CONTAINED ON THIS RECORDATION NOTICE REFLECTS THE DATA PRESENT IN THE PATENT AND TRADEMARK ASSIGNMENT SYSTEM. IF YOU SHOULD FIND ANY ERRORS OR HAVE QUESTIONS CONCERNING THIS NOTICE, YOU MAY CONTACT THE ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH AT 571-272-3350. PLEASE SEND REQUEST FOR CORRECTION TO: U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE, MAIL STOP: ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH, P.O. BOX 1450, ALEXANDRIA, VA 22313.

RECORDATION DATE: 02/27/2015

REEL/FRAME: 035057/0161
NUMBER OF PAGES: 6

BRIEF: ASSIGNMENT OF ASSIGNORS INTEREST (SEE DOCUMENT FOR DETAILS).

DOCKET NUMBER: P5537R1-US/WO

ASSIGNOR:
KOEFOED, KLAUS

DOC DATE: 05/20/2014

ASSIGNOR:
STRANDH, MAGNUS

DOC DATE: 05/20/2014

ASSIGNOR:
ANDERSEN, PETER S.

DOC DATE: 05/19/2014

ASSIGNEE:
SYMPHOGEN A/S
ELEKTROVEJ BUILDING 375
LYNGBY, DENMARK DK-2800

APPLICATION NUMBER: 14284619
PATENT NUMBER:
TITLE: ANTI-WALL TEICHOIC ANTIBODIES AND CONJUGATES

FILING DATE: 05/22/2014
ISSUE DATE:

APPLICATION NUMBER:
PATENT NUMBER:
PCT NUMBER: US2014039113
TITLE: ANTI-WALL TEICHOIC ANTIBODIES AND CONJUGATES

FILING DATE: 05/22/2014
ISSUE DATE:

ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH
PUBLIC RECORDS DIVISION

PATENT ASSIGNMENT COVER SHEET

Electronic Version v1.1
Stylesheet Version v1.2

EPAS ID: PAT3245759

SUBMISSION TYPE:	NEW ASSIGNMENT
NATURE OF CONVEYANCE:	ASSIGNMENT

CONVEYING PARTY DATA

Name	Execution Date
KLAUS KOEFOED	05/20/2014
MAGNUS STRANDH	05/20/2014
PETER S. ANDERSEN	05/19/2014

RECEIVING PARTY DATA

Name:	SYMPHOGEN A/S
Street Address:	ELEKTROVEJ BUILDING 375
City:	LYNGBY
State/Country:	DENMARK
Postal Code:	DK-2800

PROPERTY NUMBERS Total: 2

Property Type	Number
Application Number:	14284619
PCT Number:	US2014039113

CORRESPONDENCE DATA

Fax Number: (650)952-9881

Correspondence will be sent to the e-mail address first; if that is unsuccessful, it will be sent using a fax number, if provided; if that is unsuccessful, it will be sent via US Mail.

Phone: (650) 467-4255
Email: docketing-d@gene.com, ely@gene.com
Correspondent Name: ALEX ANDRUS
Address Line 1: 1 DNA WAY
Address Line 4: SOUTH SAN FRANCISCO, CALIFORNIA 94080

ATTORNEY DOCKET NUMBER:	P5537R1-US/WO
NAME OF SUBMITTER:	ALEX ANDRUS
SIGNATURE:	/ALEX ANDRUS/
DATE SIGNED:	02/27/2015

Total Attachments: 4
source=P5537R1_Assignment_Symphogen_Inventors#page1.tif
source=P5537R1_Assignment_Symphogen_Inventors#page2.tif
source=P5537R1_Assignment_Symphogen_Inventors#page3.tif

Docket No. **P5537R1**

ASSIGNMENT

WHEREAS, Klaus Koefoed, Magnus Strandh, and Peter S. Andersen (each an "ASSIGNOR"), have invented a new and useful invention in

ANTI-WALL TEICHOIC ANTIBODIES AND CONJUGATES

for which United States non-provisional application Serial No. 14/284,619 [1] (Docket No. **P5537R1-US**) has been filed on May 22, 2014 [1]; and

for which International patent application No. PCT/US014/039113 [1] (Docket No. **P5537R1-WO**) has been filed on May 22, 2014 [1];

which claim priority to United States provisional patent application Serial No. **61/829,466** (Docket No. **PR5537**) filed on **May 31, 2013**; and

WHEREAS, SYMPHOGEN A/S, having a place of business at Elektrovej Building 375, DK-2800 Lyngby, Denmark is desirous of acquiring an interest in and to said invention, and in and to the Letters Patents to be obtained therefor;

NOW, THEREFORE, be it known by all whom it may concern;

That for good and valuable consideration the receipt of which is hereby acknowledged, the undersigned ASSIGNOR(S) have and do hereby sell, assign, transfer and set over unto said SYMPHOGEN A/S, its successors and assigns, the undersigned ASSIGNOR(S)' full and exclusive right, title and interest, including all rights under the Paris Convention for the Protection of Industrial Property, in and to said invention, and in and to any and all applications filed and Letters Patents granted and issued therefor, or any continuation, division, renewal, or substitute thereof, and as to Letters Patents any reissue or re-examination thereof, not only for, to, and in the United States of America, its territories and possessions, but for, to and in all other countries; and it has been and is hereby authorized and requested that the appropriate government agencies issue said Letters Patents to said SYMPHOGEN A/S, in accordance with this Assignment.

The undersigned ASSIGNOR(S) covenant and agree to cooperate with SYMPHOGEN A/S, to enable said SYMPHOGEN A/S to enjoy to the fullest extent the undersigned ASSIGNOR(S) right, title and interest herein conveyed in the United States and foreign countries. Such cooperation by the undersigned ASSIGNOR(S) includes prompt production of pertinent facts and documents, giving of testimony, execution of petitions, oaths, specifications, declarations or other papers, and other assistance, all to the extent deemed necessary or desirable by said SYMPHOGEN A/S, (a) for perfecting the right, title and interest herein conveyed; (b) for prosecuting any of said applications; (c) for filing and prosecuting applications for reissuance of any of said patents; (d) for interference or other priority proceedings involving said invention; and (e) for legal proceedings involving said invention and any applications therefor and any patents granted thereon, including without limitation opposition proceedings, cancellation proceedings, priority contests, public use proceedings, infringement actions and court actions; provided, however, that the expense incurred by the undersigned ASSIGNOR(S) in providing such cooperation shall be paid for by said SYMPHOGEN A/S.

[1] Assignor and Assignee hereby authorize Genentech, Inc., and their representatives and assigns to insert the application number and filing date information when they become known.

The terms and covenants of this assignment shall inure to the benefit of said SYMPHOGEN A/S, its successors, assigns and other legal representatives, and shall be binding upon the undersigned ASSIGNOR(S), their respective heirs, legal representatives and assigns.

The undersigned ASSIGNOR(S) hereby warrant and represent that they have not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

IN WITNESS WHEREOF I/we undersign as follows;

Klaus Koefoed — May 20, 2014

Klaus Koefoed
Mailing address:
Elektrovej Building 375
DK-2800 Lyngby
Citizenship: DK

Date

Magnus Strandh — May 20, 2014

Magnus Strandh
Mailing address:
Elektrovej Building 375
DK-2800 Lyngby
Citizenship: SE

Date

Peter S. Andersen
Mailing address:
Elektrovej Building 375
DK-2800 Lyngby
Citizenship: DK

Date

Docket No. **P5537R1**

ASSIGNMENT

WHEREAS, Klaus Koefoed, Magnus Strandh, and Peter S. Andersen (each an "ASSIGNOR"), have invented a new and useful invention in

ANTI-WALL TEICHOIC ANTIBODIES AND CONJUGATES

for which United States non-provisional application Serial No. 14/284,619 [1] (Docket No. **P5537R1-US**) has been filed on May 22, 2014 [1]; and

for which International patent application No. PCT/US014/039113 [1] (Docket No. **P5537R1-WO**) has been filed on May 22, 2014 [1];

which claim priority to United States provisional patent application Serial No. **61/829,466** (Docket No. **PR5537**) filed on **May 31, 2013**; and

WHEREAS, SYMPHOGEN A/S, having a place of business at Elektrovej Building 375, DK-2800 Lyngby, Denmark is desirous of acquiring an interest in and to said invention, and in and to the Letters Patents to be obtained therefor;

NOW, THEREFORE, be it known by all whom it may concern;

That for good and valuable consideration the receipt of which is hereby acknowledged, the undersigned ASSIGNOR(S) have and do hereby sell, assign, transfer and set over unto said SYMPHOGEN A/S, its successors and assigns, the undersigned ASSIGNOR(S)' full and exclusive right, title and interest, including all rights under the Paris Convention for the Protection of Industrial Property, in and to said invention, and in and to any and all applications filed and Letters Patents granted and issued therefor, or any continuation, division, renewal, or substitute thereof, and as to Letters Patents any reissue or re-examination thereof, not only for, to, and in the United States of America, its territories and possessions, but for, to and in all other countries; and it has been and is hereby authorized and requested that the appropriate government agencies issue said Letters Patents to said SYMPHOGEN A/S, in accordance with this Assignment.

The undersigned ASSIGNOR(S) covenant and agree to cooperate with SYMPHOGEN A/S, to enable said SYMPHOGEN A/S to enjoy to the fullest extent the undersigned ASSIGNOR(S) right, title and interest herein conveyed in the United States and foreign countries. Such cooperation by the undersigned ASSIGNOR(S) includes prompt production of pertinent facts and documents, giving of testimony, execution of petitions, oaths, specifications, declarations or other papers, and other assistance, all to the extent deemed necessary or desirable by said SYMPHOGEN A/S, (a) for perfecting the right, title and interest herein conveyed; (b) for prosecuting any of said applications; (c) for filing and prosecuting applications for reissuance of any of said patents; (d) for interference or other priority proceedings involving said invention; and (e) for legal proceedings involving said invention and any applications therefor and any patents granted thereon, including without limitation opposition proceedings, cancellation proceedings, priority contests, public use proceedings, infringement actions and court actions; provided, however, that the expense incurred by the undersigned ASSIGNOR(S) in providing such cooperation shall be paid for by said SYMPHOGEN A/S.

[1] Assignor and Assignee hereby authorize Genentech, Inc., and their representatives and assigns to insert the application number and filing date information when they become known.

The terms and covenants of this assignment shall inure to the benefit of said SYMPHOGEN A/S, its successors, assigns and other legal representatives, and shall be binding upon the undersigned ASSIGNOR(S), their respective heirs, legal representatives and assigns.

The undersigned ASSIGNOR(S) hereby warrant and represent that they have not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

IN WITNESS WHEREOF I/we undersign as follows;

Klaus Koefoed Date
Mailing address:
Elektrovej Building 375
DK-2800 Lyngby
Citizenship: DK

Magnus Strandh Date
Mailing address:
Elektrovej Building 375
DK-2800 Lyngby
Citizenship: SE

19-MAY-2014

Peter S. Andersen Date
Mailing address:
Elektrovej Building 375
DK-2800 Lyngby
Citizenship: DK

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
UNDER SECRETARY OF COMMERCE FOR INTELLECTUAL PROPERTY AND
DIRECTOR OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

MARCH 2, 2015

PTAS

ALEX ANDRUS
1 DNA WAY
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080

503199155

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
NOTICE OF RECORDATION OF ASSIGNMENT DOCUMENT

THE ENCLOSED DOCUMENT HAS BEEN RECORDED BY THE ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH OF THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE. A COMPLETE COPY IS AVAILABLE AT THE ASSIGNMENT SEARCH ROOM ON THE REEL AND FRAME NUMBER REFERENCED BELOW.

PLEASE REVIEW ALL INFORMATION CONTAINED ON THIS NOTICE. THE INFORMATION CONTAINED ON THIS RECORDATION NOTICE REFLECTS THE DATA PRESENT IN THE PATENT AND TRADEMARK ASSIGNMENT SYSTEM. IF YOU SHOULD FIND ANY ERRORS OR HAVE QUESTIONS CONCERNING THIS NOTICE, YOU MAY CONTACT THE ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH AT 571-272-3350. PLEASE SEND REQUEST FOR CORRECTION TO: U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE, MAIL STOP: ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH, P.O. BOX 1450, ALEXANDRIA, VA 22313.

RECORDATION DATE: 02/27/2015

REEL/FRAME: 035057/0196
NUMBER OF PAGES: 3

BRIEF: ASSIGNMENT OF ASSIGNORS INTEREST (SEE DOCUMENT FOR DETAILS).

DOCKET NUMBER: P5537R1-US/WO

ASSIGNOR:
SYMPHOGEN A/S

DOC DATE: 05/21/2014

ASSIGNEE:
GENENTECH, INC.
1 DNA WAY
SOUTH SAN FRANCISCO, CALIFORNIA
94080

APPLICATION NUMBER: 14284619
PATENT NUMBER:
TITLE: ANTI-WALL TEICHOIC ANTIBODIES AND CONJUGATES

FILING DATE: 05/22/2014
ISSUE DATE:

APPLICATION NUMBER:
PATENT NUMBER:
PCT NUMBER: US2014039113
TITLE: ANTI-WALL TEICHOIC ANTIBODIES AND CONJUGATES

FILING DATE: 05/22/2014
ISSUE DATE:

ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH
PUBLIC RECORDS DIVISION

PATENT ASSIGNMENT COVER SHEET

Electronic Version v1.1
Stylesheet Version v1.2

EPAS ID: PAT3245772

SUBMISSION TYPE:	NEW ASSIGNMENT
NATURE OF CONVEYANCE:	ASSIGNMENT

CONVEYING PARTY DATA

Name	Execution Date
SYMPHOGEN A/S	05/21/2014

RECEIVING PARTY DATA

Name:	GENENTECH, INC.
Street Address:	1 DNA WAY
City:	SOUTH SAN FRANCISCO
State/Country:	CALIFORNIA
Postal Code:	94080

PROPERTY NUMBERS Total: 2

Property Type	Number
Application Number:	14284619
PCT Number:	US2014039113

CORRESPONDENCE DATA

Fax Number: (650)952-9881

Correspondence will be sent to the e-mail address first; if that is unsuccessful, it will be sent using a fax number, if provided; if that is unsuccessful, it will be sent via US Mail.

Phone: (650) 467-4255
Email: docketing-d@gene.com, ely@gene.com
Correspondent Name: ALEX ANDRUS
Address Line 1: 1 DNA WAY
Address Line 4: SOUTH SAN FRANCISCO, CALIFORNIA 94080

ATTORNEY DOCKET NUMBER:	P5537R1-US/WO
NAME OF SUBMITTER:	ALEX ANDRUS
SIGNATURE:	/ALEX ANDRUS/
DATE SIGNED:	02/27/2015

Total Attachments: 2
source=P5537R1_Assignment_Symphogen_to_Gene#page1.tif
source=P5537R1_Assignment_Symphogen_to_Gene#page2.tif

ASSIGNMENT

WHEREAS, SYMPHOGEN A/S, a DK company whose principal place of business is Elektrovej Building 375, DK-2800 Lyngby, Denmark (hereinafter "ASSIGNOR"), has full right, title, and interest in and to a new and useful invention in

ANTI-WALL TEICHOIC ANTIBODIES AND CONJUGATES

for which United States non-provisional application Serial No. 14/284,619[1] (Docket No. **P5537R1-US**) has been filed on May 22,2014[1]; and

for which International patent application No. PCT/US2014/039113[1] (Docket No. **P5537R1-WO**) has been filed on May 22, 2014[1];

which claim priority to United States provisional patent application Serial No. **61/829,466** (Docket No. **PR5537**) filed on **May 31, 2013**; and

WHEREAS, GENENTECH, INC., a corporation organized and existing under and by virtue of the laws of the State of Delaware, having a place of business at 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, is desirous of acquiring an interest in and to said invention, and in and to the Letters Patents to be obtained therefor;

NOW, THEREFORE, be it known by all whom it may concern;

That for good and valuable consideration the receipt of which is hereby acknowledged, the undersigned ASSIGNOR(S) have and do hereby sell, assign, transfer and set over unto the said GENENTECH, INC., its successors and assigns, the full and exclusive right, title and interest, including all rights under the Paris Convention for the Protection of Industrial Property, in and to said invention, and in and to any and all applications filed and Letters Patents granted and issued therefor, or any continuation, division, renewal, or substitute thereof, and as to Letters Patents any reissue or re-examination thereof, not only for, to, and in the United States of America, its territories and possessions, but for, to and in all other countries; and it has been and is hereby authorized and requested that the appropriate government agencies issue said Letters Patents to said GENENTECH, INC., in accordance with this Assignment.

The undersigned ASSIGNOR(S) covenant and agree to cooperate with GENENTECH, INC., to enable said GENENTECH, INC. to enjoy to the fullest extent the right, title and interest herein conveyed in the United States and foreign countries. Such cooperation by the undersigned ASSIGNOR(S) includes prompt production of pertinent facts and documents, giving of testimony, execution of petitions, oaths, specifications, declarations or other papers, and other assistance, all to the extent deemed necessary or desirable by said GENENTECH, INC., (a) for perfecting the right, title and interest herein conveyed; (b) for prosecuting any of said applications; (c) for filing and prosecuting applications for reissuance of any of said patents; (d) for interference or other priority proceedings involving said invention; and (e) for legal proceedings involving said invention and any applications therefor and any patents granted thereon, including without limitation opposition proceedings, cancellation proceedings, priority contests, public use proceedings, infringement actions and court actions; provided, however, that the expense incurred by the undersigned ASSIGNOR(S) in providing such cooperation shall be paid for by said GENENTECH, INC.

---

[1] Assignor and Assignee hereby authorize Genentech, Inc., and their representatives and assigns to insert the application number and filing date information when they become known.

The terms and covenants of this assignment shall inure to the benefit of said GENENTECH, INC., its successors, assigns and other legal representatives, and shall be binding upon the undersigned ASSIGNOR(S), their respective heirs, legal representatives and assigns.

The undersigned ASSIGNOR(S) hereby warrant and represent that they have not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

IN WITNESS WHEREOF I/we undersign as follows;

Lyngby, Denmark

Date: 5-21-14

For and on behalf of
SYMPHOGEN A/S

By: Kaye M. Mills, CBO

Brigard & Castro

BOGOTA - COLOMBIA

PODER

Yo (nosotros)

domiciliado(s) en

Nombro(amos) a: **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO** y/o **BEATRIZ JARAMILLO** y/o **CARLOS H. PALACIO EASTMAN** y/o **HECTOR GOMEZ MEJIA**, de Bogotá, Colombia, apoderados verdaderos y legales con poder especial, amplio y suficiente, para recabar de las oficinas y autoridades colombianas administrativas, judiciales y de policía, en cualquier instancia o recurso, la obtención de patentes de invención, registros de marcas, diseños industriales, modelos de utilidad, depósitos de nombres comerciales y enseñas, registros de derechos de autor y contratos sobre los mismos, obtención de certificados de obtentor de variedades vegetales, así como sus prórrogas, renovaciones, anotaciones de traspaso, cambios de nombre y/o domicilio; elaborar, tramitar y registrar contratos de licencia y licencias de cualesquiera clases; intervenir como demandante o como demandado en cualquier instancia y recurso ante cualquier juez, corporación, funcionario público o autoridad en acciones judiciales, administrativas y de policía tales como: oposiciones al registro de marcas; acciones de caducidad, cancelación y nulidad; acciones reivindicatorias, acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias; acciones de competencia desleal; demandas penales; acciones de indemnización de perjuicios, reclamos y observaciones a solicitudes de patentes, diseños industriales, modelos de utilidad, en el ejercicio de medidas cautelares y en otras acciones o medidas similares.

A este efecto, lo(s) faculto(amos) para elevar solicitudes, formular descripciones, enmiendas, protestas, declaraciones, oposiciones, cancelaciones, nulidades, apelaciones y reclamos; pagar impuestos, cuotas y gravámenes prescritos por la ley; renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión; recibir toda clase de documentos y valores, dando el descargo respectivo, y, en general, para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al efecto indicado y tomar todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de mis (nuestros intereses), con todas las demás facultades legales necesarias.

Este poder comprende la facultad de ratificar o confirmar en mi (nuestro) nombre lo actuado así como la facultad de desistir, transigir, comprometer, y la de sustituirlo en todo o en parte y revocar sustituciones. Asimismo nombro(amos) a: **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO** y/o **BEATRIZ JARAMILLO** y/o **CARLOS H. PALACIO EASTMAN** y/o **HECTOR GOMEZ MEJIA**,, domiciliado(s) en la Carrera 7 No. 16-56 Piso 9, mis (nuestros) apoderados en Colombia, con facultades para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales.

Otorgado y firmado en

hoy de de 200_

Firma

Nombre
Cargo

POWER OF ATTORNEY

I (We) **Genentech, Inc.**
1 DNA Way
domiciled in **South San Francisco, California 94080-4990**
USA

Hereby appoints **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO** and/or **BEATRIZ JARAMILLO** and/or **CARLOS H. PALACIO EASTMAN** and/or **HECTOR GOMEZ MEJIA**, of Bogotá, Colombia, my (our) true and lawful attorneys with special, ample and sufficient power to obtain from the Colombian administrative, judicial and police offices and authorities, in any instance, privileges of patents of invention, registration of trademarks, industrial designs and utility models; registration of commercial names and emblems, registration of copyright and contracts related thereto, certificates of obtainers of vegetables varieties, as well as extensions, renewals and recordal of assignments and changes of name and domicile related to the above; to prepare, prosecute and register licenses of any kind; to act as plaintiff or defendant in any instance or recourse, and before any judge, corporation, public official or authority in judicial, administrative and police actions, such as: oppositions to the registration of trademarks; caducity, cancellation and nullity actions; claim actions derived from the obtaining or explotation of licenses, action of unfair competition; criminal proceedings, actions for payment of damages: claims or observations on patent applications, models, industrial designs and utility models; in the exercise of preventive measures and in other actions or similar proceedings.

To that effect they hereby empowered to file applications, formulate descriptions, amendments, protests, declarations, oppositions, cancellations, nullities, appeals and claims; to pay taxes, quotas and assessments prescribed by law, renounce or waive the rights granted or in the process of granting; to receive all kinds of documents and valuables, giving the respective release of receipt, and, in general, to take before said authorities the necessary steps to such effect, and any measures that they may deem pertinent to the safeguard of my (our) interest(s) with all the other necessary legal powers.

This power includes the faculty to ratify or confirm desist, settle and compromise on my (our) behalf, and to substitute this power in whole or in part and to revoke substitutions. At the same time I (We) hereby appoints **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO** and/or **BEATRIZ JARAMILLO** and/or **CARLOS H. PALACIO EASTMAN** and/or **HECTOR GOMEZ MEJIA**, domiciled in Carrera 7 No. 16-56, Piso 9, my (our) attorney(s) in fact, with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys.

Granted and signed in **South San Francisco, California USA**

this 6th day of December 2005

Signature

Name Timothy R. Schwartz, Ph.D.
Title Section Patent Counsel
Authorized Corporate Signatory
Genentech, Inc.

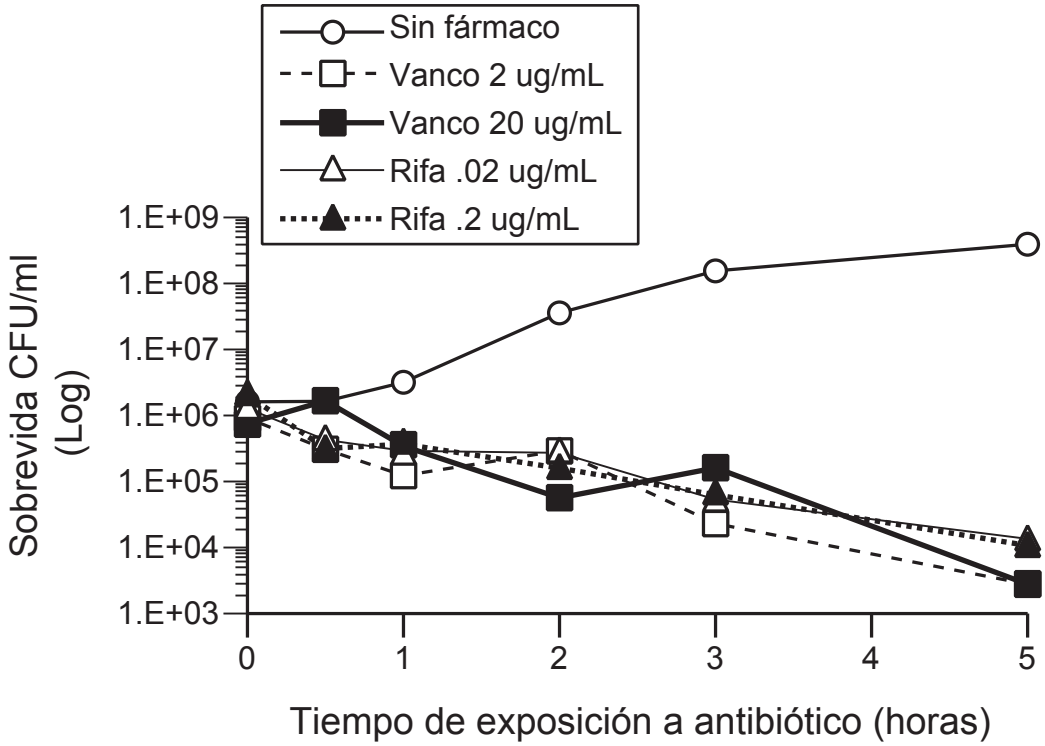

Sin fármaco
Vanco 2 ug/mL
Vanco 20 ug/mL
Rifa .02 ug/mL
Rifa .2 ug/mL
Sobrevida CFU/ml (Log)
1.E+09
1.E+08
1.E+07
1.E+06
1.E+05
1.E+04
1.E+03
0
1
2
3
4
5
Tiempo de exposición a antibiótico (horas)

FIG. 1

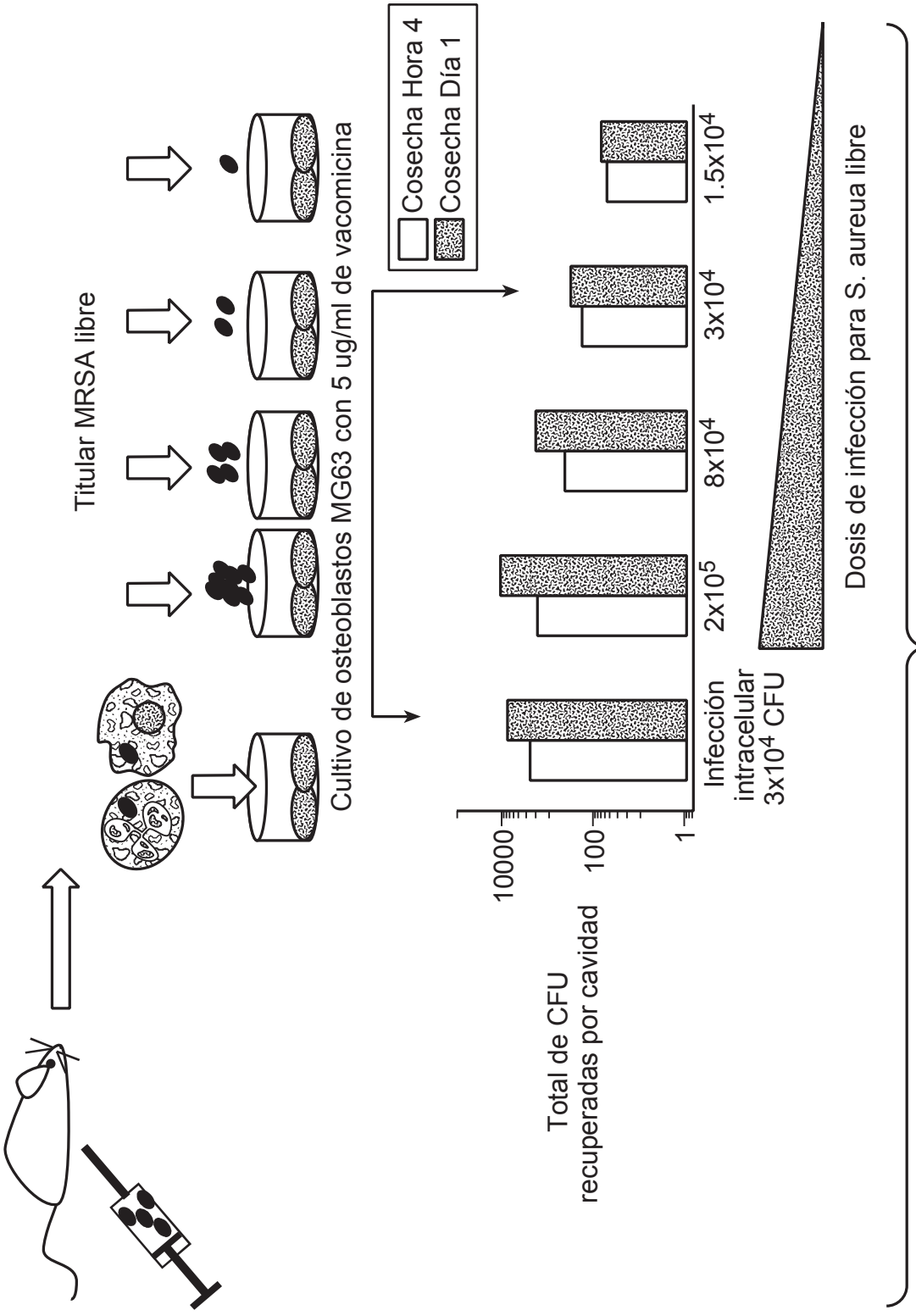
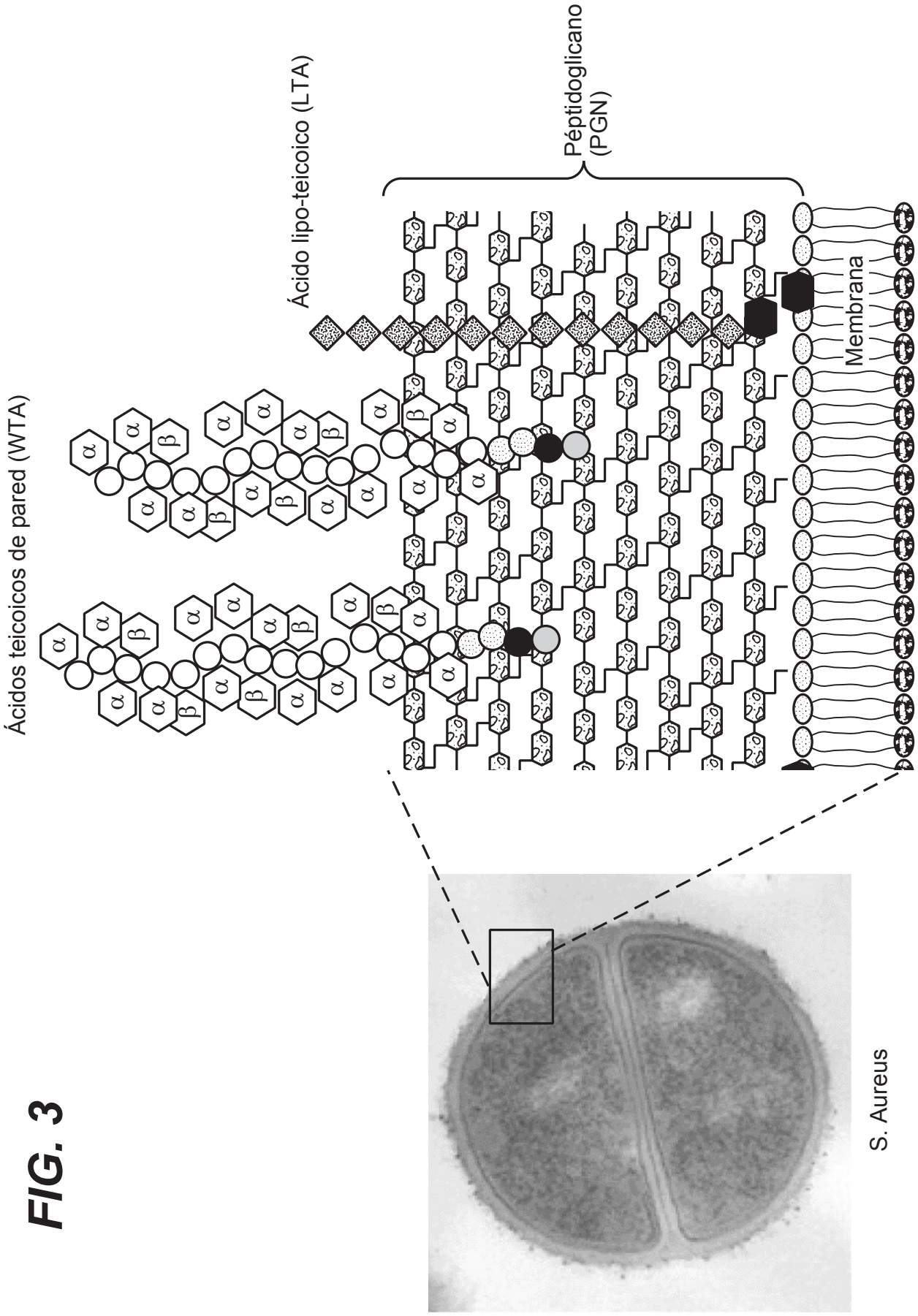

Titular MRSA libre
Cultivo de osteoblastos MG63 con 5 ug/ml de vacomicina
Cosecha Hora 4
Cosecha Día 1
Total de CFU recuperadas por cavidad
10000
100
1
Infección intracelular 3x10^4 CFU
2x10^5
8x10^4
3x10^4
1.5x10^4
Dosis de infección para S. aureua libre

FIG. 2

FIG. 3


Ácidos teicoicos de pared (WTA)
Ácido lipo-teicoico (LTA)
Péptidoglicano (PGN)
Membrana
S. Aureus

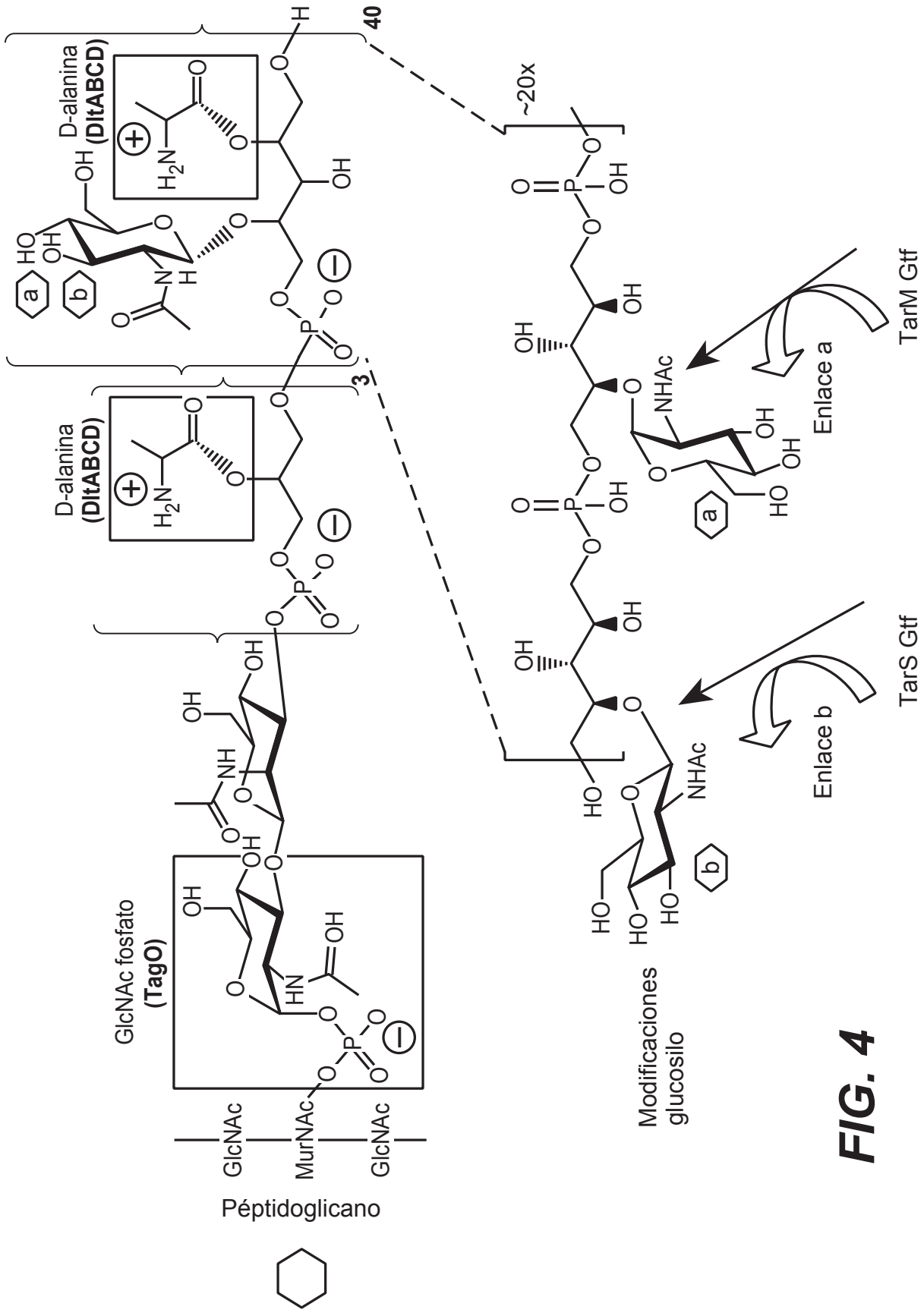

D-alanina
(DltABCD)
40
~20x
3
TarM Gtf
Enlace a
TarS Gtf
Enlace b
GlcNAc fosfato
(TagO)
Modificaciones
glucosilo
GlcNAc
MurNAc
GlcNAc
Péptidoglicano

FIG. 4

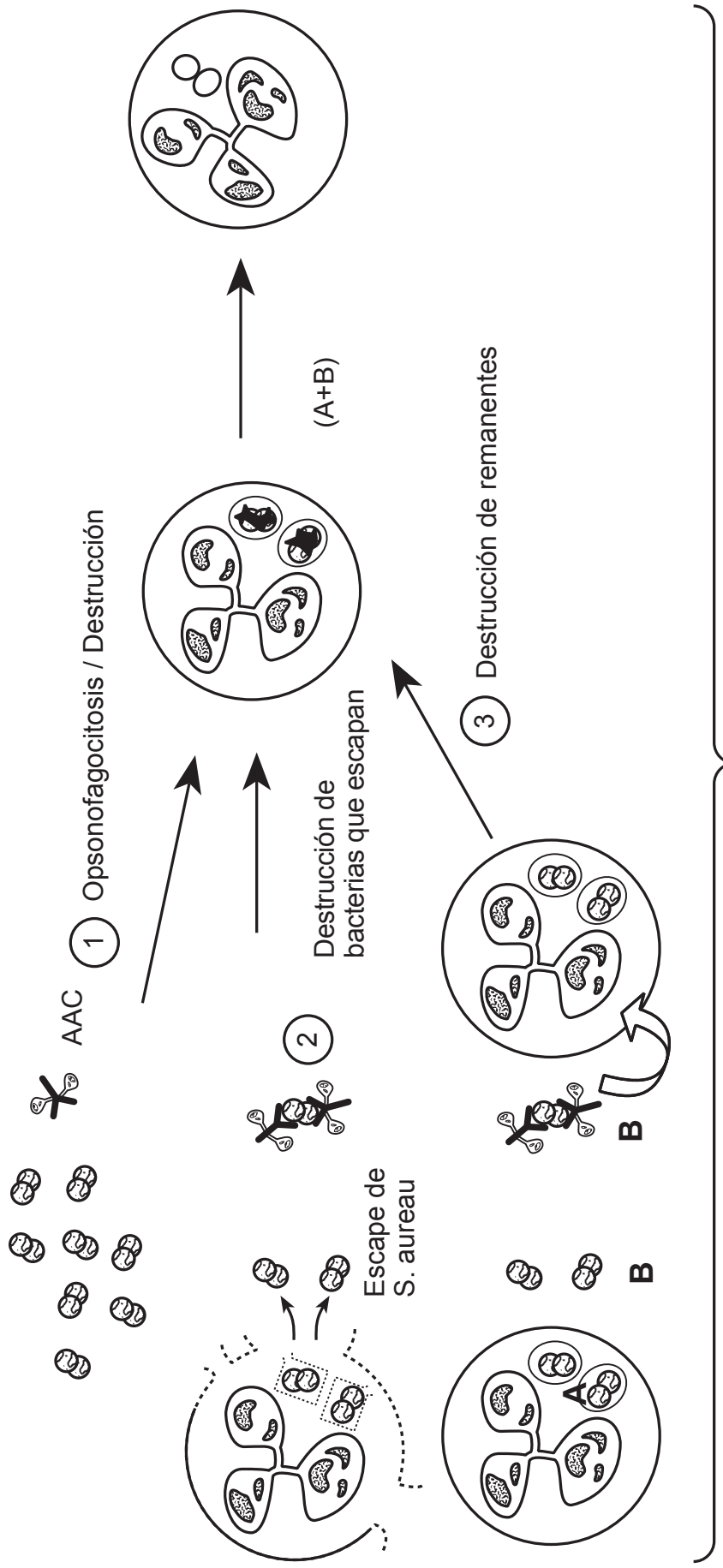

AAC
1 Opsonofagocitosis / Destrucción
2
Destrucción de bacterias que escapan
3 Destrucción de remanentes
(A+B)
Escape de S. aureau
A
B
B

FIG. 5

FIG. 6

FIG. 6A

FIG. 6B

FIG. 6A

Anticuerpo	Antígeno	GlcNAc	KD(nM)	Densidad antígeno. Sitios promedio en bacteria	Donante	Células fuente	Unión a recubrimiento(s) en Ag de selección primario (ELISA)
4497	WTA	beta	2.5	50	327	PB/PC	WTA; PGN; CW USA300 stat (iron depl:TSB in 96:4 ratio)
4462	WTA	beta	3.1	43	326	sMBC	WTA; PGN; CW USA300 stat (iron depl:TSB in 96:4 ratio)
4450	WTA	beta			326	sMBC	WTA; PGN; CW USA300 stat (iron depl:TSB in 96:4 ratio)
4487	WTA	beta			327	PB/PC	WTA; PGN; CW USA300 stat (iron depl:TSB in 96:4 ratio)
6078	WTA	beta			349	sMBC	PGN+WTA (1:1); CW USA300 stat (iron depl:TSB in 96:4 ratio)
6263	WTA	beta	1.4	22,000	350	PB/PC	PGN+WTA (1:1); CW USA300 stat (iron depl:TSB in 96:4 ratio)
6297	WTA	beta	1.1	21,000	350	PB/PC	PGN+WTA (1:1); CW USA300 stat (iron depl:TSB in 96:4 ratio)
6239	WTA	beta			350	PB/PC	PGN+WTA (1:1); CW USA300 stat (iron depl:TSB in 96:4 ratio)
6292	WTA	beta			350	PB/PC	PGN+WTA (1:1); CW USA300 stat (iron depl:TSB in 96:4 ratio)
6232	WTA	beta			350	PB/PC	PGN+WTA (1:1); CW USA300 stat (iron depl:TSB in 96:4 ratio)
6259	WTA	beta			350	PB/PC	CW USA300 stat (iron depl:TSB in 96:4 ratio)
6253	WTA	beta			350	PB/PC	PGN+WTA (1:1); CW USA300 stat (iron depl:TSB in 96:4 ratio)
6265	WTA	beta			350	PB/PC	PGN+WTA (1:1); CW USA300 stat (iron depl:TSB in 96:4 ratio)

4461(7574)	WTA	alpha			326	sMBC	CW USA300 stat (iron depl:TSB in 96:4 ratio)
4624(7578)	WTA	alpha	0.4	16	326	sMBC	CW USA300 stat (iron depl:TSB in 96:4 ratio)
4399	WTA	alpha			326	sMBC	CW USA300 stat (iron depl:TSB in 96:4 ratio)
6267	WTA	alpha			350	PB/PC	CW USA300 stat (iron depl:TSB in 96:4 ratio)
rF1	SDR-proteins	?	0.3	1600			
4516(7577)	SDR-proteins	?			327	PB/PC	WTA; PGN; CW USA300 stat (iron depl:TSB in 96:4 ratio)
6234	SDR-proteins	?			350	PB/PC	PGN+WTA (1:1); CW USA300 stat (iron depl:TSB in 96:4 ratio)
6060	SDR-proteins	?			349	sMBC	PGN+WTA (1:1); CW USA300 stat (iron depl:TSB in 96:4 ratio)
4569	LTA	?			327	PB/PC	CW Wood46 stat TSB
4479	PGN				327	PB/PC	WTA; PGN; CW USA300 stat (iron depl:TSB in 96:4 ratio)

FIG. 6B

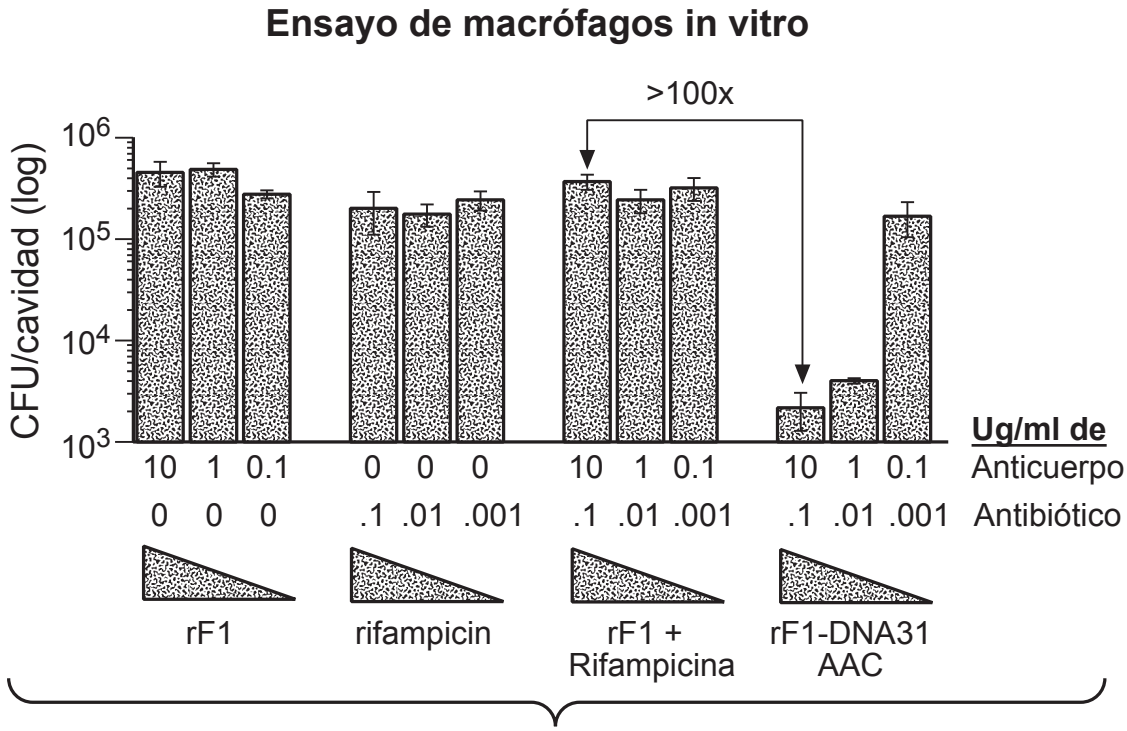

Ensayo de macrófagos in vitro
>100x
CFU/cavidad (log)
10^6
10^5
10^4
10^3
Ug/ml de
10 1 0.1 0 0 0 10 1 0.1 10 1 0.1 Anticuerpo
0 0 0 .1 .01 .001 .1 .01 .001 .1 .01 .001 Antibiótico
rF1
rifampicin
rF1 + Rifampicina
rF1-DNA31 AAC

FIG. 7A

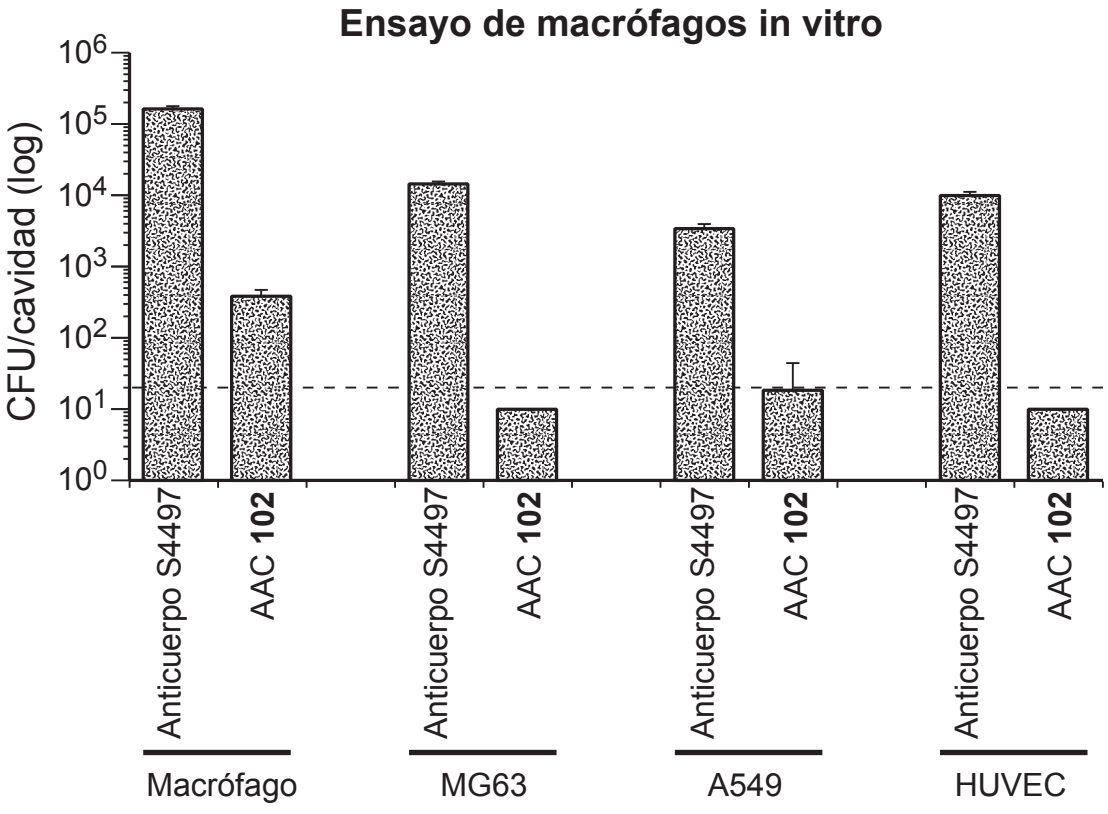
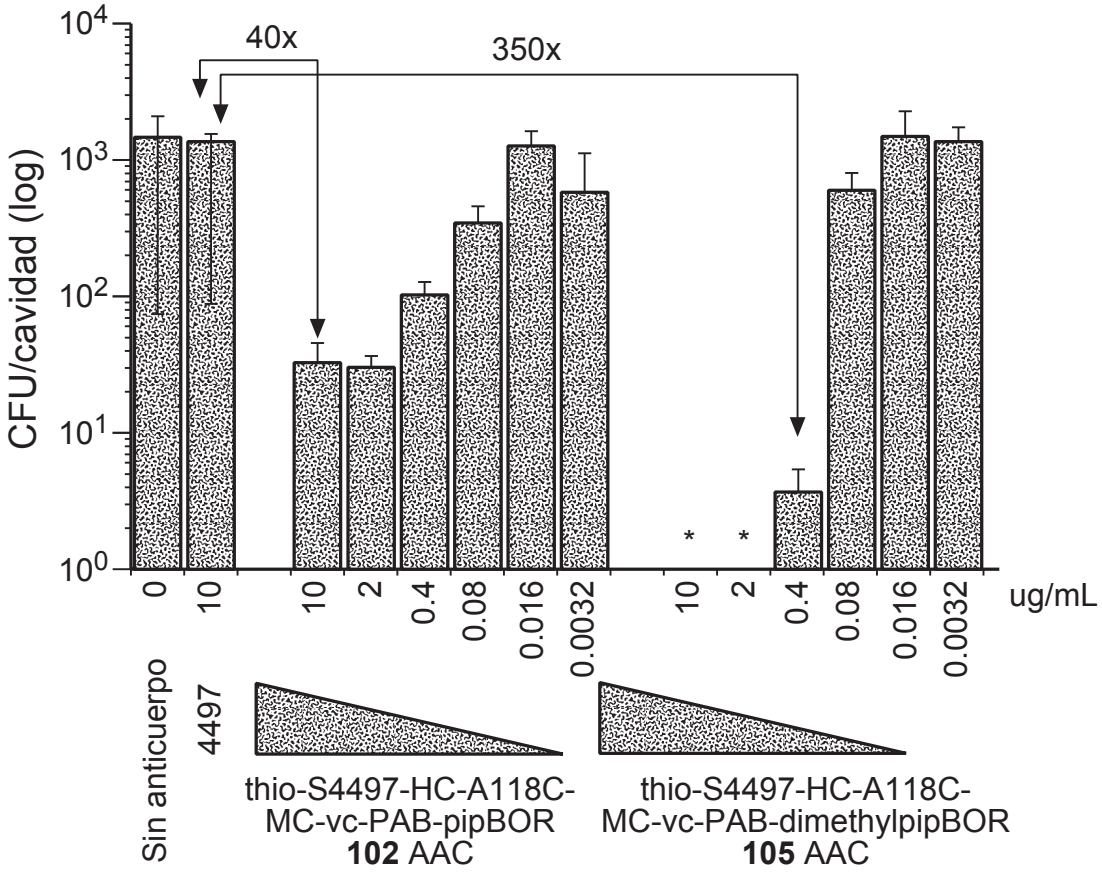

Ensayo de macrófagos in vitro
CFU/cavidad (log)
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
10^0
Anticuerpo S4497
AAC 102
Macrófago
MG63
A549
HUVEC

FIG. 7B



*Por debajo del límite de detección (3 CFU/cavidad)

FIG. 7C

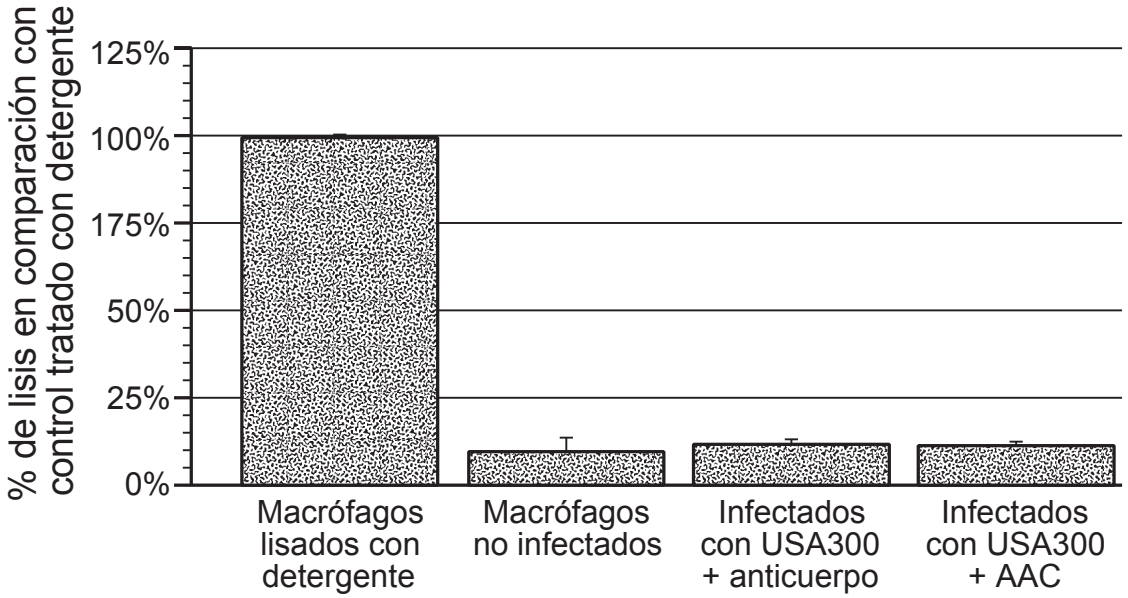

% de lisis en comparación con control tratado con detergente
125%
100%
175%
50%
25%
0%
Macrófagos lisados con detergente
Macrófagos no infectados
Infectados con USA300 + anticuerpo
Infectados con USA300 + AAC

FIG. 7D

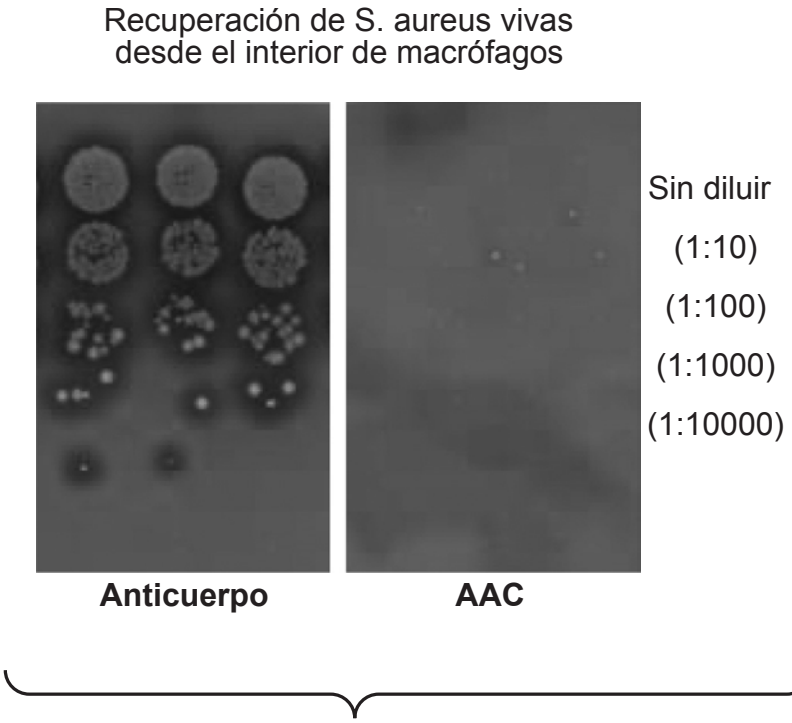

Recuperación de S. aureus vivas desde el interior de macrófagos
Sin diluir
(1:10)
(1:100)
(1:1000)
(1:10000)
Anticuerpo
AAC

FIG. 7E

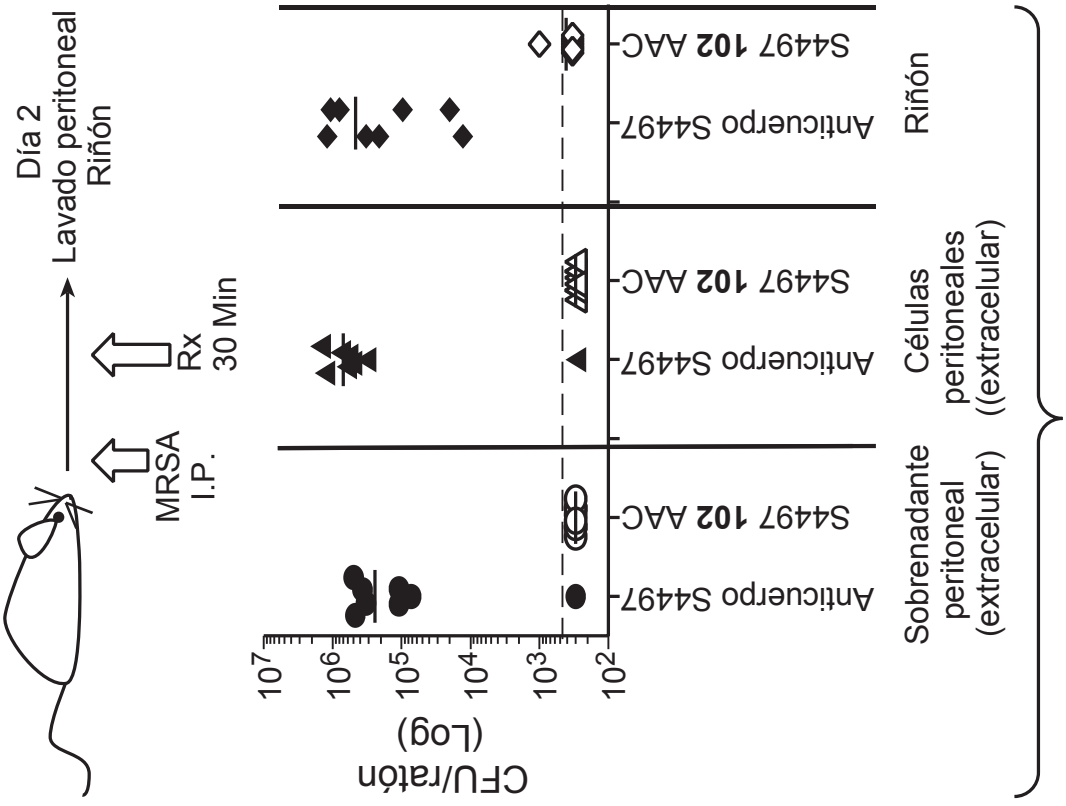

Día 2
Lavado peritoneal
Riñón
MRSA
I.P.
Rx
30 Min
CFU/ratón
(Log)
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
Sobrenadante peritoneal (extracelular)
Células peritoneales ((extracelular)
Riñón
Anticuerpo S449
S449 102 AAC
Anticuerpo S449
S449 102 AAC
Anticuerpo S449
S449 102 AAC

FIG. 8A

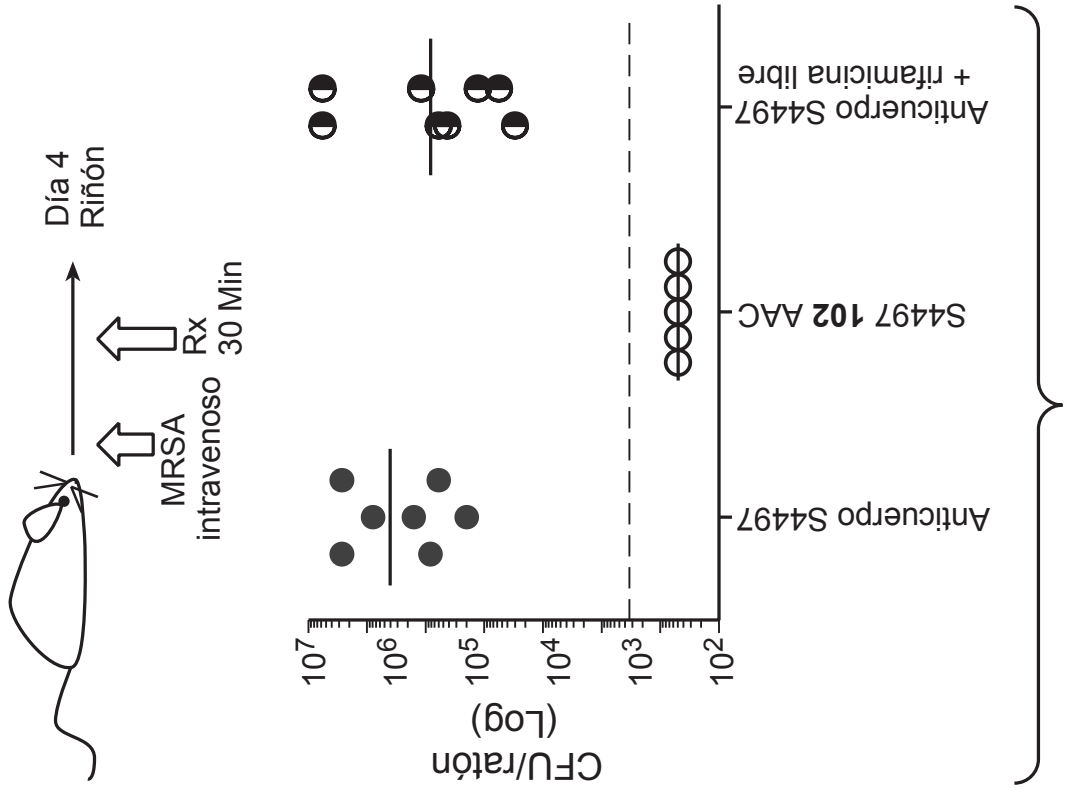

Día 4
Riñón
MRSA
intravenoso
Rx
30 Min
CFU/ratón
(Log)
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
Anticuerpo S449
S449 102 AAC
Anticuerpo S449
+ rifamicina libre

FIG. 8B

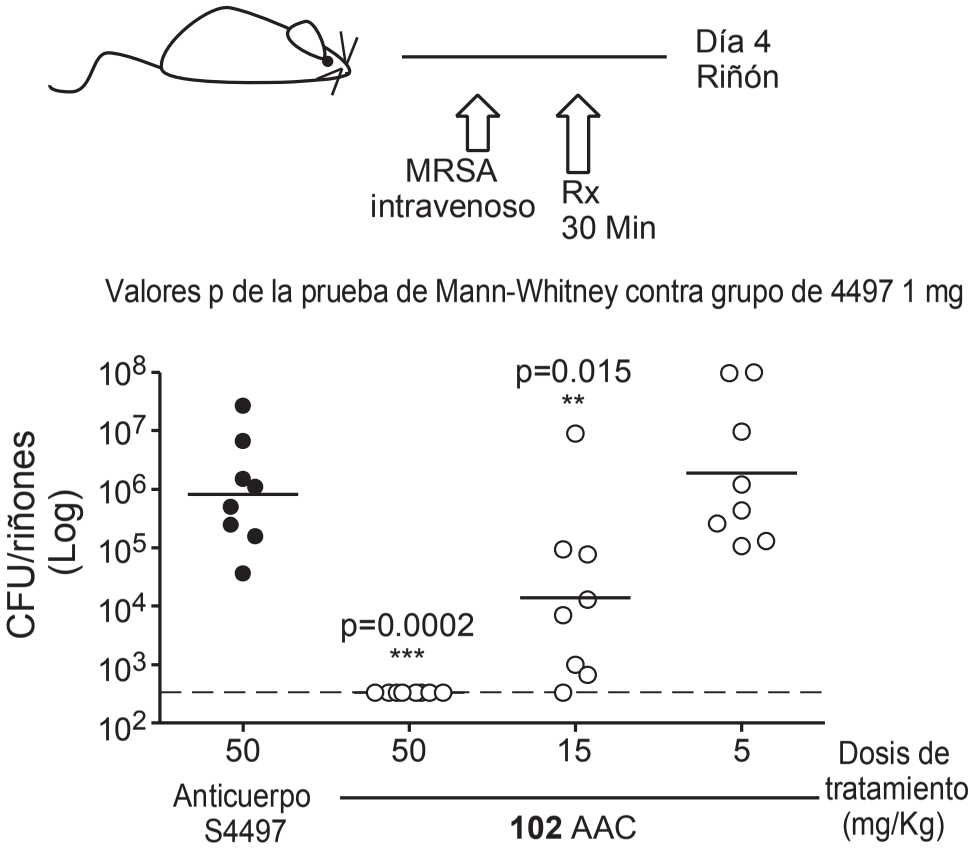

Día 4
Riñón
MRSA
intravenoso
Rx
30 Min
Valores p de la prueba de Mann-Whitney contra grupo de 4497 1 mg
CFU/riñones
(Log)
10^8
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
p=0.0002
***
p=0.015
**
50
50
15
5
Dosis de
tratamiento
(mg/Kg)
Anticuerpo
S4497
102 AAC

FIG. 9A

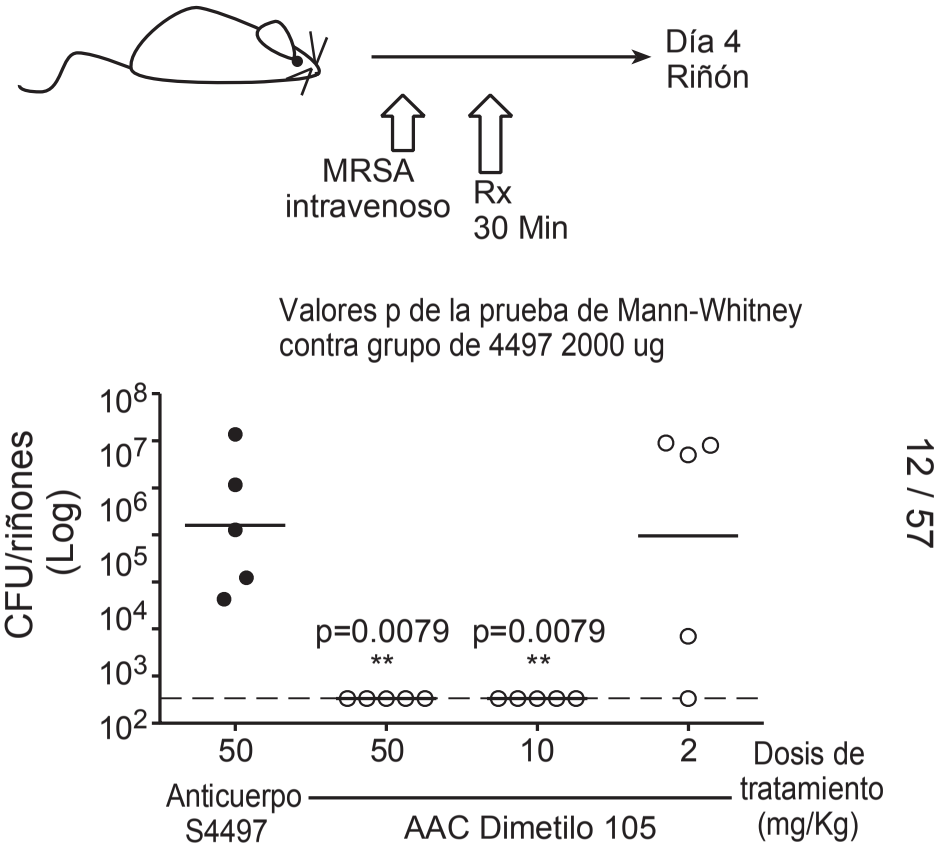

Día 4
Riñón
MRSA
intravenoso
Rx
30 Min
Valores p de la prueba de Mann-Whitney
contra grupo de 4497 2000 ug
CFU/riñones
(Log)
10^8
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
p=0.0079
**
p=0.0079
**
50
50
10
2
Dosis de
tratamiento
(mg/Kg)
Anticuerpo
S4497
AAC Dimetilo 105

FIG. 9B

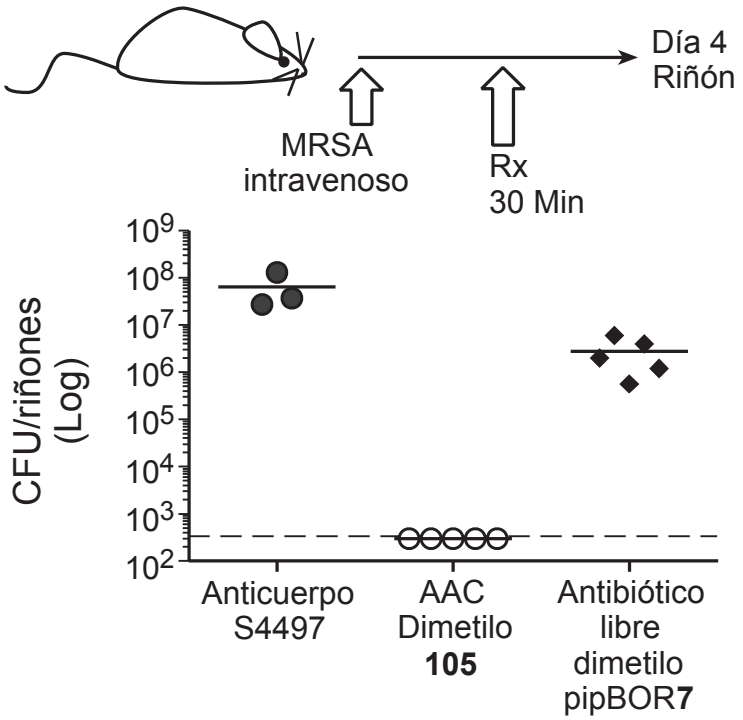


FIG. 9C

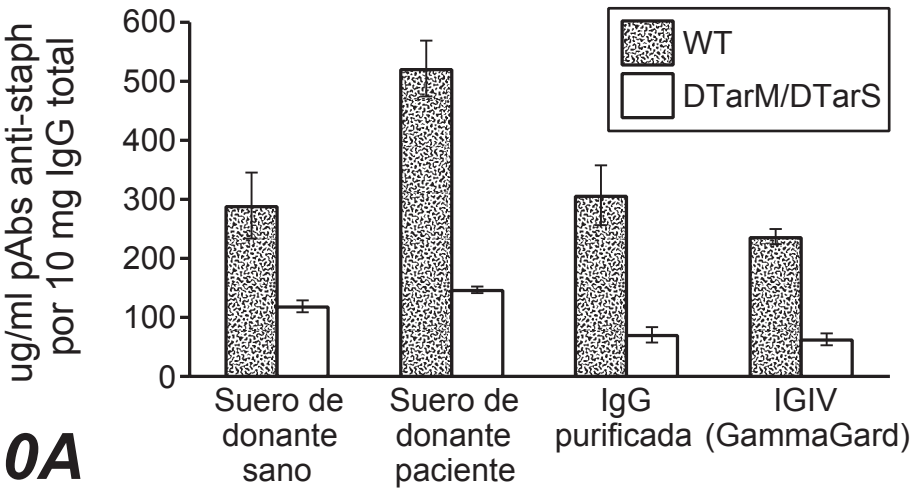


FIG. 10A

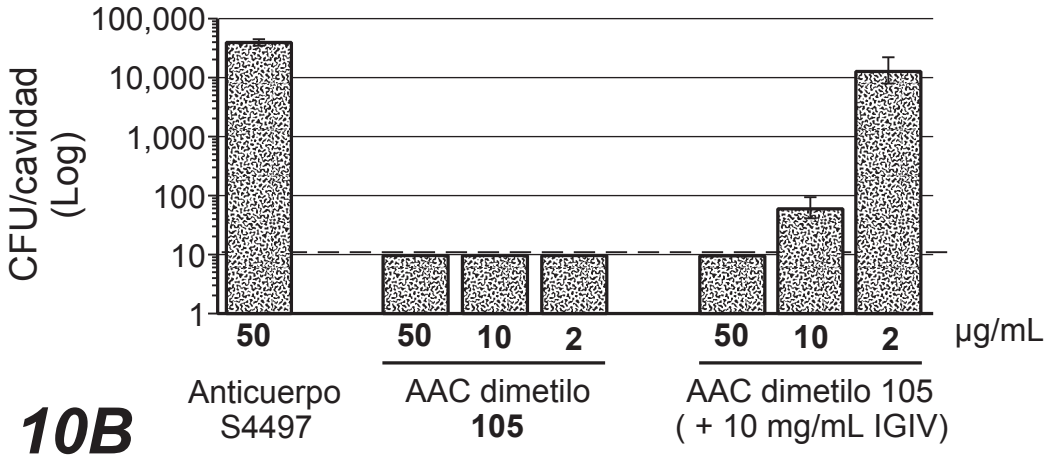


FIG. 10B

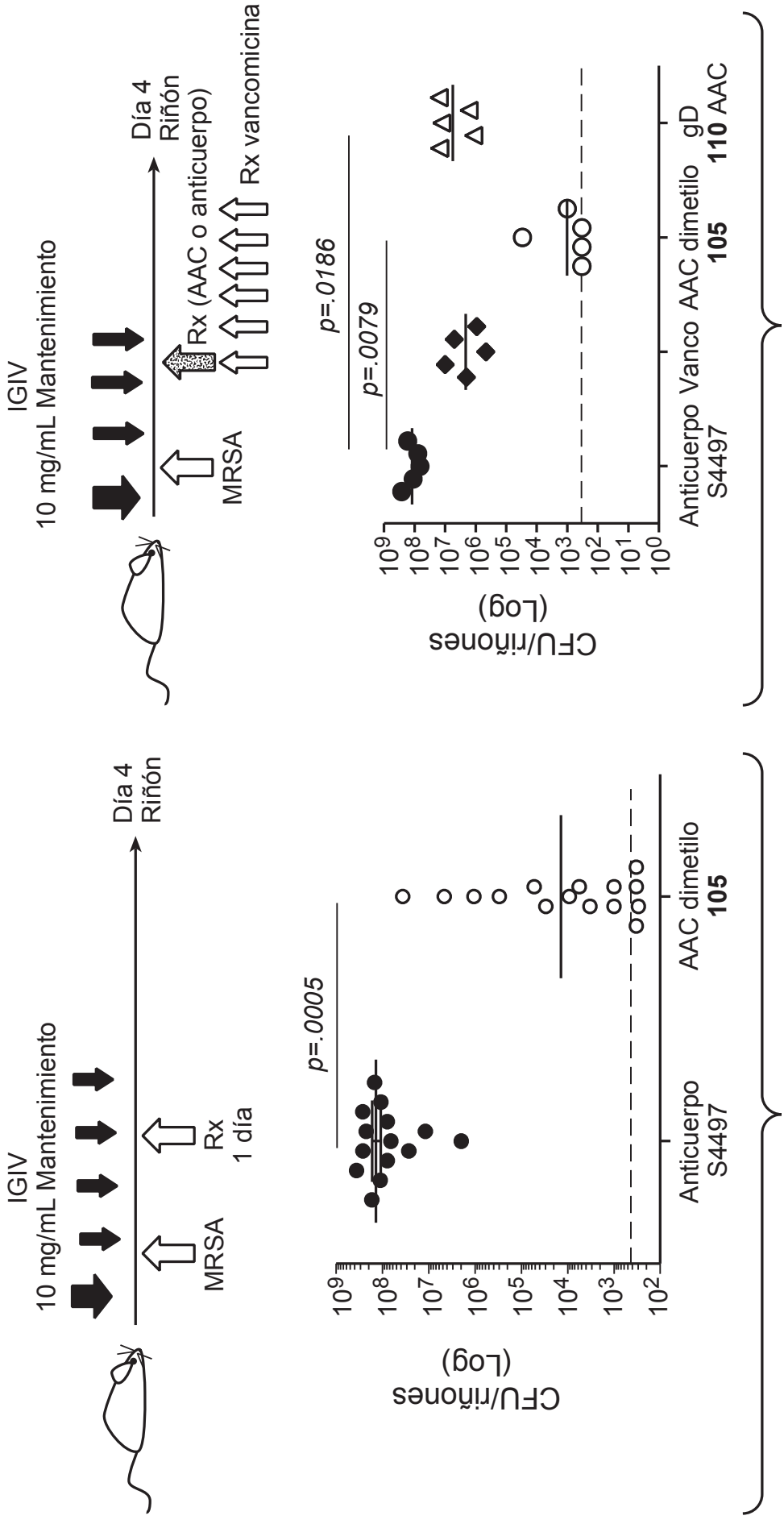


FIG. 10C

FIG. 11A

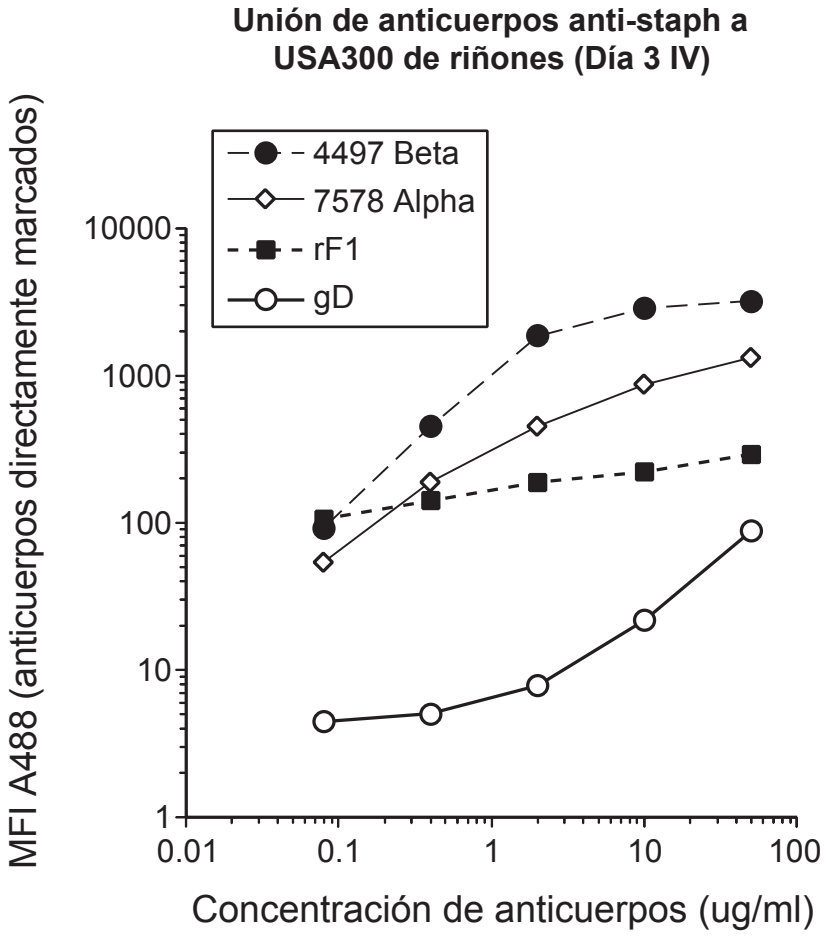

Unión de anticuerpos anti-staph a USA300 de riñones (Día 3 IV)
4497 Beta
7578 Alpha
rF1
gD
MFI A488 (anticuerpos directamente marcados)
10000
1000
100
10
1
0.01
0.1
1
10
100
Concentración de anticuerpos (ug/ml)

FIG. 11B

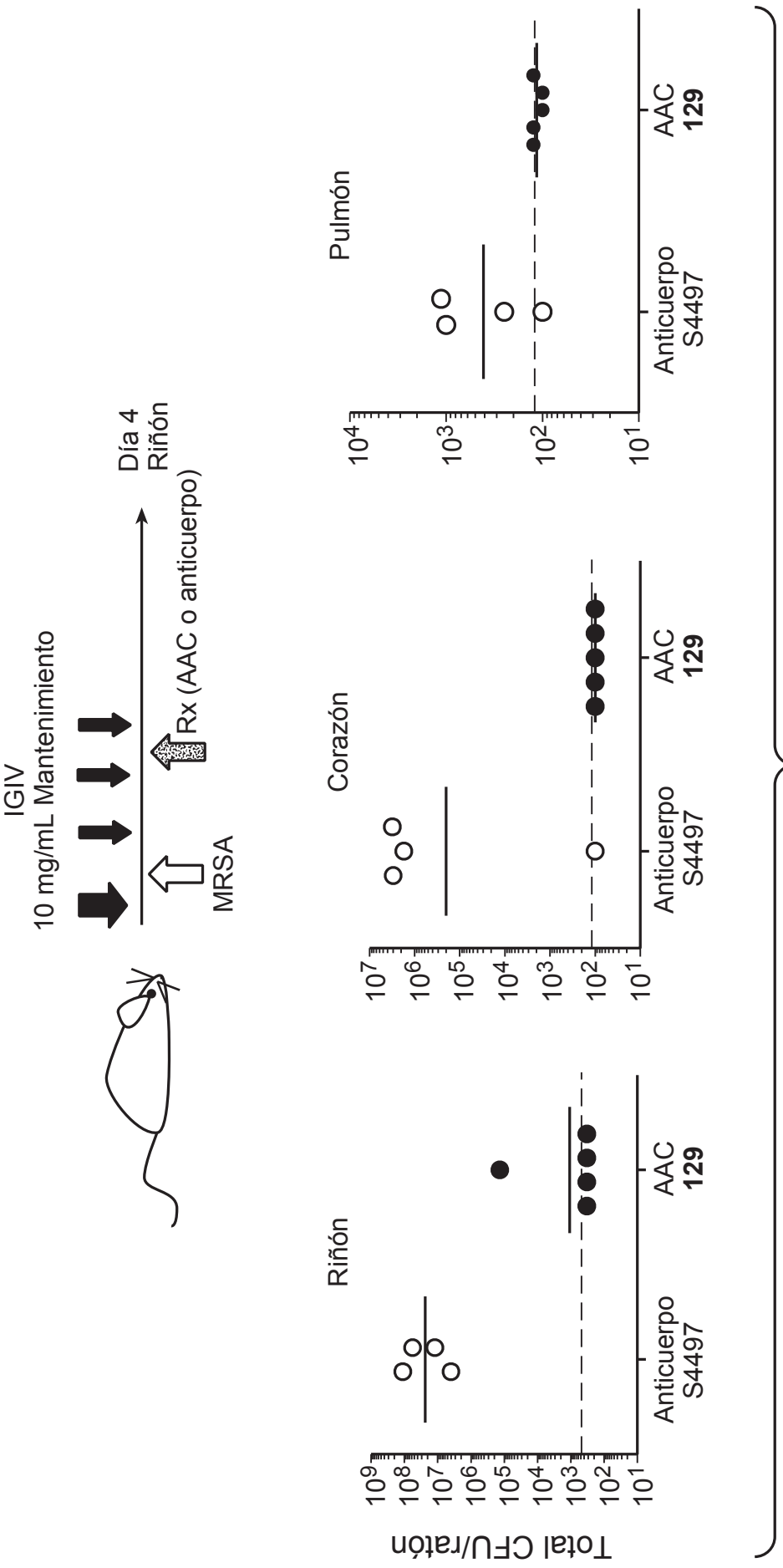

IGIV
10 mg/mL Mantenimiento
MRSA
Rx (AAC o anticuerpo)
Día 4
Riñón
Riñón
Corazón
Pulmón
Total CFU/ratón
Anticuerpo S4497
AAC 129

FIG. 11C

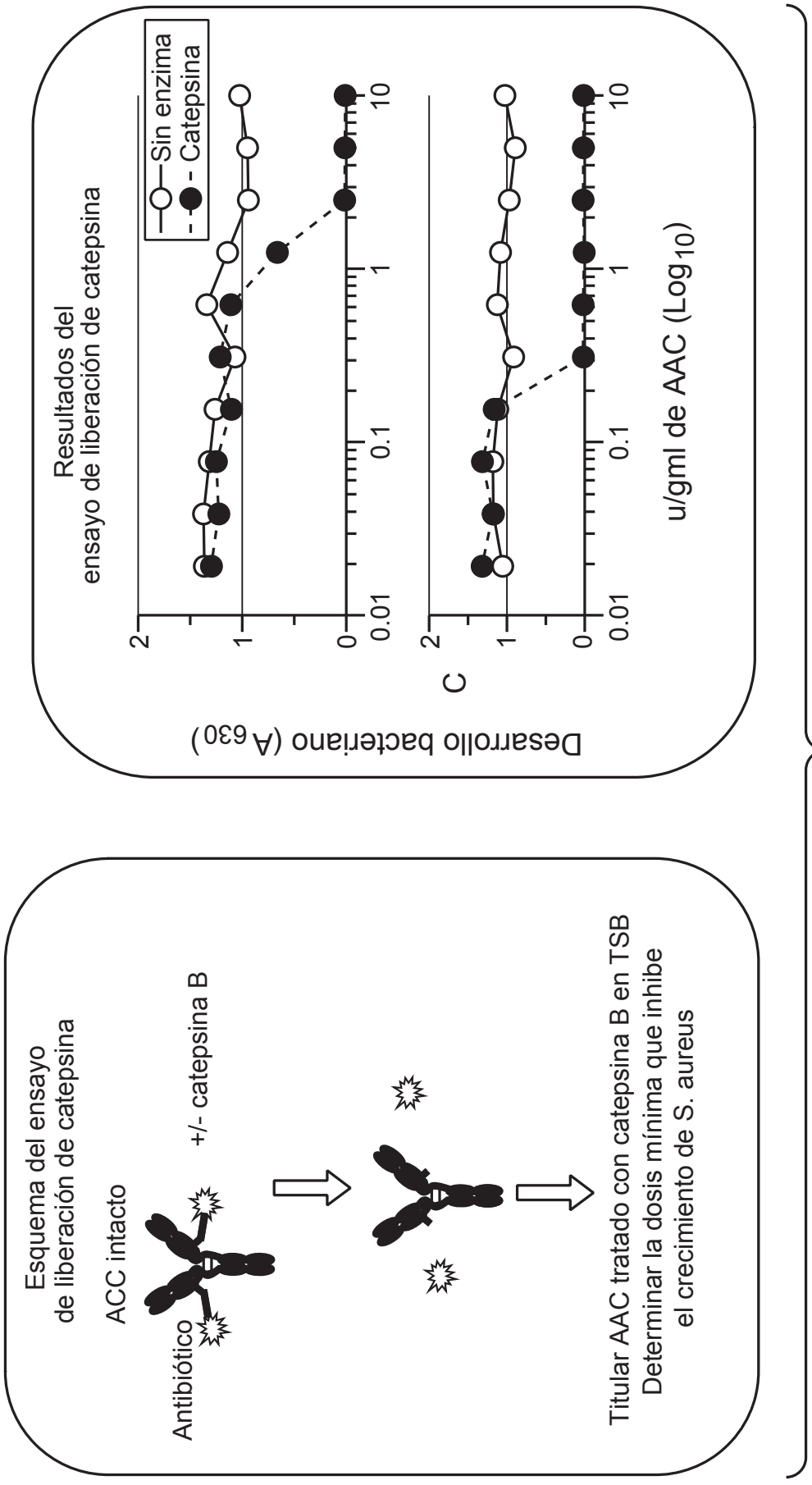

Esquema del ensayo
de liberación de catepsina
ACC intacto
Antibiótico
+/- catepsina B
Titular AAC tratado con catepsina B en TSB
Determinar la dosis mínima que inhibe
el crecimiento de S. aureus
Resultados del
ensayo de liberación de catepsina
Sin enzima
- Catepsina
Desarrollo bacteriano (A630)
C
u/gml de AAC (Log10)
2
1
0
0.01
0.1
1
10

FIG. 12

Las secuencias de CDR de acuerdo con Kabat están subrayadas

Región variable de cadena liviana

CDR L1 - Contact
CDR L1 - Chothia
CDR L1 - Kabat

Kabat Number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	27a	27b	27c	27d	27e	27f	28	29	30	31	32	33	34	35	36
4461	D	I	Q	M	T	Q	S	P	D	S	L	A	V	S	L	G	E	R	A	T	I	N	C	K	S	S	Q	S	V	L	S	R	A	N		N	N	Y	Y	V	A	W	Y
4624	D	I	Q	M	T	Q	S	P	D	S	L	S	V	S	L	G	E	R	A	T	I	N	C	R	S	N	Q	N	L	L	-	S	S	S		N	N	N	Y	L	A	W	Y
4399	E	I	V	L	T	Q	S	P	D	S	L	A	V	S	L	G	E	R	A	T	I	N	C	K	S	N	Q	N	V	L	A	S	S	N		D	K	N	Y	L	A	W	F
6267	D	I	Q	L	T	Q	S	P	D	S	L	A	V	S	L	G	E	R	A	T	I	N	C	K	S	S	Q	N	V	L	Y	S	S	N		N	K	N	Y	L	A	W	Y

CDR L2 - Contact
CDR L2 - Chothia
CDR L2 - Kabat

Kabat Number	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78
4461	Q	H	K	P	G	Q	P	P	K	L	L	I	Y	W	A	S	T	R	E	F	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D		F	T	L	T	I	N	S	L
4624	Q	Q	K	P	G	Q	P	L	K	L	L	I	Y	W	A	S	T	R	E	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D		F	T	L	T	I	S	S	L
4399	Q	H	K	P	G	Q	P	L	K	L	L	I	Y	W	A	S	I	R	E	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D		F	T	L	T	I	S	S	L
6267	Q	Q	K	P	G	Q	P	P	K	L	L	I	Y	W	A	S	T	R	E	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D		F	T	L	T	I	S	S	L

CDR L3 - Contact
CDR L3 - Chothia
CDR L3 - Kabat

Kabat Number	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	95a	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107
4461	Q	A	E	D	V	A	V	Y	Y	C	Q	Q	Y	Y	T	S	R	.	R	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K
4624	Q	A	E	D	V	A	V	Y	Y	C	Q	Q	Y	Y	A	N	P	.	R	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K
4399	R	A	E	D	V	A	V	Y	Y	C	Q	Q	Y	Y	T	N	P	.	R	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	F	N
6267	Q	A	E	D	V	A	V	Y	Y	C	Q	Q	Y	Y	T	S	P	P	Y	T	F	G	Q	G	T	K	L	E	I	E

FIG. 13A

Las secuencias de CDR de acuerdo con Kabat están subrayadas

Región variable de cadena pesada

CDR H1 - Contact
CDR H1 - Chothia
CDR H1 - Kabat

Kabat Number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
4461	Q	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	R	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	S	F	T	D	Y	Y	M	H	W	V	R	Q	A	P	G
4624	Q	V	Q	L	Q	Q	S	R	V	E	V	K	R	P	G	T	S	V	K	V	S	C	K	T	S	G	Y	T	F	S	D	Y	Y	I	H	W	V	R	L	A	P	G
4399	E	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	T	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	D	Y	Y	I	H	W	V	R	L	A	P	G
6267	E	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	E	S	L	K	I	S	C	K	G	S	G	Y	S	F	T	S	Y	W	I	G	W	V	R	Q	M	P	G

CDR H2 - Contact
CDR H2 - Chothia
CDR H2 - Kabat

Kabat Number	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	82a
4461	Q	G	L	E	W	M	G	W	I	N	P	K	S	G	G	T	N	Y	A	Q	R	F	Q	G	R	V	T	M	T	G	D	T	S	I	S	A	A	Y	M	D	L	A
4624	Q	G	L	E	L	M	G	W	I	N	P	N	T	G	G	T	Y	Y	A	Q	K	F	R	D	R	V	T	M	T	R	D	T	S	I	A	T	A	Y	L	E	M	S
4399	Q	G	L	E	L	M	G	W	I	N	P	N	T	G	G	T	N	Y	A	Q	K	F	Q	G	R	V	T	M	T	R	D	T	S	I	A	T	A	Y	M	E	L	S
6267	K	G	L	E	W	M	G	I	I	H	P	G	D	S	K	T	R	Y	S	P	S	F	Q	G	Q	V	T	I	S	A	D	K	S	I	S	T	A	Y	L	Q	W	N

CDR H3 - Contact
CDR H3 - Chothia
CDR H3 - Kabat

Kabat Number	82b	82c	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	100a	100b	100c	100d	100e	100f	100g	109h	100i	100j	100k	100l	100m	100n	100o	100p	100q	100r	100s	100t	100u	101
4461	S	L	T	S	D	D	T	A	V	Y	Y	C	V	K	D	C	G	S	G	G	L	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	D	
4624	S	L	T	S	D	D	T	A	V	Y	Y	C	A	K	D	C	G	R	G	G	L	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	D	
4399	S	L	T	S	D	D	T	A	V	Y	Y	C	A	K	D	C	G	N	A	G	L	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	D	
6267	S	L	K	A	S	D	T	A	M	Y	Y	C	A	R	L	Y	C	S	G	G	S	C	Y	S	D	R	A	F	S	S	L	G	A	G	G	Y	Y	Y	Y	G	M	G

Kabat Number	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113
4461	F	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S	S
4624	I	W	G	P	G	T	M	V	T	V	S	S
4399	I	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S	S
6267	V	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S	S

FIG. 13B

Anticuerpo	CDR L1	CDR L2	CDR L3	CDR H1	CDR H1	CDR H3
6078	RASQTISGWLA (SEQ ID NO:33)	KASTLES (SEQ ID NO:34)	QQYKSYSFN (SEQ ID NO:35)	SYDIN (SEQ ID NO:36)	WMNANSGNTGYAQKFQG (SEQ ID NO:37)	SSILVRGALGRYFDL (SEQ ID NO:38)
6263	RASQTISGWLA (SEQ ID NO:39)	KASTLES (SEQ ID NO:40)	QQYKSYSFN (SEQ ID NO:41)	SYDIN (SEQ ID NO:42)	WMNANSGNTGYAQKFQG (SEQ ID NO:43)	SSILVRGALGRYFDL (SEQ ID NO:44)
4450	RASQFVSRTSLA (SEQ ID NO:45)	ETSSRAT (SEQ ID NO:46)	HKYGSGPRT (SEQ ID NO:47)	NYDFI (SEQ ID NO:48)	WMNPNSYNTGYGQKFQG (SEQ ID NO:49)	AVRGQLLSEY (SEQ ID NO:50)
6297	RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO:51)	DASSRAT (SEQ ID NO:52)	QKYGSTPRP (SEQ ID NO:53)	SYDIN (SEQ ID NO:54)	WMNPNSGNTNYAQRFQG (SEQ ID NO:55)	ERWSKDTGHYYYYGMDV (SEQ ID NO:56)
6239	RASLDITNHLA (SEQ ID NO:57)	EASILQS (SEQ ID NO:58)	EKCNSTPRT (SEQ ID NO:59)	NYDIN (SEQ ID NO:60)	WMNPSSGRTGYAPKFRG (SEQ ID NO:61)	GGGYYDSSGNYHISGLDV (SEQ ID NO:62)
6232	RASQSVGAIYLA (SEQ ID NO:63)	GVSNRAT (SEQ ID NO:64)	QLYTSSRALT (SEQ ID NO:65)	AYAMN (SEQ ID NO:66)	SITKNSDSLYYADSVKG (SEQ ID NO:67)	LAARIMATDY (SEQ ID NO:68)
6259	RASQGIRNGLG (SEQ ID NO:69)	PASTLES (SEQ ID NO:70)	LQDHNYPPT (SEQ ID NO:71)	YYSMI (SEQ ID NO:72)	SIDSSSRYLYYADSVKG (SEQ ID NO:73)	DGDDILSVYRGSGRPFDY (SEQ ID NO:74)
6292	RASQGIRNGLG (SEQ ID NO:75)	PASTLES (SEQ ID NO:76)	LQDHNYPPS (SEQ ID NO:77)	YYSMI (SEQ ID NO:78)	SIDSSSRYRYYTDSVKG (SEQ ID NO:79)	DGDDILSVYQGSGRPFDY (SEQ ID NO:80)
4462	RASQSVRTNVA (SEQ ID NO:81)	GASTRAS (SEQ ID NO:82)	LQYNTWPRT (SEQ ID NO:83)	TNDMS (SEQ ID NO:84)	TIIGIDDTTHYADSVRG (SEQ ID NO:85)	NSGIYSF (SEQ ID NO:86)
6265	RASQDIGSSLA (SEQ ID NO:87)	ATSTLQS (SEQ ID NO:88)	QQLNNYVHS (SEQ ID NO:89)	DYAMG (SEQ ID NO:90)	VVTGHSYRTHYADSVKG (SEQ ID NO:91)	RIWSYGDDSFDV (SEQ ID NO:92)
6253	RASQSIGDRLA (SEQ ID NO:93)	WASNLEG (SEQ ID NO:94)	QQYKSQWS (SEQ ID NO:95)	SYAMN (SEQ ID NO:96)	YISSIETIYYADSVKG (SEQ ID NO:97)	DRLVDVPLSSPNS (SEQ ID NO:98)
4497	KSSQSIFRTSRNKNLLN (SEQ ID NO:99)	WASTRKS (SEQ ID NO:100)	QQYFSPPYT (SEQ ID NO:101)	SFWMH (SEQ ID NO:102)	FTNNEGTTTAYADSVRG (SEQ ID NO:103)	GDGGLDD (SEQ ID NO:104)
4487	RASQFTNHYLN (SEQ ID NO:105)	VASNLQS (SEQ ID NO:106)	QQSYRTPYT (SEQ ID NO:107)	SGYYN (SEQ ID NO:108)	YILSGAHTDIKASLGS (SEQ ID NO:109)	SGVYSKYSLDV (SEQ ID NO:110)

6263 tiene las mismas secuencias de CDR que 6078

FIG. 14

Las secuencias de CDR de acuerdo con Kabat están subrayadas

Cadena liviana

CDR L1 - Contact
CDR L1 - Chothia
CDR L1 - Kabat

Kabat Number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
6078	D	I	V	M	T	Q	S	P	S	I	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	T	I	S	G	W	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	A	E
6078.v2HC-Cys	D	I	V	M	T	Q	S	P	S	I	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	T	I	S	G	W	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	A	E
6078.v2LC-Cys	D	I	V	M	T	Q	S	P	S	I	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	T	I	S	G	W	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	A	E
6078.v3HC-Cys	D	I	V	M	T	Q	S	P	S	I	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	T	I	S	G	W	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	A	E
6078.v3LC-Cys	D	I	V	M	T	Q	S	P	S	I	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	T	I	S	G	W	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	A	E
6078.v4HC-Cys	D	I	V	M	T	Q	S	P	S	I	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	T	I	S	G	W	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	A	E
6078.v4LC-Cys	D	I	V	M	T	Q	S	P	S	I	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	T	I	S	G	W	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	A	E
6078.v4HCLC-Cys	D	I	V	M	T	Q	S	P	S	I	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	T	I	S	G	W	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	A	E

CDR L2 - Contact
CDR L2 - Chothia
CDR L2 - Kabat

Kabat Number	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
6078	A	P	K	L	L	I	Y	K	A	S	T	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	E	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	D	D	F	G
6078.v2HC-Cys	A	P	K	L	L	I	Y	K	A	S	T	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	E	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	D	D	F	G
6078.v2LC-Cys	A	P	K	L	L	I	Y	K	A	S	T	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	E	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	D	D	F	G
6078.v3HC-Cys	A	P	K	L	L	I	Y	K	A	S	T	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	E	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	D	D	F	G
6078.v3LC-Cys	A	P	K	L	L	I	Y	K	A	S	T	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	E	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	D	D	F	G
6078.v4HC-Cys	A	P	K	L	L	I	Y	K	A	S	T	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	E	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	D	D	F	G
6078.v4LC-Cys	A	P	K	L	L	I	Y	K	A	S	T	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	E	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	D	D	F	G
6078.v4HCLC-Cys	A	P	K	L	L	I	Y	K	A	S	T	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	E	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	D	D	F	G

CDR L3 - Contact
CDR L3 - Chothia
CDR L3 - Kabat

Constant Region, Eu Number

Kabat Number	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126
6078	I	Y	Y	C	Q	Q	Y	K	S	Y	S	F	N	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P	P	S	D	E	Q	L	K
6078.v2HC-Cys	I	Y	Y	C	Q	Q	Y	K	S	Y	S	F	N	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P	P	S	D	E	Q	L	K
6078.v2LC-Cys	I	Y	Y	C	Q	Q	Y	K	S	Y	S	F	N	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P	P	S	D	E	Q	L	K

FIG. 15A-1

Kabat Number	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126
6078.v3HC-Cys	I	Y	Y	C	Q	Q	Y	K	S	Y	S	F	N	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P	P	S	D	E	Q	L	K
6078.v3LC-Cys	I	Y	Y	C	Q	Q	Y	K	S	Y	S	F	N	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P	P	S	D	E	Q	L	K
6078.v4HC-Cys	I	Y	Y	C	Q	Q	Y	K	S	Y	S	F	N	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P	P	S	D	E	Q	L	K
6078.v4LC-Cys	I	Y	Y	C	Q	Q	Y	K	S	Y	S	F	N	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P	P	S	D	E	Q	L	K
6078.v4HCLC-Cys	I	Y	Y	C	Q	Q	Y	K	S	Y	S	F	N	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P	P	S	D	E	Q	L	K

Eu Number	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	164	166	167	168
6078	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E	S	V	T	E	Q	D	S
6078.v2HC-Cys	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E	S	V	T	E	Q	D	S
6078.v2LC-Cys	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E	S	V	T	E	Q	D	S
6078.v3HC-Cys	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E	S	V	T	E	Q	D	S
6078.v3LC-Cys	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E	S	V	T	E	Q	D	S
6078.v4HC-Cys	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E	S	V	T	E	Q	D	S
6078.v4LC-Cys	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E	S	V	T	E	Q	D	S
6078.v4HCLC-Cys	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E	S	V	T	E	Q	D	S

Eu Number	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210
6078	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P	V	T	K	S	F	N
6078.v2HC-Cys	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P	V	T	K	S	F	N
6078.v2LC-Cys	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P	C	T	K	S	F	N
6078.v3HC-Cys	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P	V	T	K	S	F	N
6078.v3LC-Cys	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P	C	T	K	S	F	N
6078.v4HC-Cys	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P	V	T	K	S	F	N
6078.v4LC-Cys	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P	C	T	K	S	F	N
6078.v4HCLC-Cys	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P	C	T	K	S	F	N

Eu Number	211	212	213	214
6078	R	G	E	C
6078.v2HC-Cys	R	G	E	C
6078.v2LC-Cys	R	G	E	C
6078.v3HC-Cys	R	G	E	C
6078.v3LC-Cys	R	G	E	C
6078.v4HC-Cys	R	G	E	C
6078.v4LC-Cys	R	G	E	C
6078.v4HCLC-Cys	R	G	E	C

FIG. 15A-2

Cadena pesada

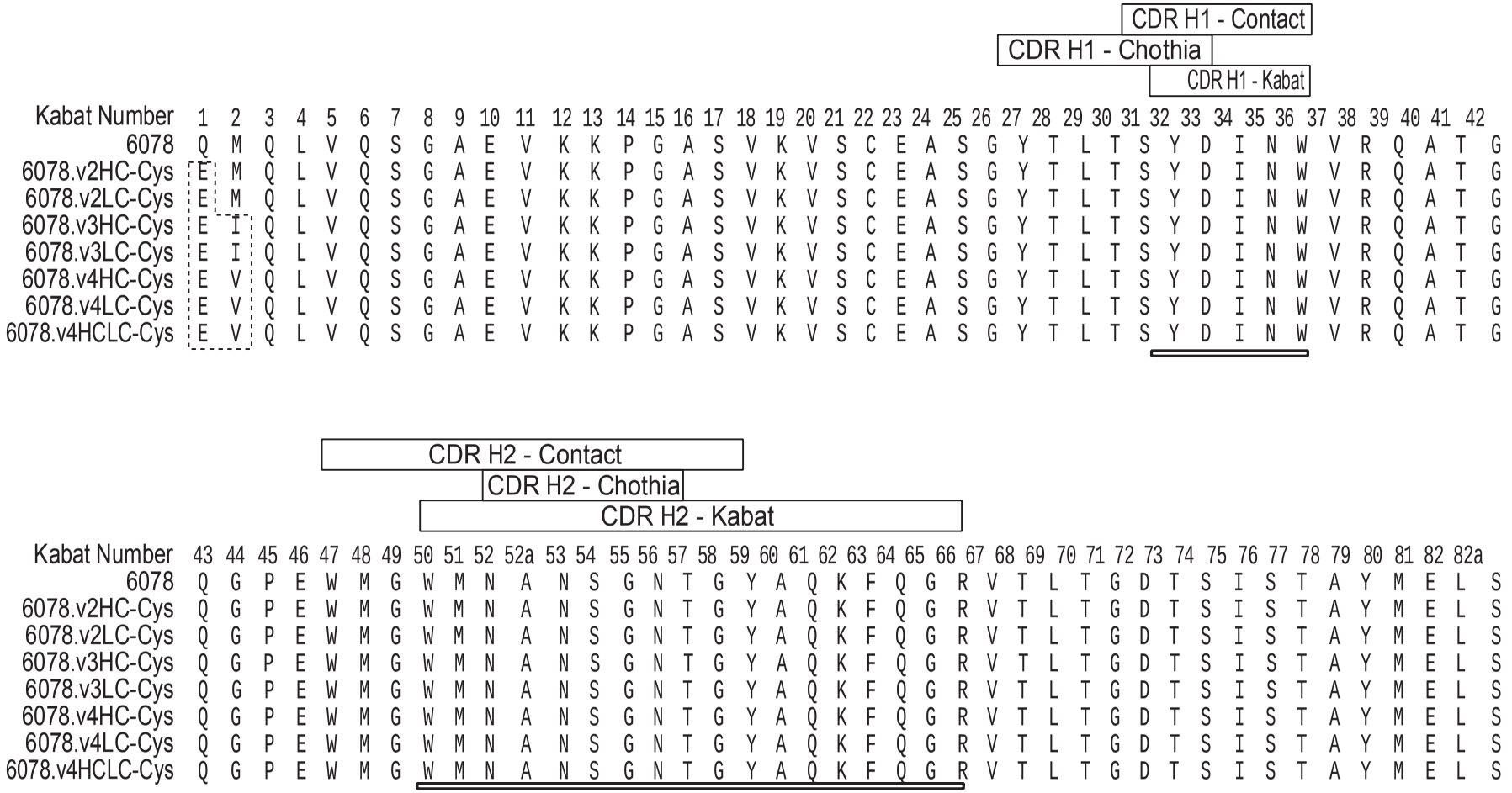


FIG. 15B-1

CDR H3 - Contact
CDR H3 - Chothia
CDR H3 - Kabat

Kabat Number	82b	82c	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	100a	100b	100c	100d	100e	100f	100g	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	118	119	Cons.
6078	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	S	S	I	L	V	R	G	A	L	G	R	Y	F	D	L	W	G	R	G	T	L	V	T	V	S	S	A	S	
6078.v2HC-Cys	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	S	S	I	L	V	R	G	A	L	G	R	Y	F	D	L	W	G	R	G	T	L	V	T	V	S	S	C	S	
6078.v2LC-Cys	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	S	S	I	L	V	R	G	A	L	G	R	Y	F	D	L	W	G	R	G	T	L	V	T	V	S	S	A	S	
6078.v3HC-Cys	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	S	S	I	L	V	R	G	A	L	G	R	Y	F	D	L	W	G	R	G	T	L	V	T	V	S	S	C	S	
6078.v3LC-Cys	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	S	S	I	L	V	R	G	A	L	G	R	Y	F	D	L	W	G	R	G	T	L	V	T	V	S	S	A	S	
6078.v4HC-Cys	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	S	S	I	L	V	R	G	A	L	G	R	Y	F	D	L	W	G	R	G	T	L	V	T	V	S	S	C	S	
6078.v4LC-Cys	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	S	S	I	L	V	R	G	A	L	G	R	Y	F	D	L	W	G	R	G	T	L	V	T	V	S	S	A	S	
6078.v4HCLC-Cys	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	S	S	I	L	V	R	G	A	L	G	R	Y	F	D	L	W	G	R	G	T	L	V	T	V	S	S	C	S	

Eu Number	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161
6078	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W	N	S	G
6078.v2HC-Cys	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W	N	S	G
6078.v2LC-Cys	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W	N	S	G
6078.v3HC-Cys	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W	N	S	G
6078.v3LC-Cys	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W	N	S	G
6078.v4HC-Cys	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W	N	S	G
6078.v4LC-Cys	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W	N	S	G
6078.v4HCLC-Cys	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W	N	S	G

Eu Number	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203
6078	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C	N	V	N
6078.v2HC-Cys	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C	N	V	N
6078.v2LC-Cys	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C	N	V	N
6078.v3HC-Cys	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C	N	V	N
6078.v3LC-Cys	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C	N	V	N
6078.v4HC-Cys	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C	N	V	N
6078.v4LC-Cys	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C	N	V	N
6078.v4HCLC-Cys	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C	N	V	N

FIG. 15B-2

Eu Number	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245
6078	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L	F	P	P
6078.v2HC-Cys	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L	F	P	P
6078.v2LC-Cys	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L	F	P	P
6078.v3HC-Cys	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L	F	P	P
6078.v3LC-Cys	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L	F	P	P
6078.v4HC-Cys	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L	F	P	P
6078.v4LC-Cys	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L	F	P	P
6078.v4HCLC-Cys	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L	F	P	P

Eu Number	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287
6078	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V	H	N	A
6078.v2HC-Cys	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V	H	N	A
6078.v2LC-Cys	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V	H	N	A
6078.v3HC-Cys	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V	H	N	A
6078.v3LC-Cys	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V	H	N	A
6078.v4HC-Cys	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V	H	N	A
6078.v4LC-Cys	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V	H	N	A
6078.v4HCLC-Cys	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V	H	N	A

Eu Number	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329
6078	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K	A	L	P
6078.v2HC-Cys	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K	A	L	P
6078.v2LC-Cys	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K	A	L	P
6078.v3HC-Cys	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K	A	L	P
6078.v3LC-Cys	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K	A	L	P
6078.v4HC-Cys	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K	A	L	P
6078.v4LC-Cys	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K	A	L	P
6078.v4HCLC-Cys	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K	A	L	P

FIG. 15B-3

Eu Number	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371
6078	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	G
6078.v2HC-Cys	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	G
6078.v2LC-Cys	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	G
6078.v3HC-Cys	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	G
6078.v3LC-Cys	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	G
6078.v4HC-Cys	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	G
6078.v4LC-Cys	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	G
6078.v4HCLC-Cys	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	G

Eu Number	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413
6078	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D
6078.v2HC-Cys	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D
6078.v2LC-Cys	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D
6078.v3HC-Cys	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D
6078.v3LC-Cys	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D
6078.v4HC-Cys	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D
6078.v4LC-Cys	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D
6078.v4HCLC-Cys	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D

Eu Number	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446
6078	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G
6078.v2HC-Cys	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G
6078.v2LC-Cys	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G
6078.v3HC-Cys	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G
6078.v3LC-Cys	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G
6078.v4HC-Cys	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G
6078.v4LC-Cys	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G
6078.v4HCLC-Cys	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G

FIG. 15B-4

Las secuencias de CDR de acuerdo con Kabat están subrayadas

Cadena liviana

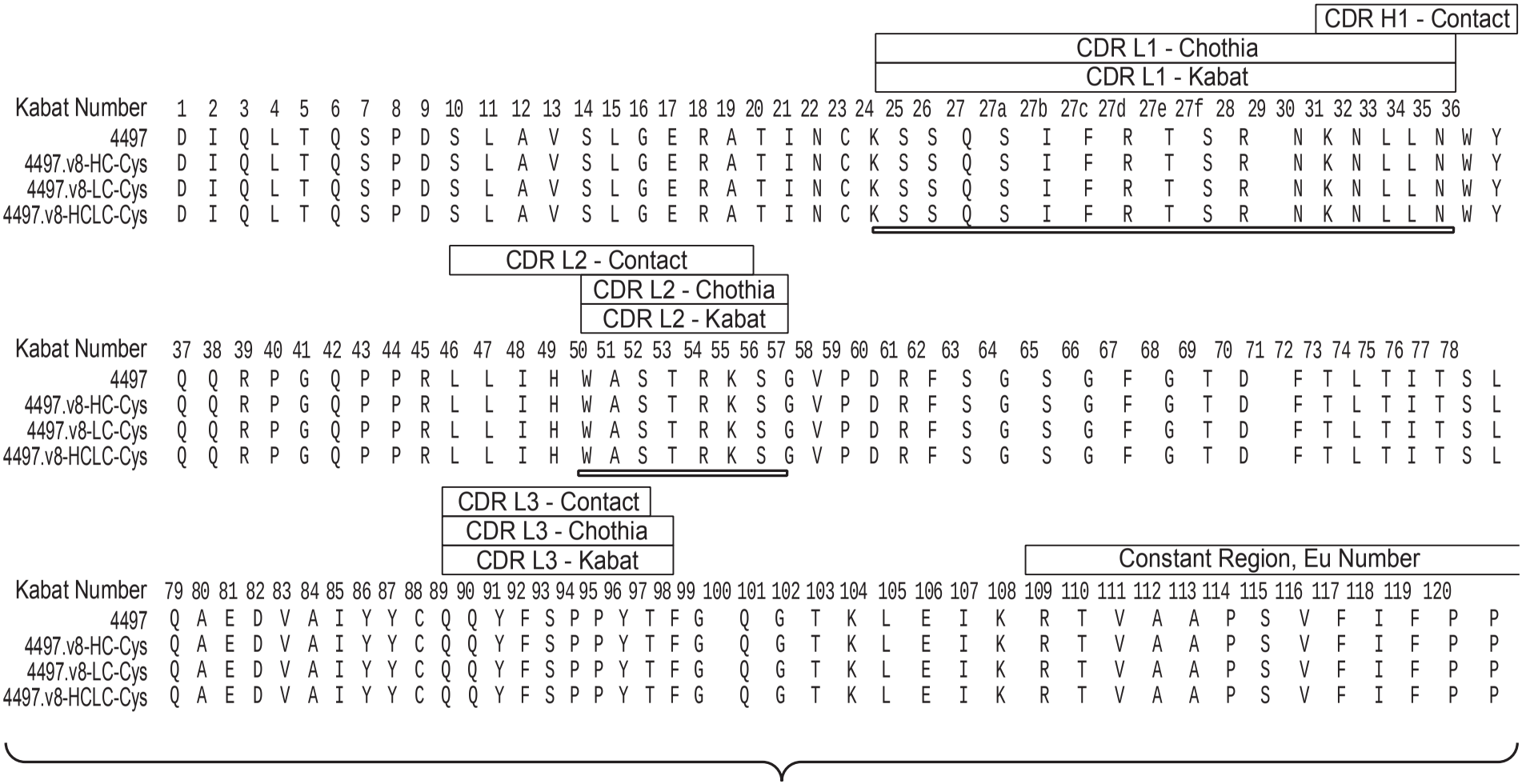


FIG. 16A-1

Eu Number	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162
4497	S	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E	S
4497.v8-HC-Cys	S	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E	S
4497.v8-LC-Cys	S	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E	S
4497.v8-HCLC-Cys	S	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E	S

Eu Number	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204
4497	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P
4497.v8-HC-Cys	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P
4497.v8-LC-Cys	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P
4497.v8-HCLC-Cys	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P

Eu Number	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214
4497	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C
4497.v8-HC-Cys	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C
4497.v8-LC-Cys	C	T	K	S	F	N	R	G	E	C
4497.v8-HCLC-Cys	C	T	K	S	F	N	R	G	E	C

FIG. 16A-2

Cadena pesada

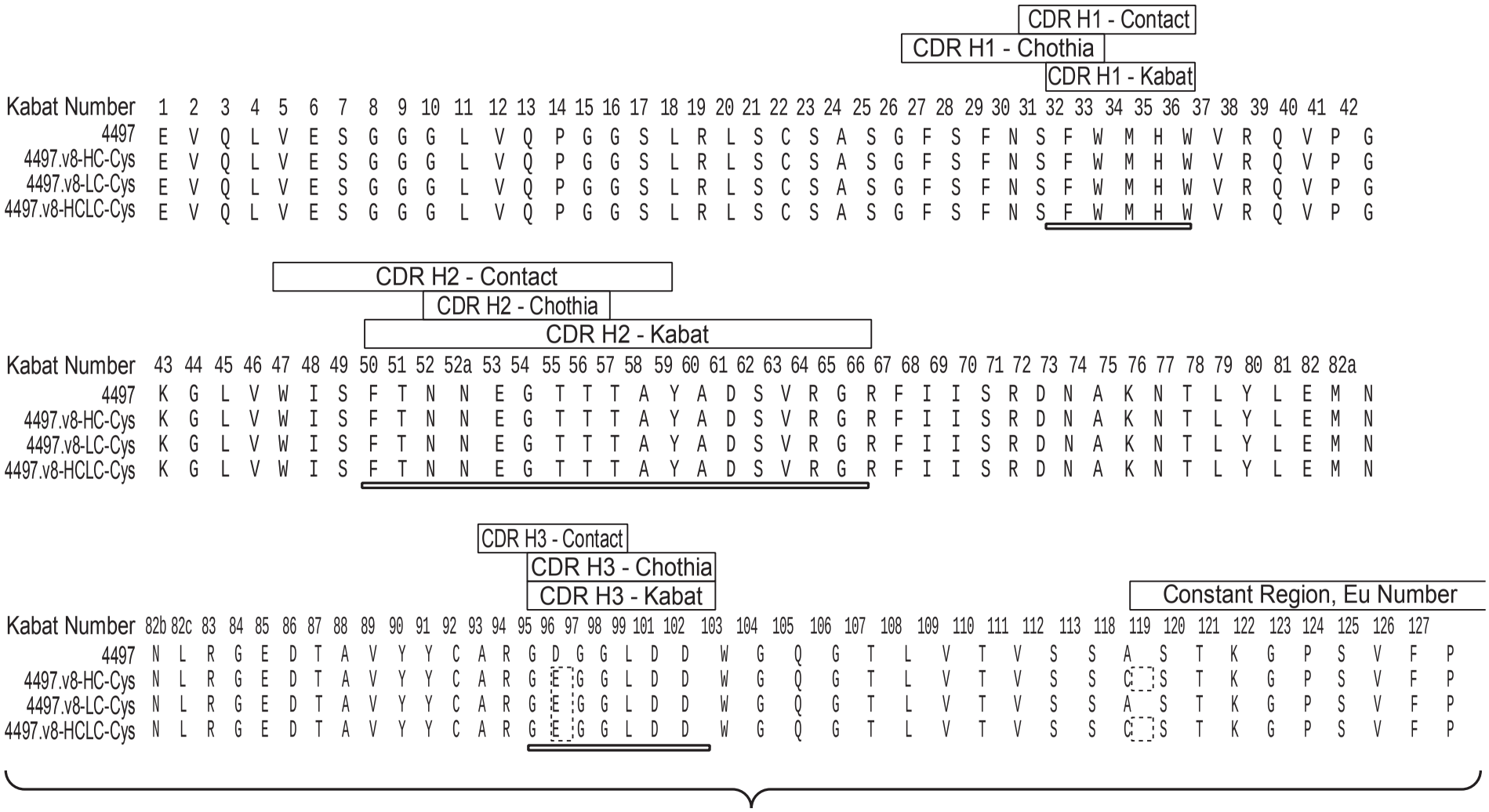


FIG. 16B-1

Eu Number	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169
4497	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W	N	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T
4497.v8-HC-Cys	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W	N	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T
4497.v8-LC-Cys	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W	N	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T
4497.v8-HCLC-Cys	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W	N	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T

Eu Number	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211
4497	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V
4497.v8-HC-Cys	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V
4497.v8-LC-Cys	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V
4497.v8-HCLC-Cys	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V

Eu Number	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253
4497	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I
4497.v8-HC-Cys	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I
4497.v8-LC-Cys	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I
4497.v8-HCLC-Cys	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I

Eu Number	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295
4497	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q
4497.v8-HC-Cys	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q
4497.v8-LC-Cys	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q
4497.v8-HCLC-Cys	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q

Eu Number	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337
4497	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K	A	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S
4497.v8-HC-Cys	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K	A	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S
4497.v8-LC-Cys	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K	A	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S
4497.v8-HCLC-Cys	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K	A	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S

Eu Number	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379
4497	K	A	K	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V
4497.v8-HC-Cys	K	A	K	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V
4497.v8-LC-Cys	K	A	K	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V
4497.v8-HCLC-Cys	K	A	K	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V

FIG. 16B-2

Eu Number	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421
4497	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N
4497.v8-HC-Cys	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N
4497.v8-LC-Cys	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N
4497.v8-HCLC-Cys	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N

Eu Number	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446
4497	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G
4497.v8-HC-Cys	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G
4497.v8-LC-Cys	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G
4497.v8-HCLC-Cys	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G

FIG. 16B-3

Las secuencias de CDR de acuerdo con Kabat están subrayadas

Cadena liviana

CDR L1 - Contact

CDR L1 - Chothia

CDR L1 - Kabat

Kabat Number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	27a	27b	27c	27d	27e	27f	28	29	30	31	32	33	34	35	36
6078	D	I	V	M	T	Q	S	P	S	I	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	.	.	.	.	.	.	T		I	S	G	W	L	A	W	Y
6263	D	I	Q	L	T	Q	S	P	S	I	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	.	.	.	.	.	.	T		I	S	G	W	L	A	W	Y
4450	E	I	V	L	T	Q	S	P	G	T	L	S	L	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	R	A	S	Q	F	.	.	.	.	.	V		S	R	T	S	L	A	W	F
6297	E	T	T	L	T	Q	S	P	G	T	L	S	L	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	R	A	S	Q	S	.	.	.	.	.	V		S	S	S	Y	L	A	W	Y
6239	D	V	V	M	T	Q	S	S	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	L	.	.	.	.	.	.	D		I	T	N	H	L	A	W	Y
6232	E	I	V	M	T	Q	S	P	G	T	L	S	L	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	R	A	S	Q	S	.	.	.	.	.	V		G	A	I	Y	L	A	W	Y
6259	E	I	V	L	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	.	.	.	.	.	.	G		I	R	N	G	L	G	W	Y
6292	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	.	.	.	.	.	.	G		I	R	N	G	L	G	W	Y
4462	D	I	Q	M	T	Q	S	P	A	T	L	S	V	S	P	G	E	T	V	T	L	S	C	R	A	S	Q	.	.	.	.	.	.	S		V	R	T	N	V	A	W	Y
6265	D	V	V	M	T	Q	S	P	S	F	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	L	T	C	R	A	S	Q	.	.	.	.	.	.	D		I	G	S	S	L	A	W	Y
6253	E	T	T	L	T	Q	S	P	S	T	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	.	.	.	.	.	.	S		I	G	D	R	L	A	W	Y
4497	D	I	Q	L	T	Q	S	P	D	S	L	A	V	S	L	G	E	R	A	T	I	N	C	K	S	S	Q	S	I	F	R	T	S	R		N	K	N	L	L	N	W	Y
4487	D	I	Q	L	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	.	.	.	.	.	.	F		T	N	H	Y	L	N	W	Y

CDR L2 - Contact

CDR L2 - Chothia

CDR L2 - Kabat

Kabat Number	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78
6078	Q	Q	K	P	A	E	A	P	K	L	L	I	Y	K	A	S	T	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	E		F	T	L	T	I	S	S	L
6263	Q	Q	K	P	A	E	A	P	K	L	L	I	Y	K	A	S	T	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	E		F	T	L	T	I	S	S	L
4450	Q	Q	K	P	G	Q	P	P	R	L	L	I	Y	E	T	S	S	R	A	T	G	I	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D		F	T	L	T	I	S	R	L
6297	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	K	V	L	I	Y	D	A	S	S	R	A	T	G	I	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D		F	T	L	T	I	S	R	L
6239	Q	Q	K	P	G	E	L	P	K	L	L	I	Y	E	A	S	I	L	Q	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D		F	T	L	T	I	S	S	L
6232	Q	Q	E	P	G	R	A	P	T	L	L	F	Y	G	V	S	N	R	A	T	G	I	P	D	R	F	S	C	S	G	S	G	T	D		F	T	L	T	I	S	R	L
6259	Q	Q	T	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	P	A	S	T	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	D	R	D		F	T	L	T	I	T	S	L
6292	Q	Q	I	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	P	A	S	T	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	D	R	D		F	T	L	T	I	T	S	L
4462	R	H	K	A	G	Q	A	P	M	I	L	V	S	G	A	S	T	R	A	S	G	A	P	A	R	F	S	G	S	G	Y	G	T	E		F	T	L	T	I	T	S	L
6265	Q	Q	R	P	G	K	A	P	N	L	L	I	Y	A	T	S	T	L	Q	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	F	G	T	E		F	T	L	T	I	S	T	L
6253	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	V	L	I	Y	W	A	S	N	L	E	G	G	V	P	S	R	F	S	G	T	G	S	G	T	E		F	A	L	T	I	S	G	L
4497	Q	Q	R	P	G	Q	P	P	R	L	L	I	H	W	A	S	T	R	K	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	F	G	T	D		F	T	L	T	I	T	S	L
4487	Q	H	K	P	G	R	A	P	K	L	M	I	S	V	A	S	N	L	Q	S	G	V	P	S	R	F	T	G	S	E	S	G	T	D		F	T	L	T	I	S	G	L

FIG. 17A-1

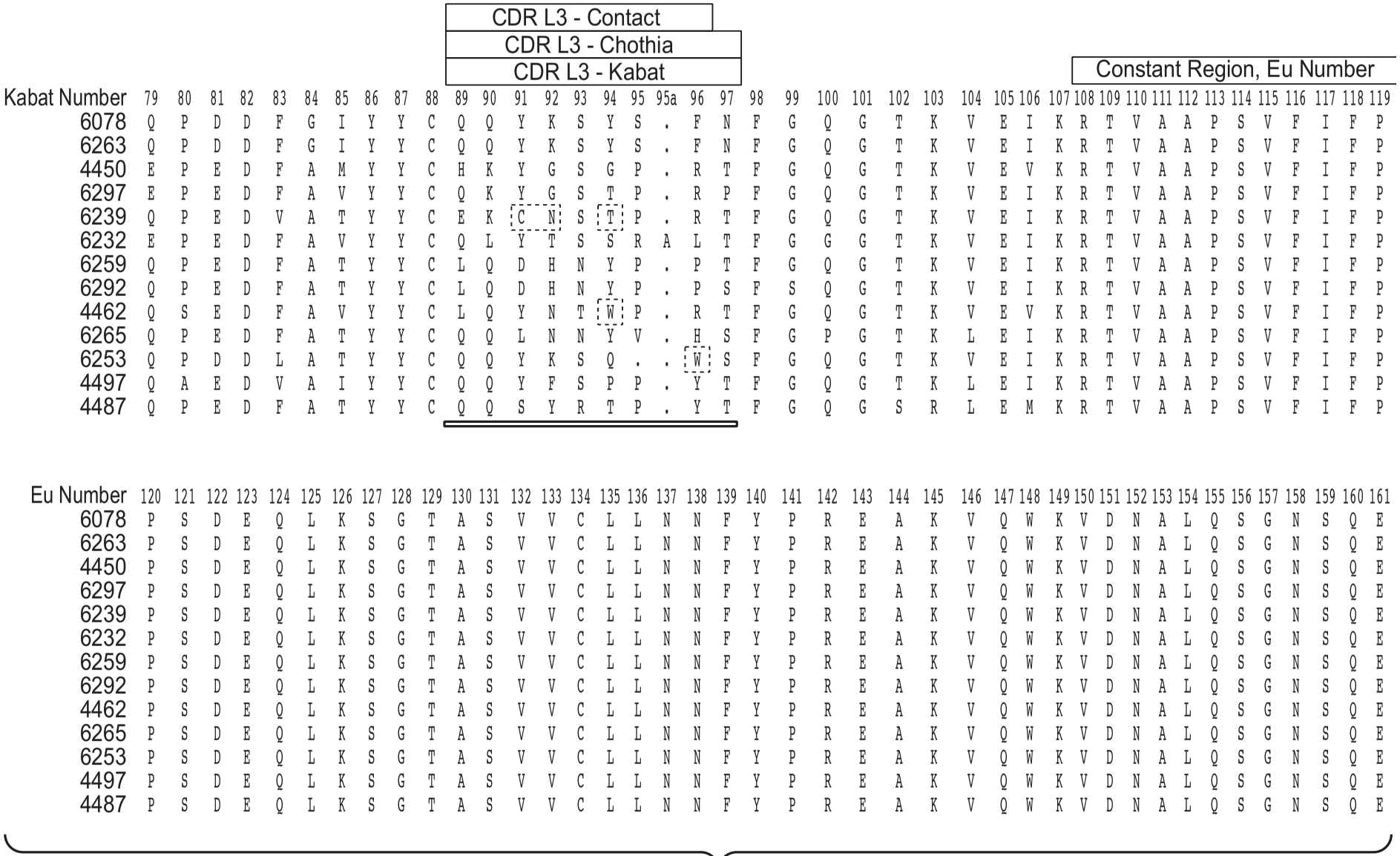

CDR L3 - Contact
CDR L3 - Chothia
CDR L3 - Kabat
Constant Region, Eu Number
Kabat Number 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 95a 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119
6078 Q P D D F G I Y Y C Q Q Y K S Y S . F N F G Q G T K V E I K R T V A A P S V F I F P
6263 Q P D D F G I Y Y C Q Q Y K S Y S . F N F G Q G T K V E I K R T V A A P S V F I F P
4450 E P E D F A M Y Y C H K Y G S G P . R T F G Q G T K V E V K R T V A A P S V F I F P
6297 E P E D F A V Y Y C Q K Y G S T P . R P F G Q G T K V E I K R T V A A P S V F I F P
6239 Q P E D V A T Y Y C E K C N S T P . R T F G Q G T K V E I K R T V A A P S V F I F P
6232 E P E D F A V Y Y C Q L Y T S S R A L T F G G G T K V E I K R T V A A P S V F I F P
6259 Q P E D F A T Y Y C L Q D H N Y P . P T F G Q G T K V E I K R T V A A P S V F I F P
6292 Q P E D F A T Y Y C L Q D H N Y P . P S F S Q G T K V E I K R T V A A P S V F I F P
4462 Q S E D F A V Y Y C L Q Y N T W P . R T F G Q G T K V E V K R T V A A P S V F I F P
6265 Q P E D F A T Y Y C Q Q L N N Y V . H S F G P G T K L E I K R T V A A P S V F I F P
6253 Q P D D L A T Y Y C Q Q Y K S Q . . W S F G Q G T K V E I K R T V A A P S V F I F P
4497 Q A E D V A I Y Y C Q Q Y F S P P . Y T F G Q G T K L E I K R T V A A P S V F I F P
4487 Q P E D F A T Y Y C Q Q S Y R T P . Y T F G Q G S R L E M K R T V A A P S V F I F P
Eu Number 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161
6078 P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E
6263 P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E
4450 P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E
6297 P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E
6239 P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E
6232 P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E
6259 P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E
6292 P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E
4462 P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E
6265 P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E
6253 P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E
4497 P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E
4487 P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E

FIG. 17A-2

Eu Number	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203
6078	S	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S
6263	S	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S
4450	S	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S
6297	S	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S
6239	S	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S
6232	S	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S
6259	S	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S
6292	S	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S
4462	S	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S
6265	S	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S
6253	S	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S
4497	S	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S
4487	S	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S

Eu Number	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214
6078	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C
6263	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C
4450	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C
6297	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C
6239	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C
6232	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C
6259	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C
6292	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C
4462	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C
6265	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C
6253	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C
4497	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C
4487	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C
		*									

*La posición 205 de Eu de cadena liviana marcada por un asterisco se puede cambiar por Cys para la conjugación del fármaco.

FIG. 17A-3

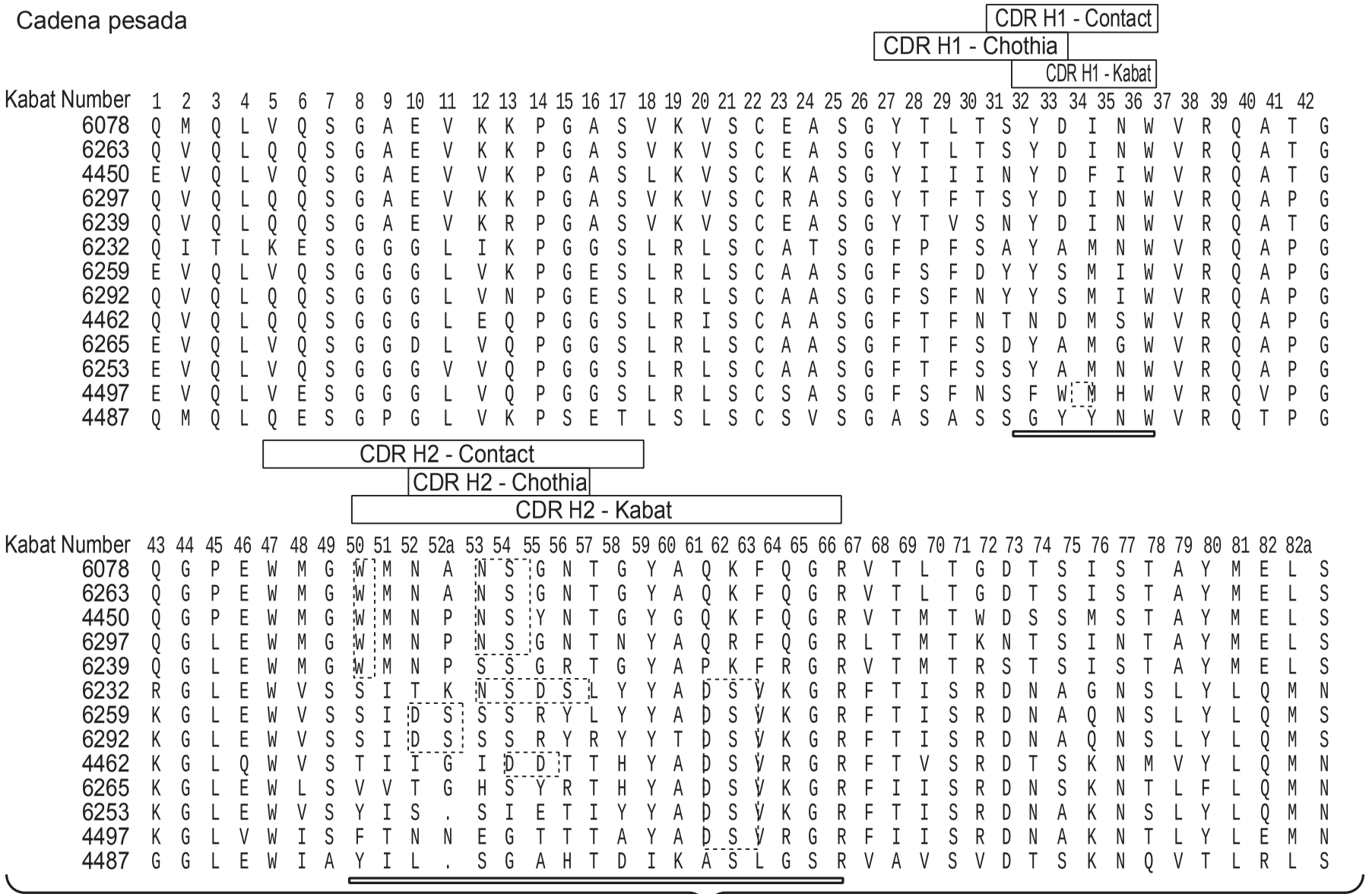
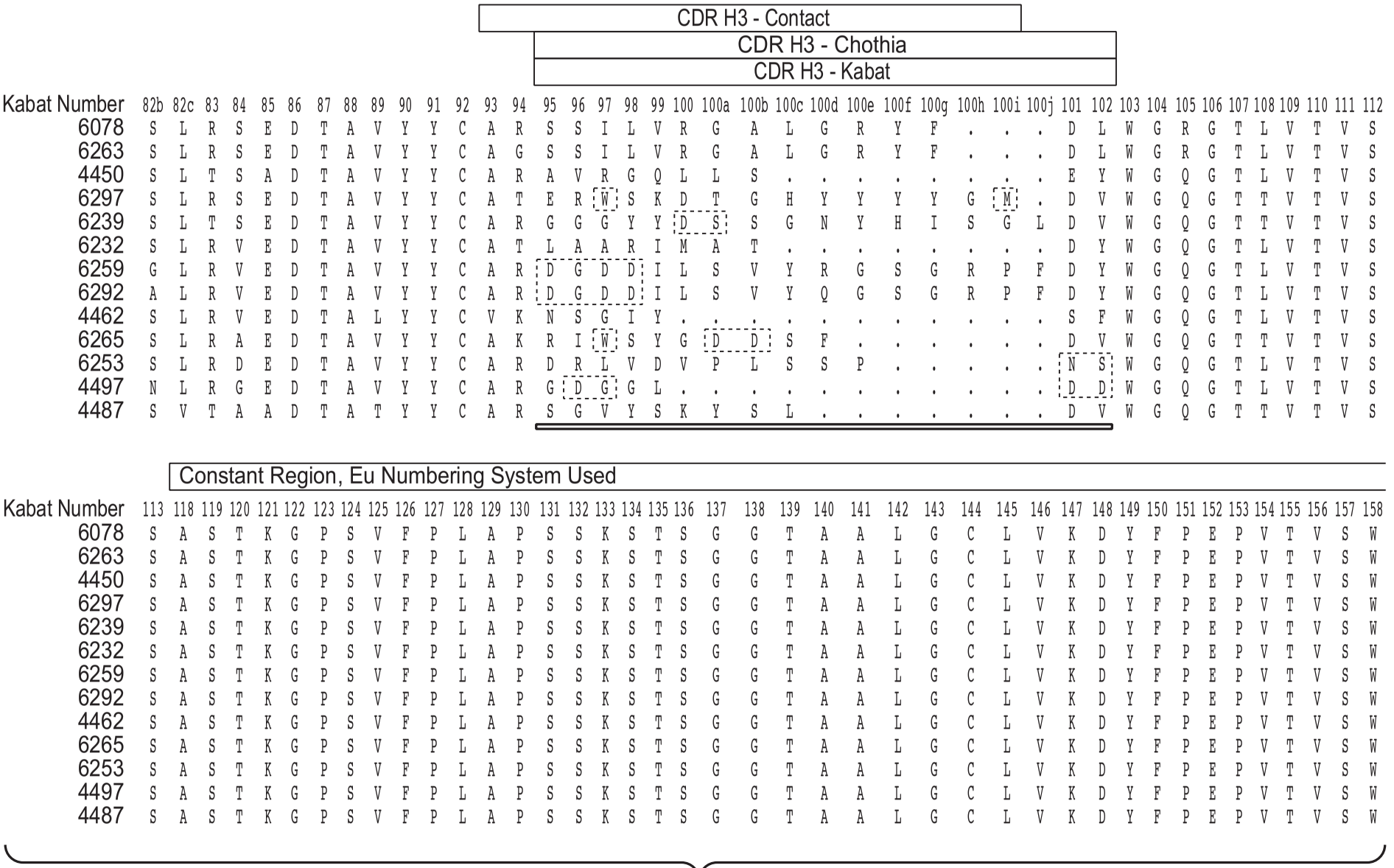

Cadena pesada
CDR H1 - Contact
CDR H1 - Chothia
CDR H1 - Kabat
CDR H2 - Contact
CDR H2 - Chothia
CDR H2 - Kabat
Kabat Number 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42
6078 Q M Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C E A S G Y T L T S Y D I N W V R Q A T G
6263 Q V Q L Q Q S G A E V K K P G A S V K V S C E A S G Y T L T S Y D I N W V R Q A T G
4450 E V Q L V Q S G A E V V K P G A S L K V S C K A S G Y I I I N Y D F I W V R Q A T G
6297 Q V Q L Q Q S G A E V K K P G A S V K V S C R A S G Y T F T S Y D I N W V R Q A P G
6239 Q V Q L Q Q S G A E V K R P G A S V K V S C E A S G Y T V S N Y D I N W V R Q A T G
6232 Q I T L K E S G G G L I K P G G S L R L S C A T S G F P F S A Y A M N W V R Q A P G
6259 E V Q L V Q S G G G L V K P G E S L R L S C A A S G F S F D Y Y S M I W V R Q A P G
6292 Q V Q L Q Q S G G G L V N P G E S L R L S C A A S G F S F N Y Y S M I W V R Q A P G
4462 Q V Q L Q Q S G G G L E Q P G G S L R I S C A A S G F T F N T N D M S W V R Q A P G
6265 E V Q L V Q S G G D L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S D Y A M G W V R Q A P G
6253 E V Q L V Q S G G G V V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y A M N W V R Q A P G
4497 E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C S A S G F S F N S F W M H W V R Q V P G
4487 Q M Q L Q E S G P G L V K P S E T L S L S C S V S G A S A S S G Y Y N W V R Q T P G
Kabat Number 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 52a 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 82a
6078 Q G P E W M G W M N A N S G N T G Y A Q K F Q G R V T L T G D T S I S T A Y M E L S
6263 Q G P E W M G W M N A N S G N T G Y A Q K F Q G R V T L T G D T S I S T A Y M E L S
4450 Q G P E W M G W M N P N S Y N T G Y G Q K F Q G R V T M T W D S S M S T A Y M E L S
6297 Q G L E W M G W M N P N S G N T N Y A Q R F Q G R L T M T K N T S I N T A Y M E L S
6239 Q G L E W M G W M N P S S G R T G Y A P K F R G R V T M T R S T S I S T A Y M E L S
6232 R G L E W V S S I T K N S D S L Y Y A D S V K G R F T I S R D N A G N S L Y L Q M N
6259 K G L E W V S S I D S S S R Y L Y Y A D S V K G R F T I S R D N A Q N S L Y L Q M S
6292 K G L E W V S S I D S S S R Y R Y Y T D S V K G R F T I S R D N A Q N S L Y L Q M S
4462 K G L Q W V S T I I G I D D T T H Y A D S V R G R F T V S R D T S K N M V Y L Q M N
6265 K G L E W L S V V T G H S Y R T H Y A D S V K G R F I I S R D N S K N T L F L Q M N
6253 K G L E W V S Y I S . S I E T I Y Y A D S V K G R F T I S R D N A K N S L Y L Q M N
4497 K G L V W I S F T N N E G T T T A Y A D S V R G R F I I S R D N A K N T L Y L E M N
4487 G G L E W I A Y I L . S G A H T D I K A S L G S R V A V S V D T S K N Q V T L R L S

FIG. 17B-1



Kabat Number	82b	82c	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	100a	100b	100c	100d	100e	100f	100g	100h	100i	100j	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112
6078	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	S	S	I	L	V	R	G	A	L	G	R	Y	F	.	.	.	D	L	W	G	R	G	T	L	V	T	V	S
6263	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	G	S	S	I	L	V	R	G	A	L	G	R	Y	F	.	.	.	D	L	W	G	R	G	T	L	V	T	V	S
4450	S	L	T	S	A	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	A	V	R	G	Q	L	L	S	.	.	.	.	.	.	.	.	E	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S
6297	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	T	E	R	W	S	K	D	T	G	H	Y	Y	Y	Y	G	M	.	D	V	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S
6239	S	L	T	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	G	G	Y	Y	D	S	S	G	N	Y	H	I	S	G	L	D	V	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S
6232	S	L	R	V	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	T	L	A	A	R	I	M	A	T	.	.	.	.	.	.	.	.	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S
6259	G	L	R	V	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	D	G	D	D	I	L	S	V	Y	R	G	S	G	R	P	F	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S
6292	A	L	R	V	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	D	G	D	D	I	L	S	V	Y	Q	G	S	G	R	P	F	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S
4462	S	L	R	V	E	D	T	A	L	Y	Y	C	V	K	N	S	G	I	Y	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	F	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S
6265	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	K	R	I	W	S	Y	G	D	D	S	F	.	.	.	.	.	.	D	V	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S
6253	S	L	R	D	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	D	R	L	V	D	V	P	L	S	S	P	.	.	.	.	.	N	S	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S
4497	N	L	R	G	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	D	G	G	L	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	D	D	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S
4487	S	V	T	A	A	D	T	A	T	Y	Y	C	A	R	S	G	V	Y	S	K	Y	S	L	.	.	.	.	.	.	.	D	V	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S

Kabat Number	113	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158
6078	S	A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W
6263	S	A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W
4450	S	A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W
6297	S	A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W
6239	S	A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W
6232	S	A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W
6259	S	A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W
6292	S	A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W
4462	S	A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W
6265	S	A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W
6253	S	A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W
4497	S	A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W
4487	S	A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W

FIG. 17B-2

Eu Number	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200
6078	N	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C
6263	N	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C
4450	N	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C
6297	N	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C
6239	N	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C
6232	N	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C
6259	N	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C
6292	N	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C
4462	N	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C
6265	N	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C
6253	N	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C
4497	N	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C
4487	N	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C

Eu Number	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242
6078	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L
6263	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L
4450	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L
6297	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L
6239	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L
6232	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L
6259	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L
6292	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L
4462	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L
6265	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L
6253	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L
4497	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L
4487	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L

FIG. 17B-3

Eu Number	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284
6078	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V
6263	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V
4450	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V
6297	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V
6239	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V
6232	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V
6259	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V
6292	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V
4462	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V
6265	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V
6253	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V
4497	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V
4487	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V

Eu Number	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326
6078	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K
6263	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K
4450	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K
6297	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K
6239	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K
6232	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K
6259	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K
6292	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K
4462	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K
6265	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K
6253	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K
4497	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K
4487	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K

FIG. 17B-4

Eu Number	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368
6078	A	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L
6263	A	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L
4450	A	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L
6297	A	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L
6239	A	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L
6232	A	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L
6259	A	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L
6292	A	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L
4462	A	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L
6265	A	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L
6253	A	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L
4497	A	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L
4487	A	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L

Eu Number	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410
6078	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L
6263	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L
4450	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L
6297	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L
6239	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L
6232	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L
6259	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L
6292	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L
4462	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L
6265	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L
6253	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L
4497	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L
4487	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L

FIG. 17B-5

Eu Number	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446
6078	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G
6263	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G
4450	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G
6297	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G
6239	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G
6232	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G
6259	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G
6292	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G
4462	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G
6265	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G
6253	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G
4497	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G
4487	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G

FIG. 17B-6

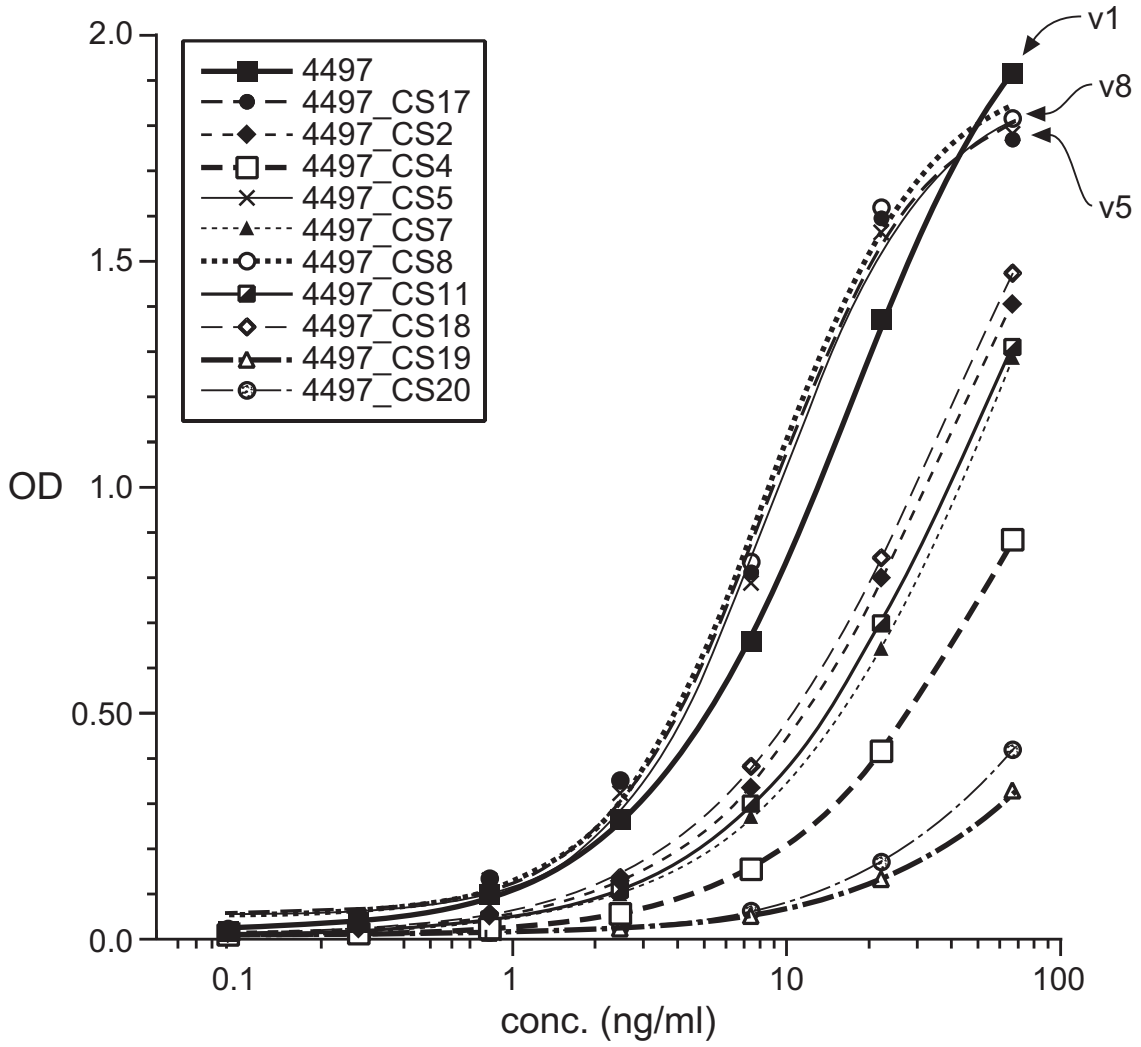


FIG. 18A

	93	94	95	96	97	98	99	101	102	ELISA
WT (v1)	A	R	G	D	G	G	L	D	D	+++
v7				D	G				E	+
v2				D	G				Y	+
v4				D	A				D	+
v19				D	A				E	+/-
v8				E	G				D	+++
v20				E	G				E	+/-
v5				A	G				D	++
v11				A	G				E	+
v18				A	G				Y	+

FIG. 18B

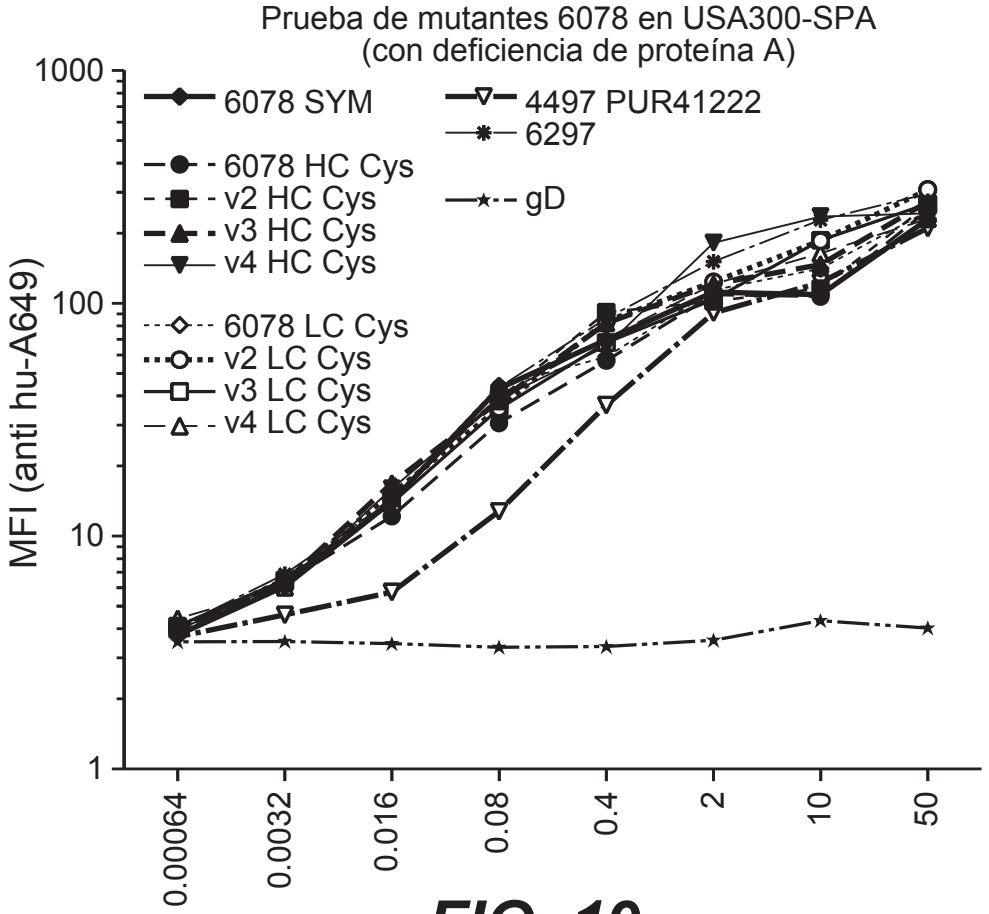

Prueba de mutantes 6078 en USA300-SPA
(con deficiencia de proteína A)
MFI (anti hu-A649)
1000
100
10
1
6078 SYM
4497 PUR41222
6297
6078 HC Cys
v2 HC Cys
v3 HC Cys
v4 HC Cys
gD
6078 LC Cys
v2 LC Cys
v3 LC Cys
v4 LC Cys
0.00064
0.0032
0.016
0.08
0.4
2
10
50

FIG. 19

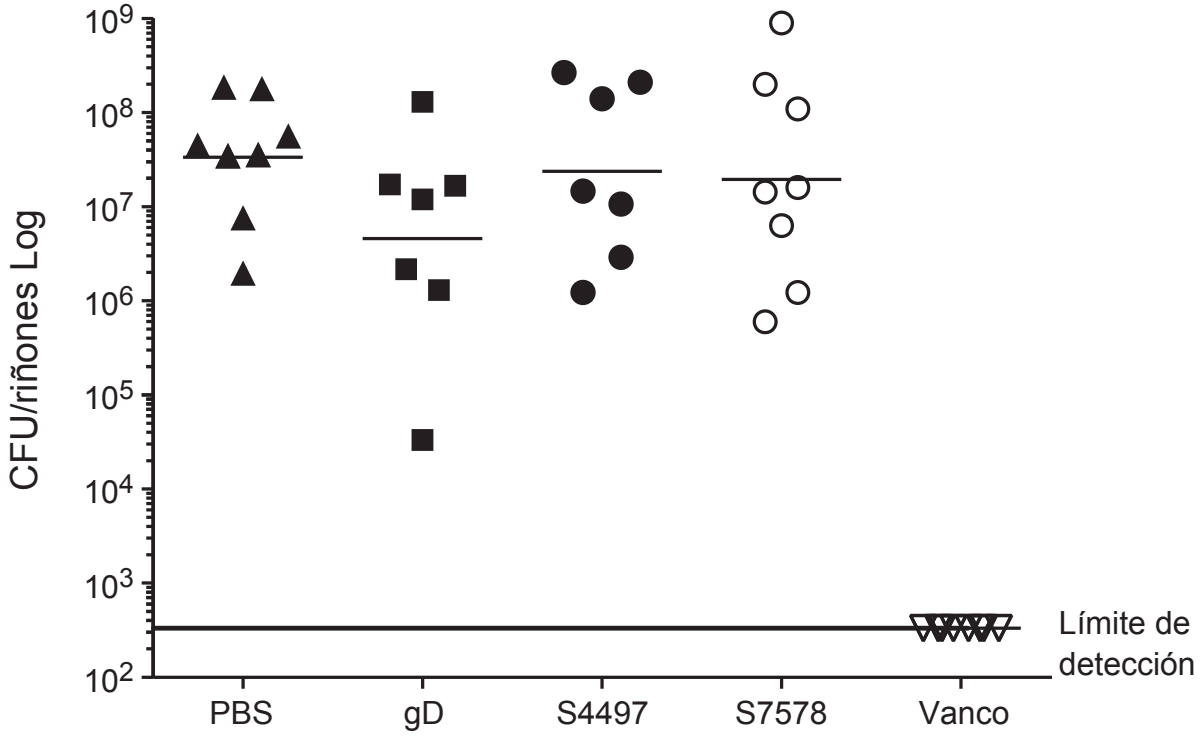

CFU/riñones Log
10^9
10^8
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
Límite de detección
PBS
gD
S4497
S7578
Vanco

FIG. 20

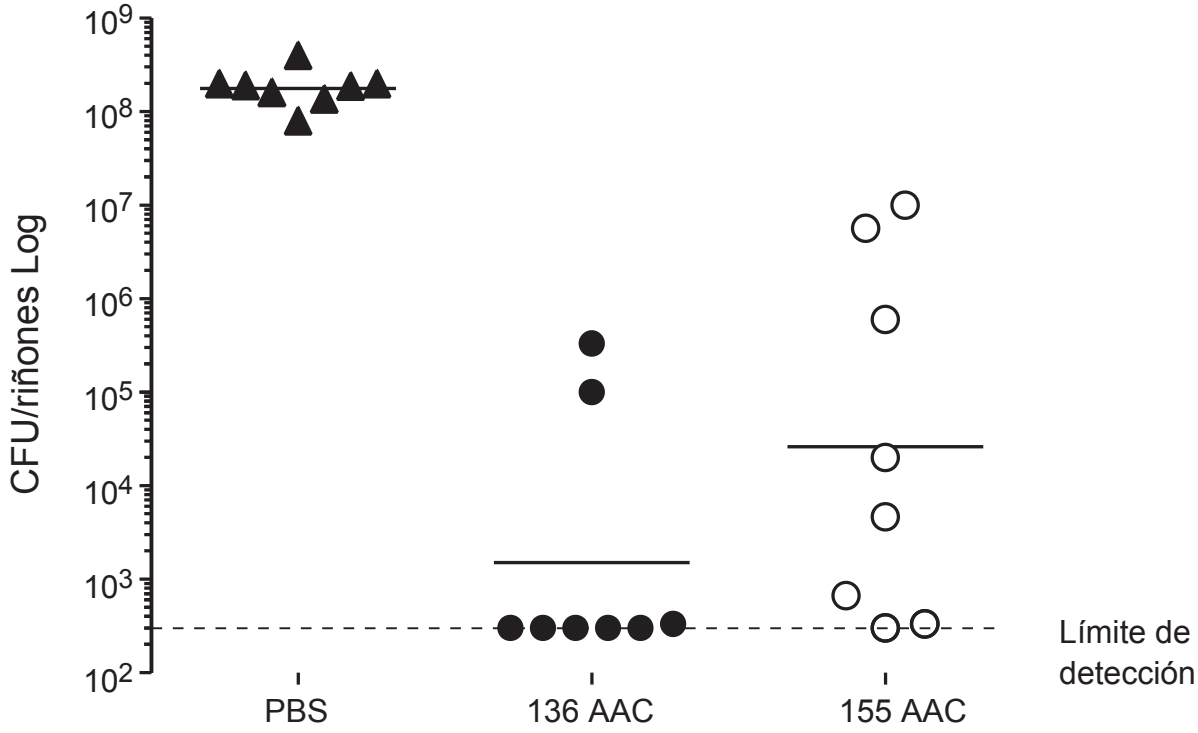

CFU/riñones Log
10^9
10^8
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
PBS
136 AAC
155 AAC
Límite de detección

FIG. 21

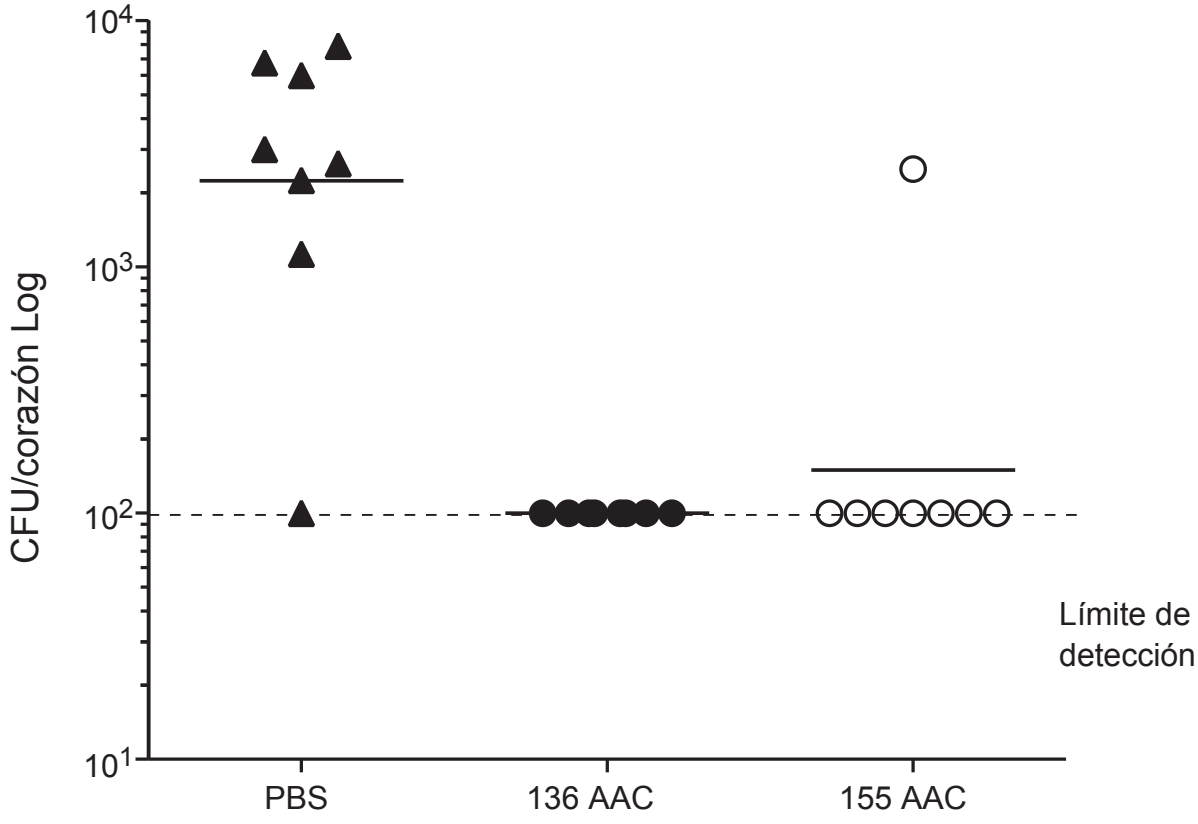

CFU/corazón Log
10^4
10^3
10^2
10^1
PBS
136 AAC
155 AAC
Límite de detección

FIG. 22

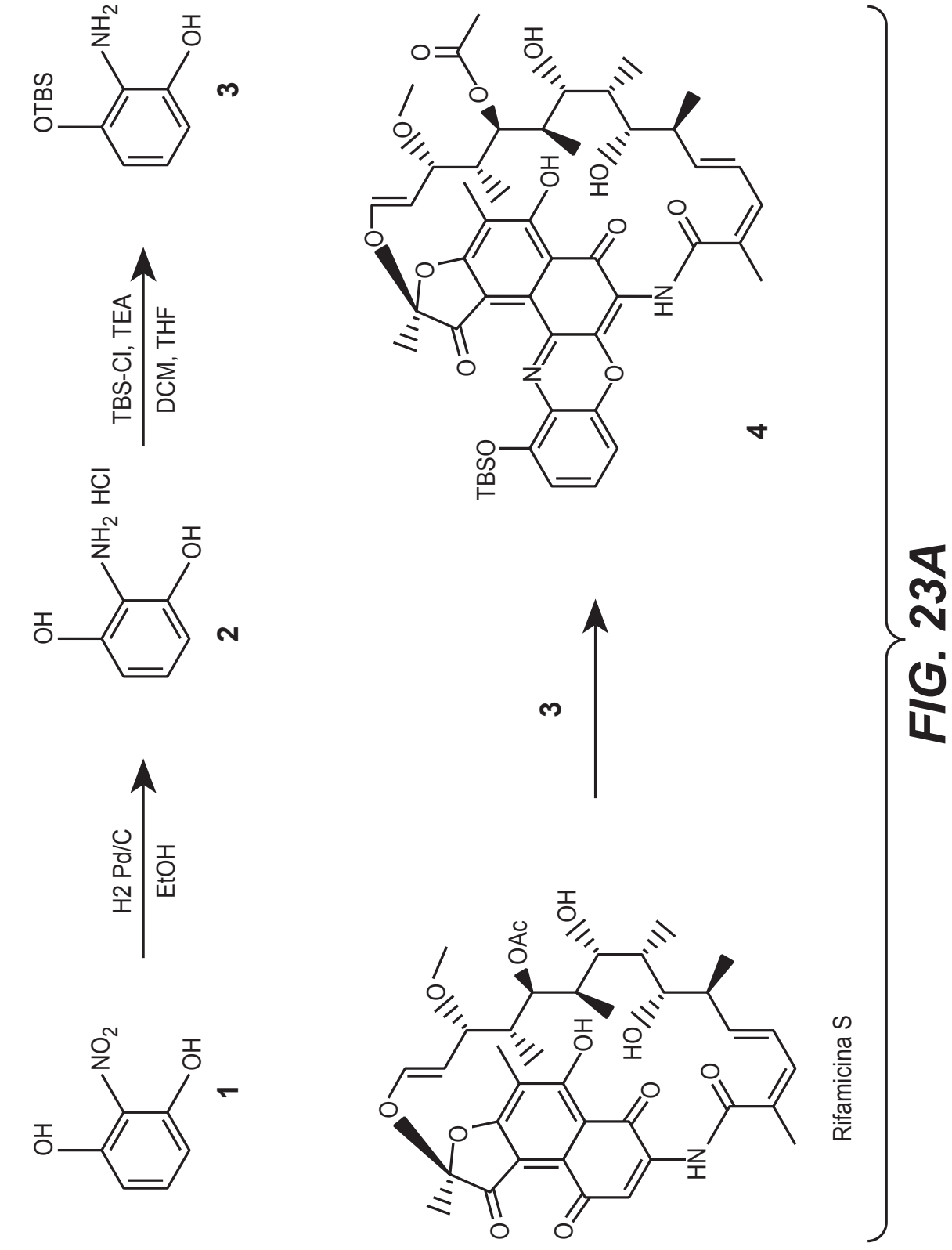


FIG. 23A

FIG. 23A
FIG. 23B

FIG. 23

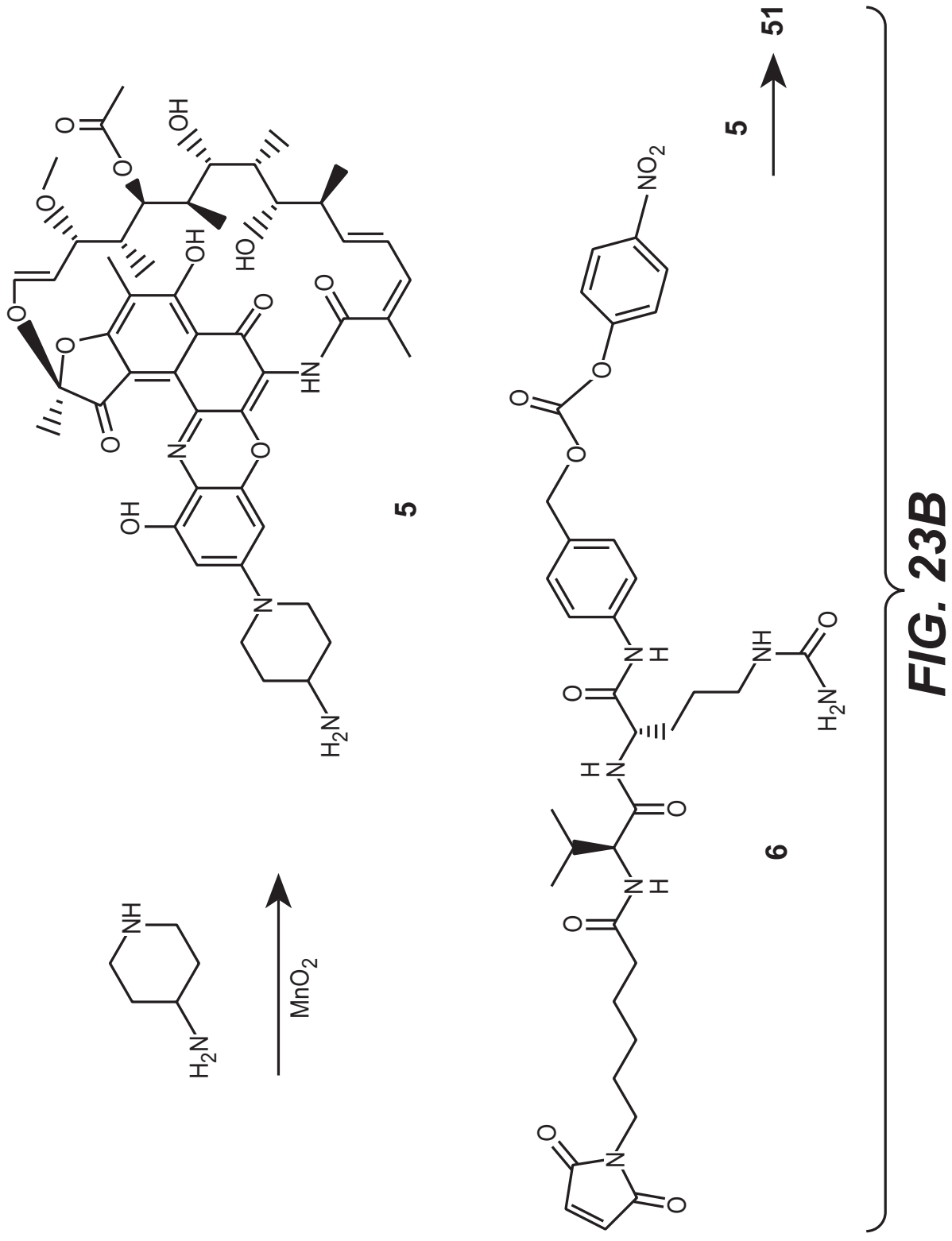


FIG. 23B

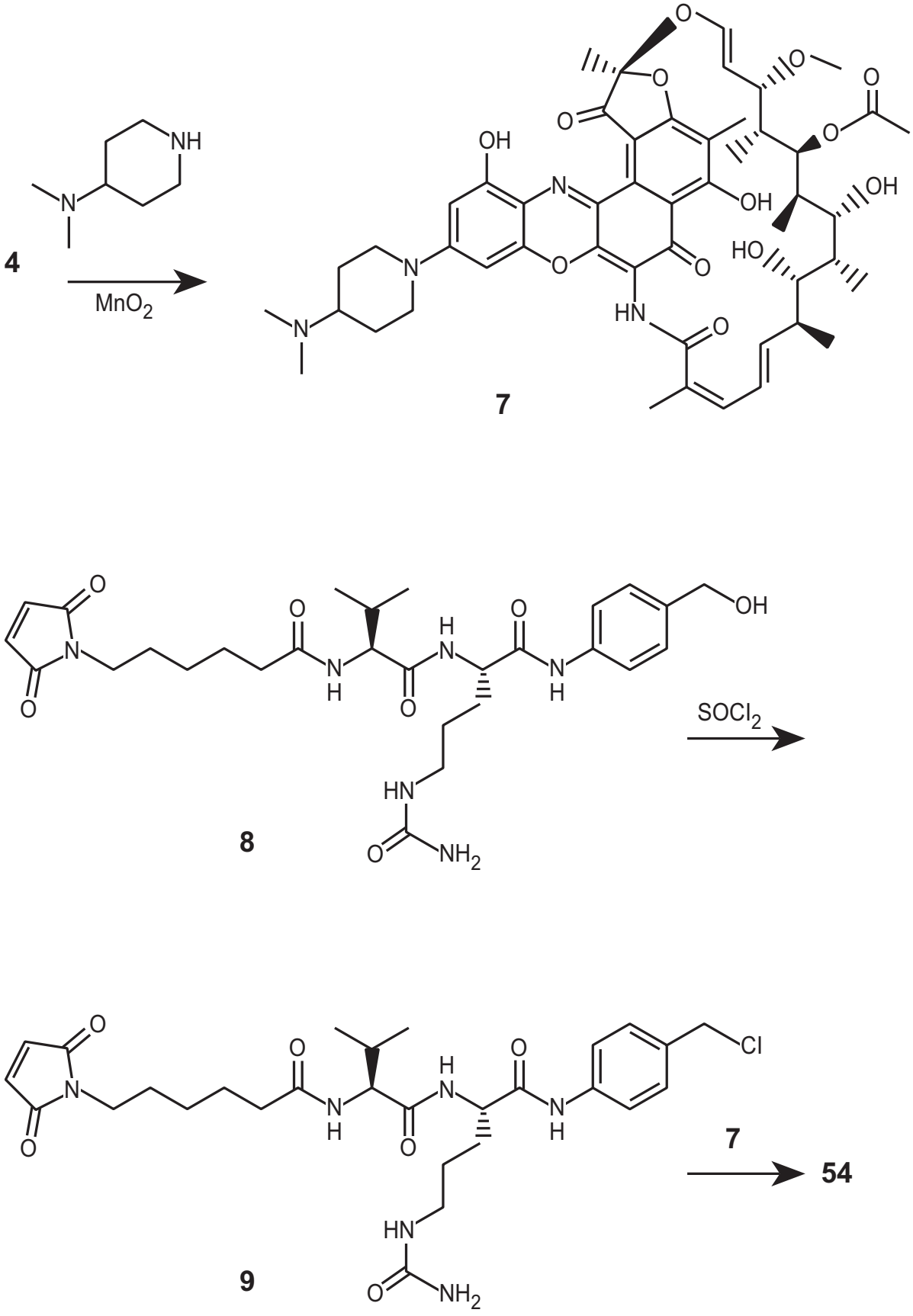
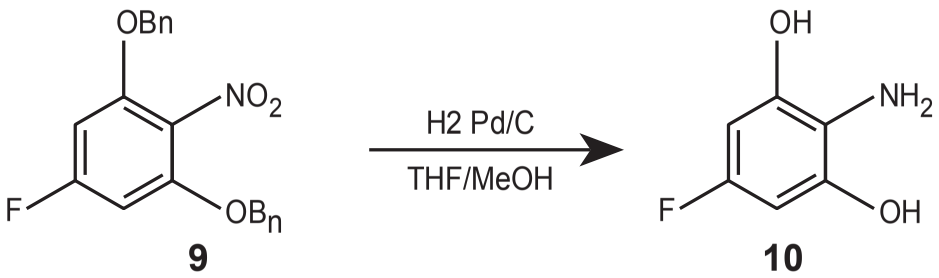


FIG. 24

FIG. 25A

FIG. 25B

FIG. 25



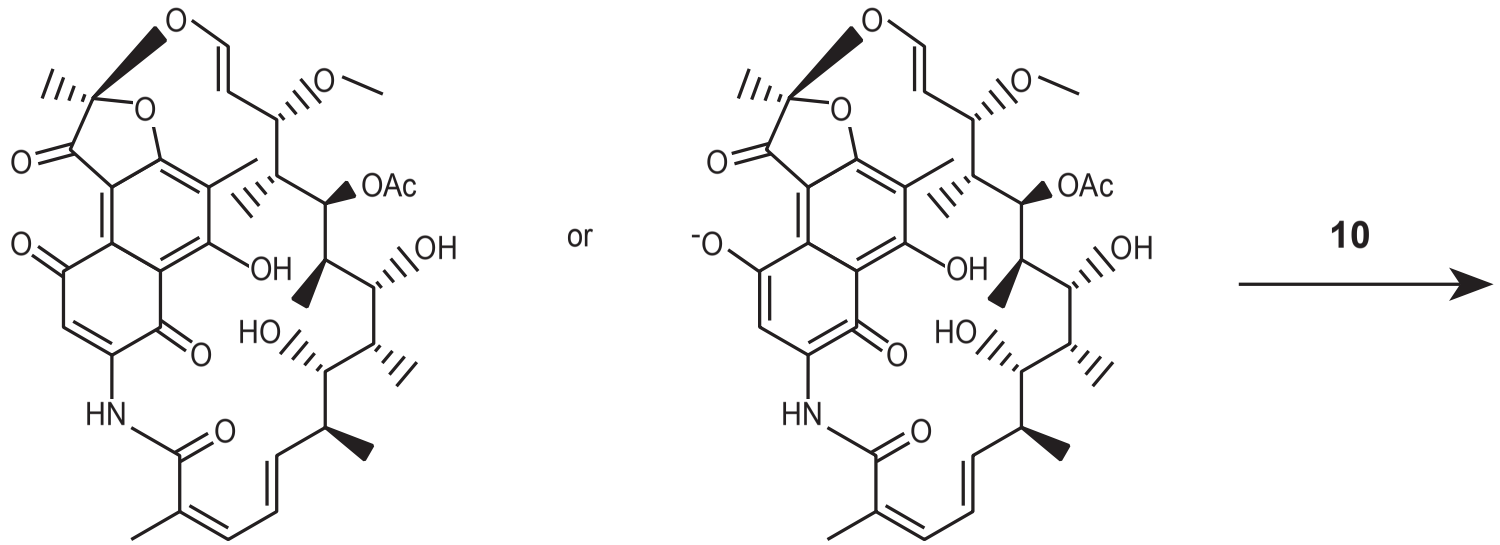


FIG. 25A

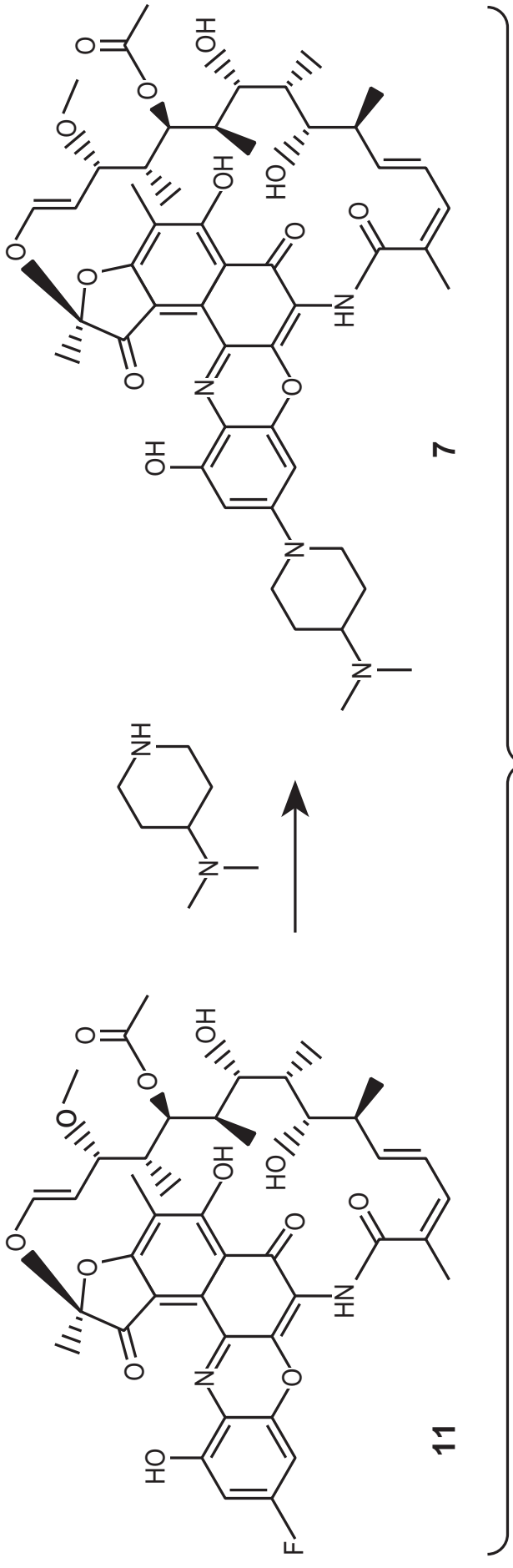


FIG. 25B

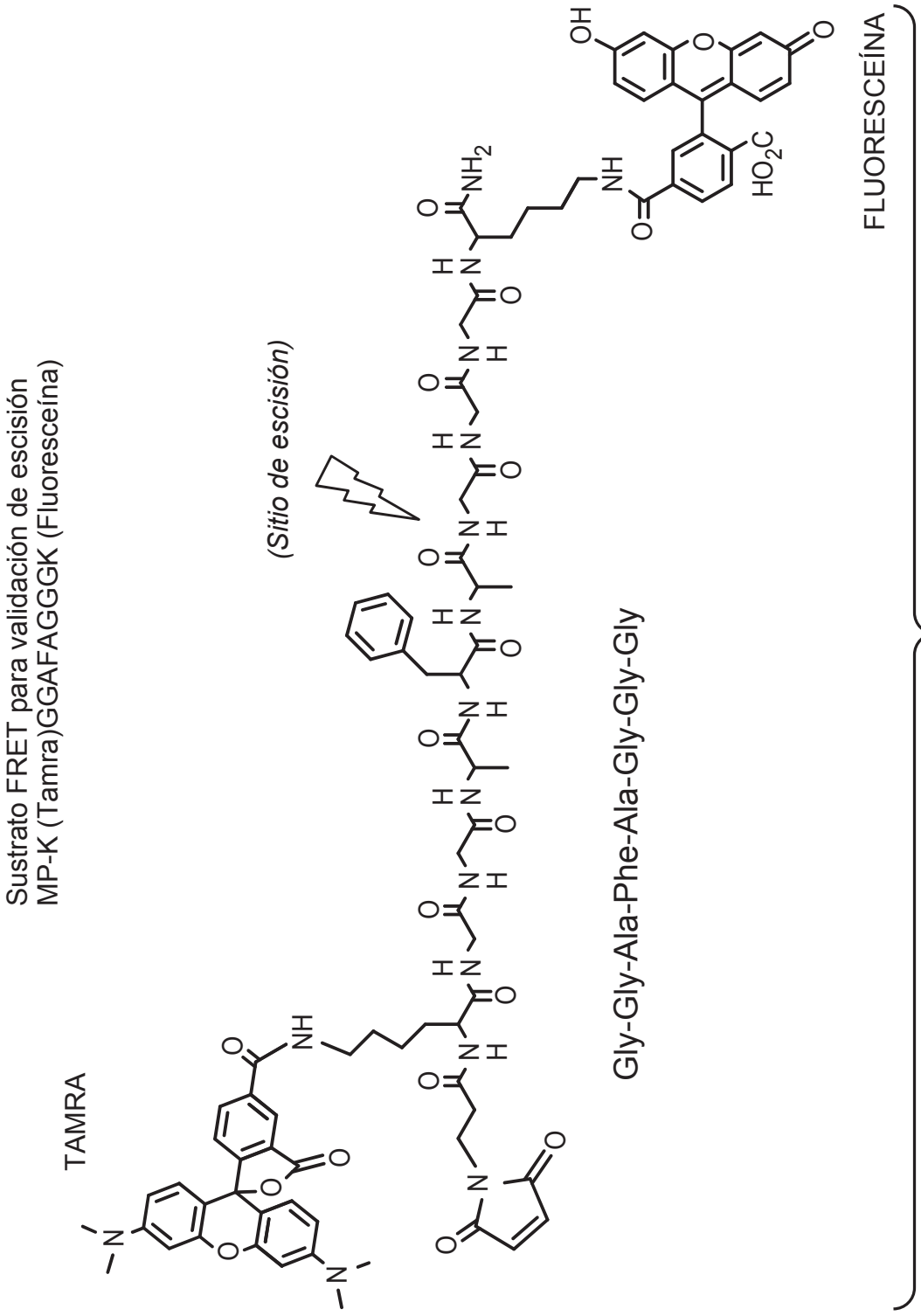

Sustrato FRET para validación de escisión
MP-K (Tamra)GGAFAGGGK (Fluoresceína)
TAMRA
(Sitio de escisión)
Gly-Gly-Ala-Phe-Ala-Gly-Gly-Gly
FLUORESCEÍNA

FIG. 26

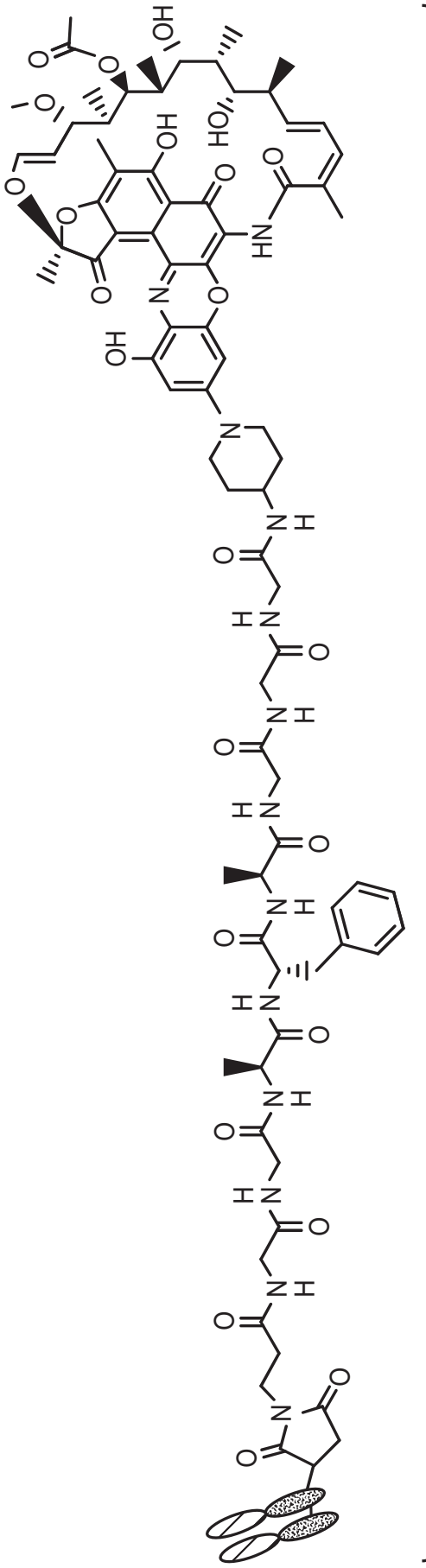


FIG. 27

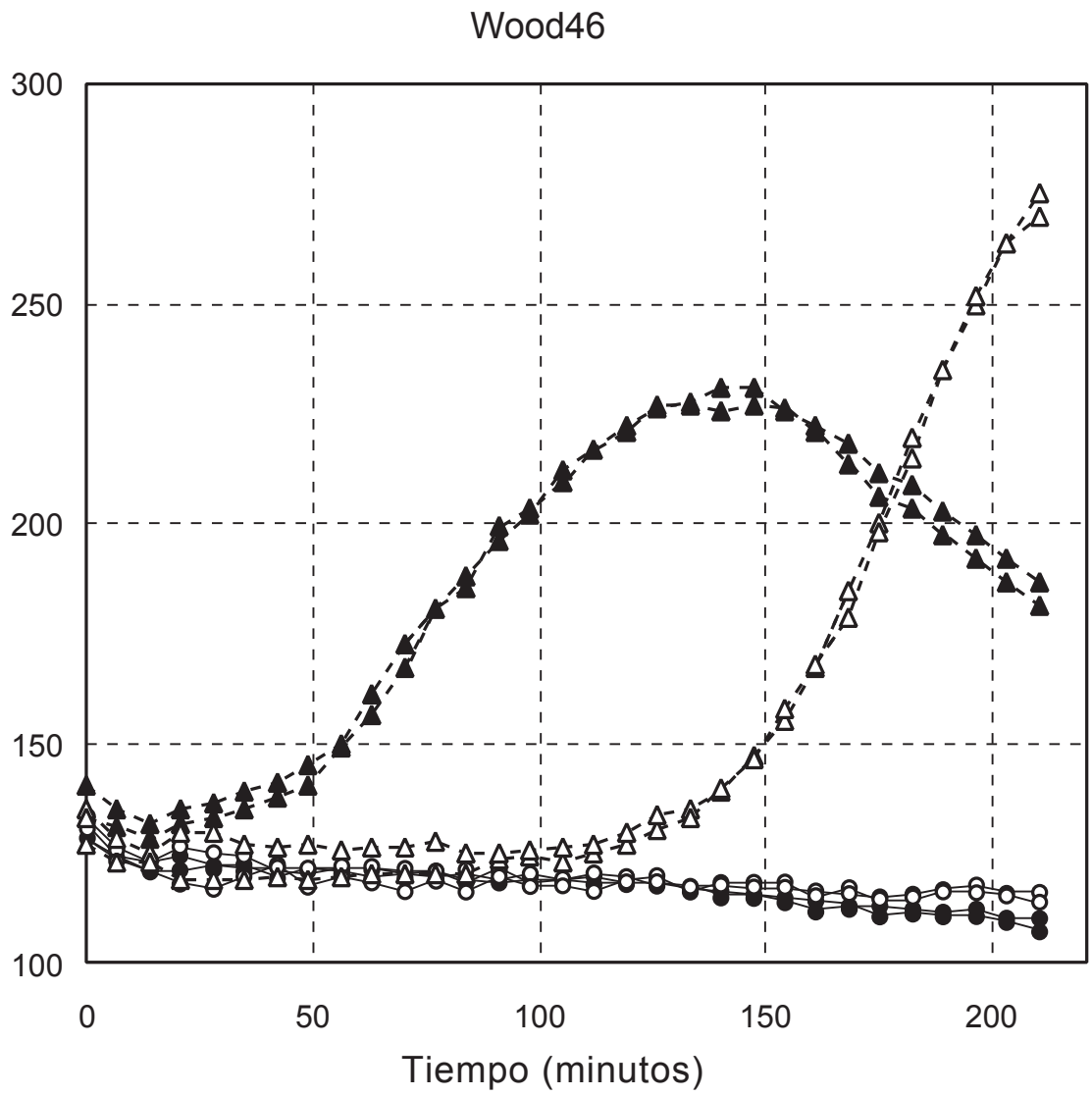

Wood46
300
250
200
150
100
0
50
100
150
200
Tiempo (minutos)
thio-S4497-MP-K(Tamra)GGAFAGGGK(Fluoresceína)
Péptido FRET, 10^8 células/ml
thio-S4497-MP-K(Tamra)GGAFAGGGK(Fluoresceína)
Péptido FRET, 10^7 células/ml

FIG. 28

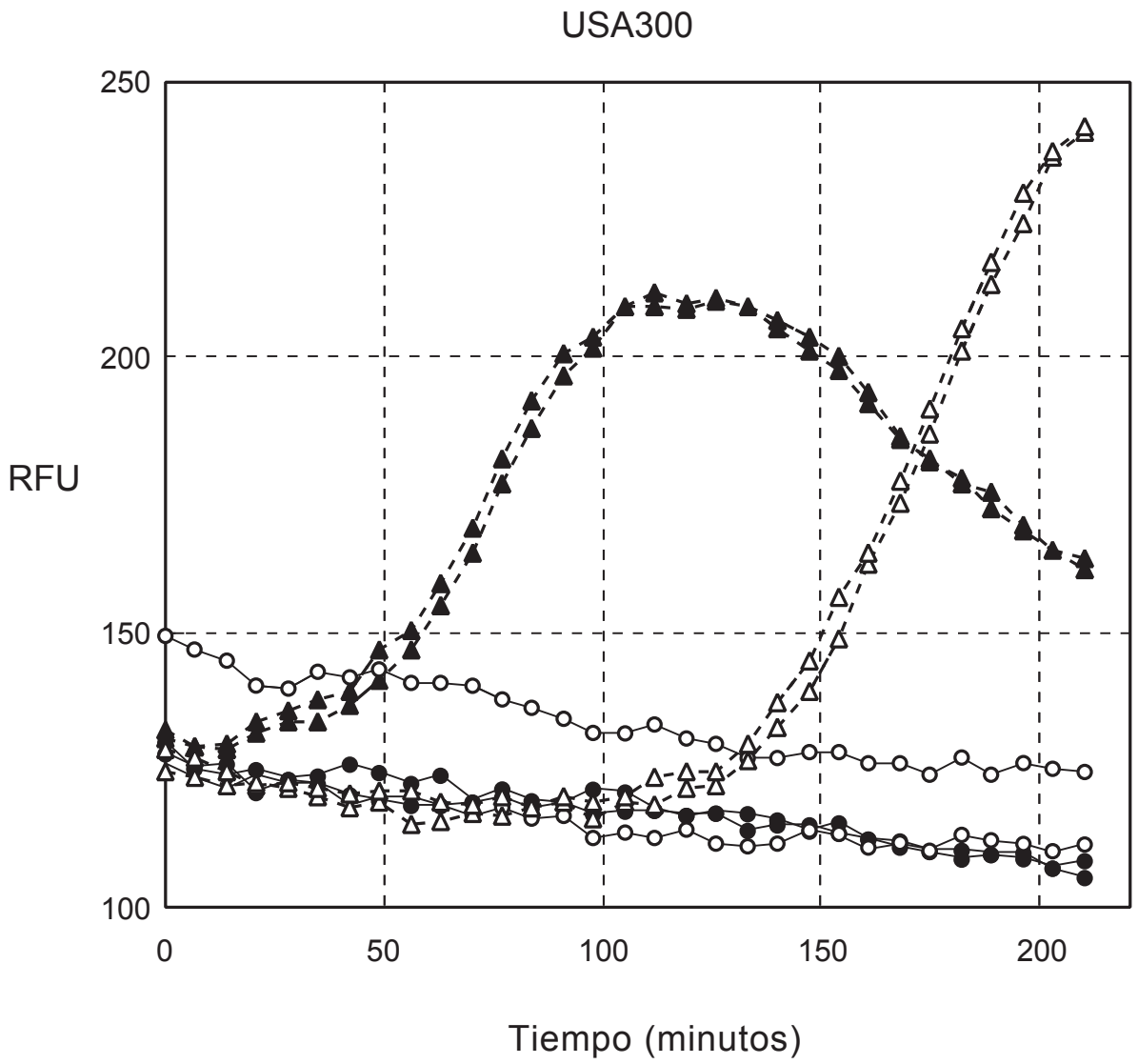
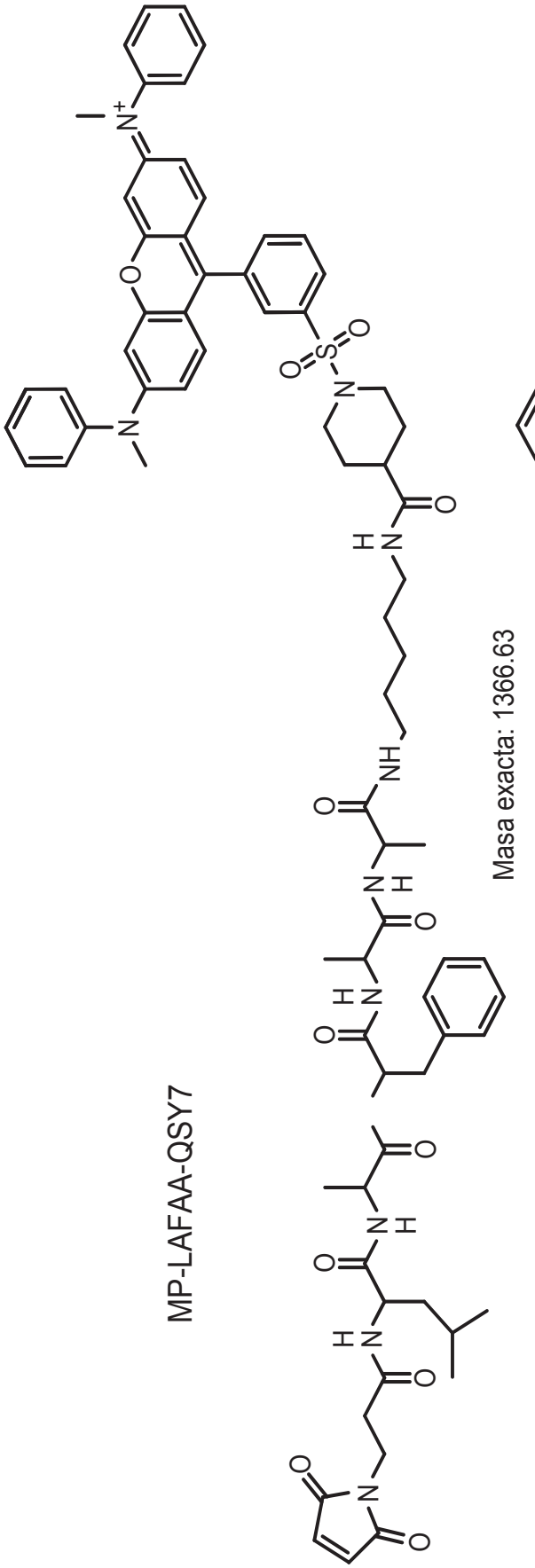
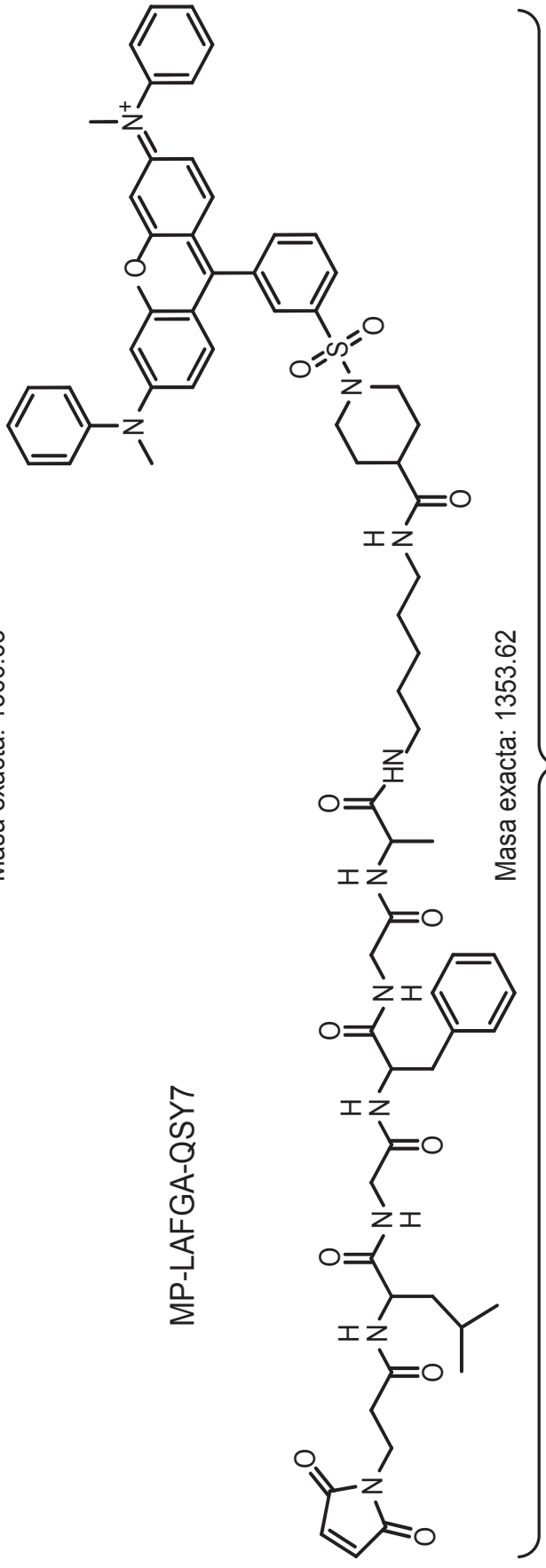

USA300
250
200
150
100
RFU
0
50
100
150
200
Tiempo (minutos)
thio-trastuzumab-MP-K(Tamra)GGAFAGGGK(Fluoresceína)
Péptido FRET, 10^8 células/ml
thio-trastuzumab-MP-K(Tamra)GGAFAGGGK(Fluoresceína)
Péptido FRET, 10^7 células/ml

FIG. 29



MP-LAFAA-QSY7

Masa exacta: 1366.63



MP-LAFGA-QSY7

Masa exacta: 1353.62

FIG. 30

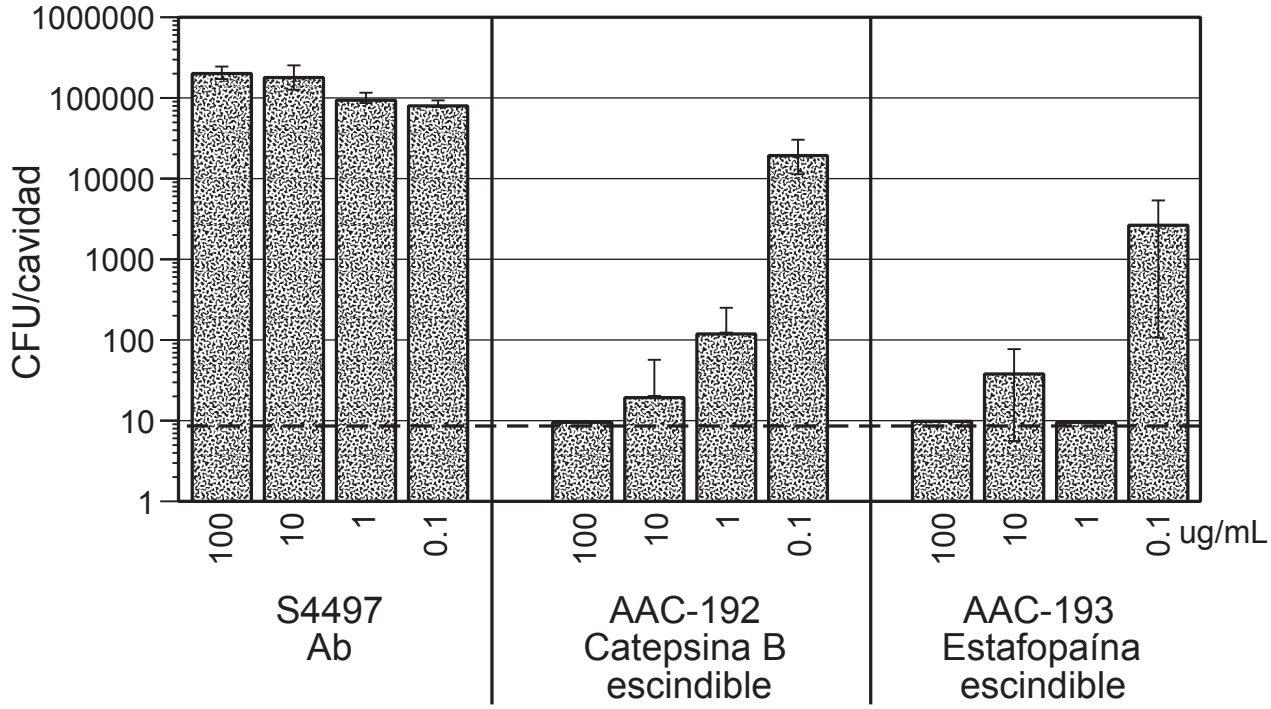

1000000
100000
10000
1000
100
10
1
CFU/cavidad
100
10
1
0.1
100
10
1
0.1
100
10
1
0.1
ug/mL
S4497
Ab
AAC-192
Catepsina B
escindible
AAC-193
Estafopaína
escindible

FIG. 31

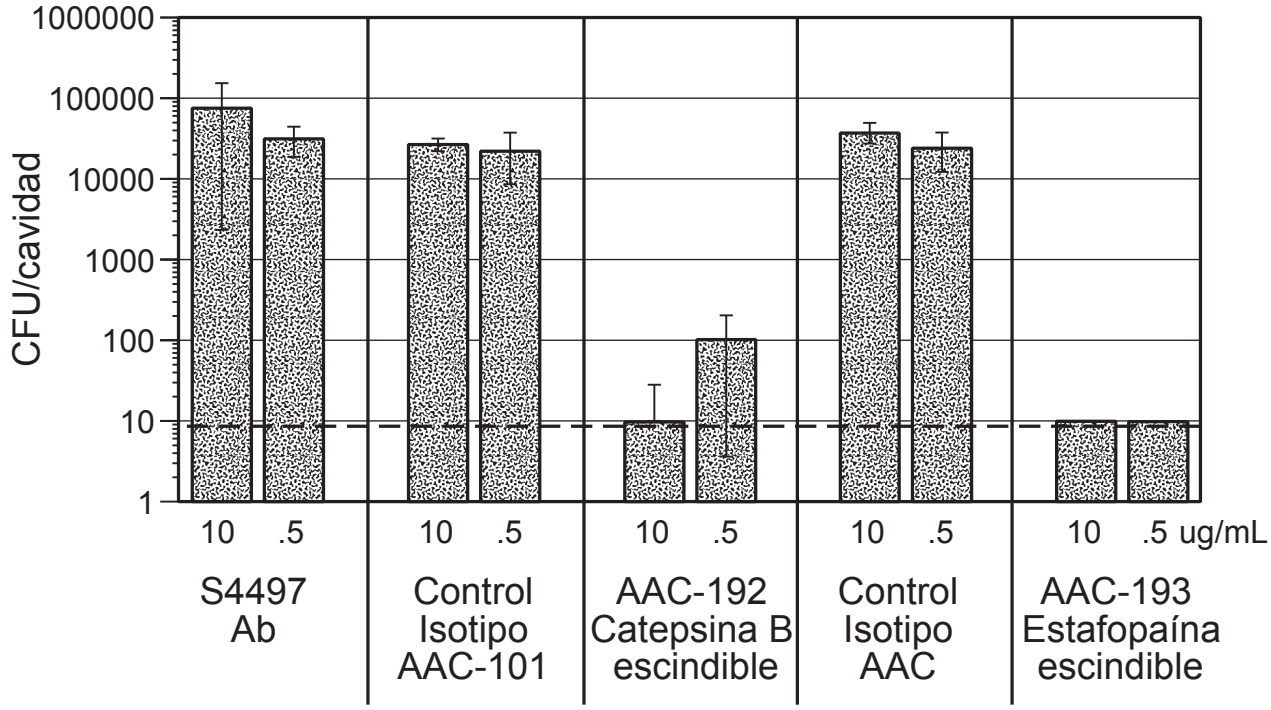

1000000
100000
10000
1000
100
10
1
CFU/cavidad
10
.5
10
.5
10
.5
10
.5
10
.5 ug/mL
S4497
Ab
Control
Isotipo
AAC-101
AAC-192
Catepsina B
escindible
Control
Isotipo
AAC
AAC-193
Estafopaína
escindible

FIG. 32

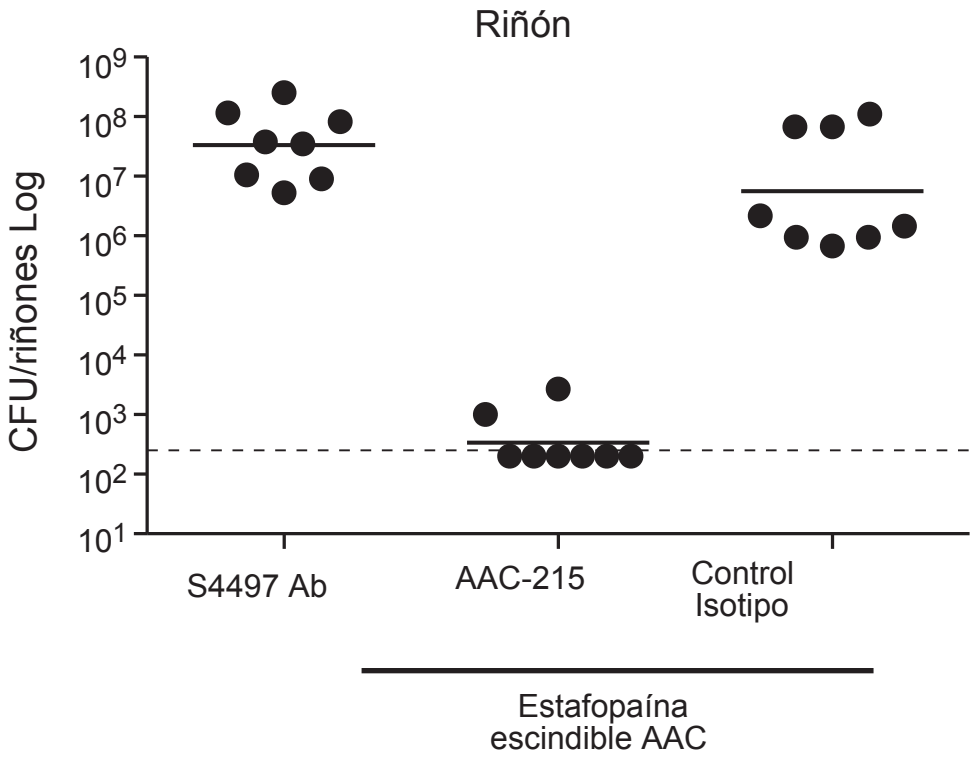

Riñón
CFU/riñones Log
10^9
10^8
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
S4497 Ab
AAC-215
Control Isotipo
Estafopaína escindible AAC

FIG. 33

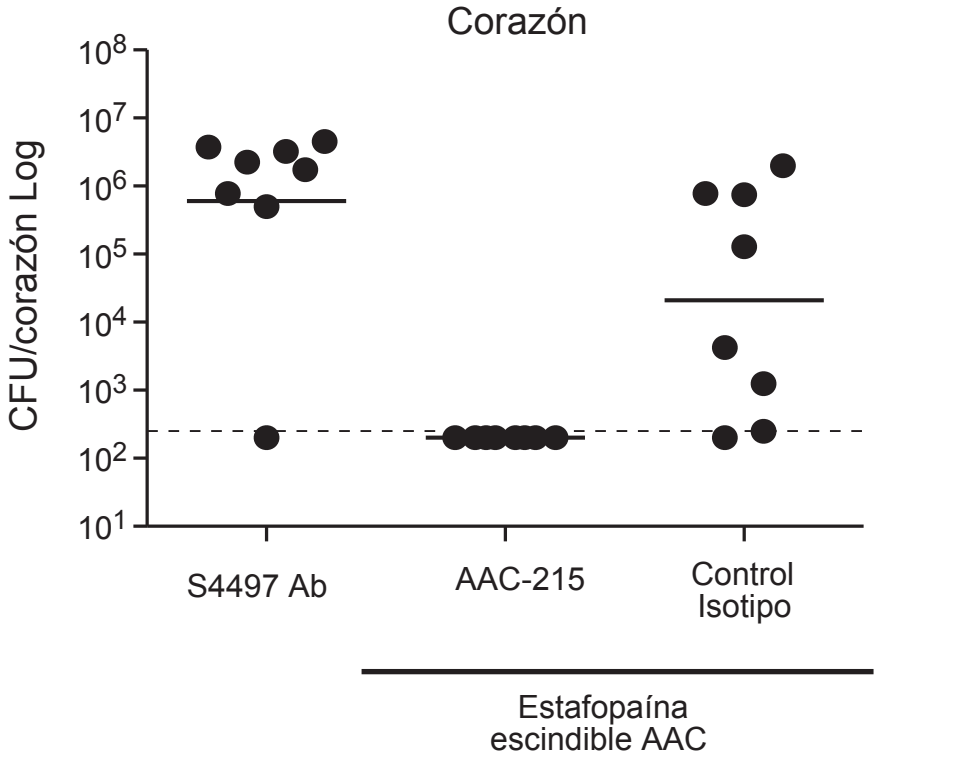

Corazón
CFU/corazón Log
10^8
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
S4497 Ab
AAC-215
Control Isotipo
Estafopaína escindible AAC

FIG. 34

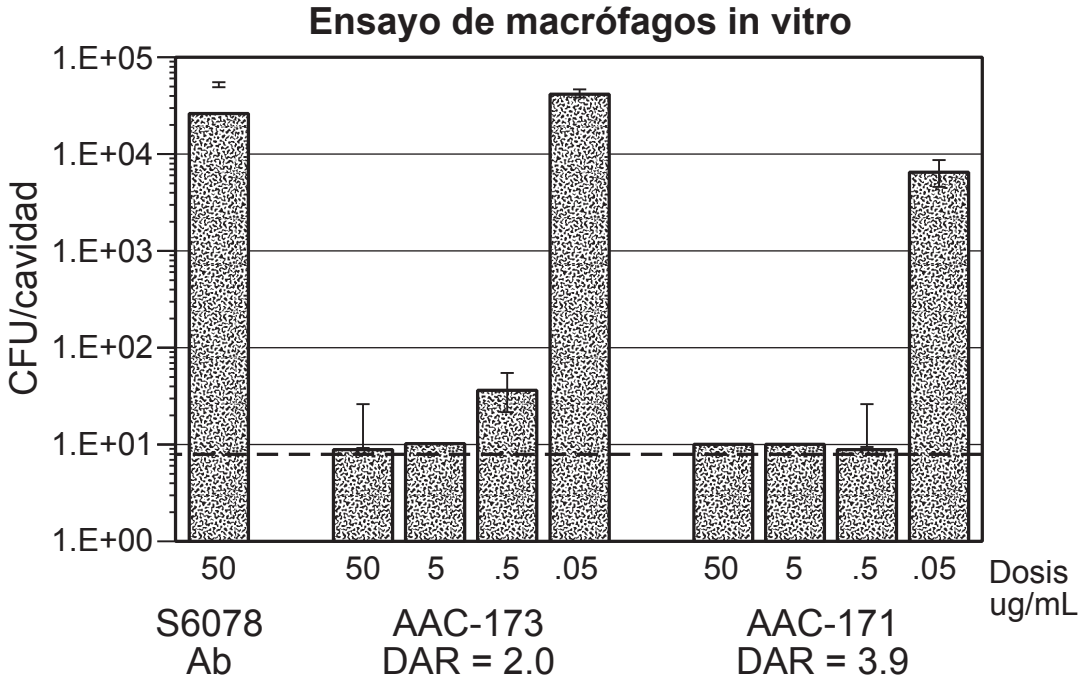

Ensayo de macrófagos in vitro
CFU/cavidad
1.E+05
1.E+04
1.E+03
1.E+02
1.E+01
1.E+00
50
50
5
.5
.05
50
5
.5
.05
Dosis ug/mL
S6078 Ab
AAC-173 DAR = 2.0
AAC-171 DAR = 3.9

FIG. 35

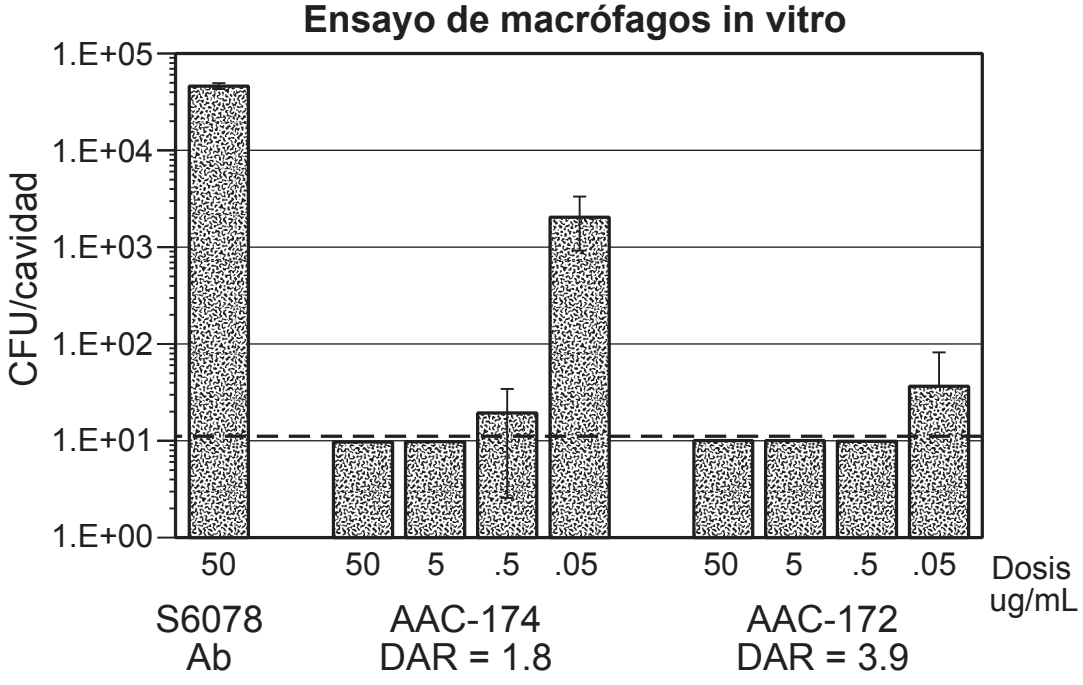

Ensayo de macrófagos in vitro
CFU/cavidad
1.E+05
1.E+04
1.E+03
1.E+02
1.E+01
1.E+00
50
50
5
.5
.05
50
5
.5
.05
Dosis ug/mL
S6078 Ab
AAC-174 DAR = 1.8
AAC-172 DAR = 3.9

FIG. 36

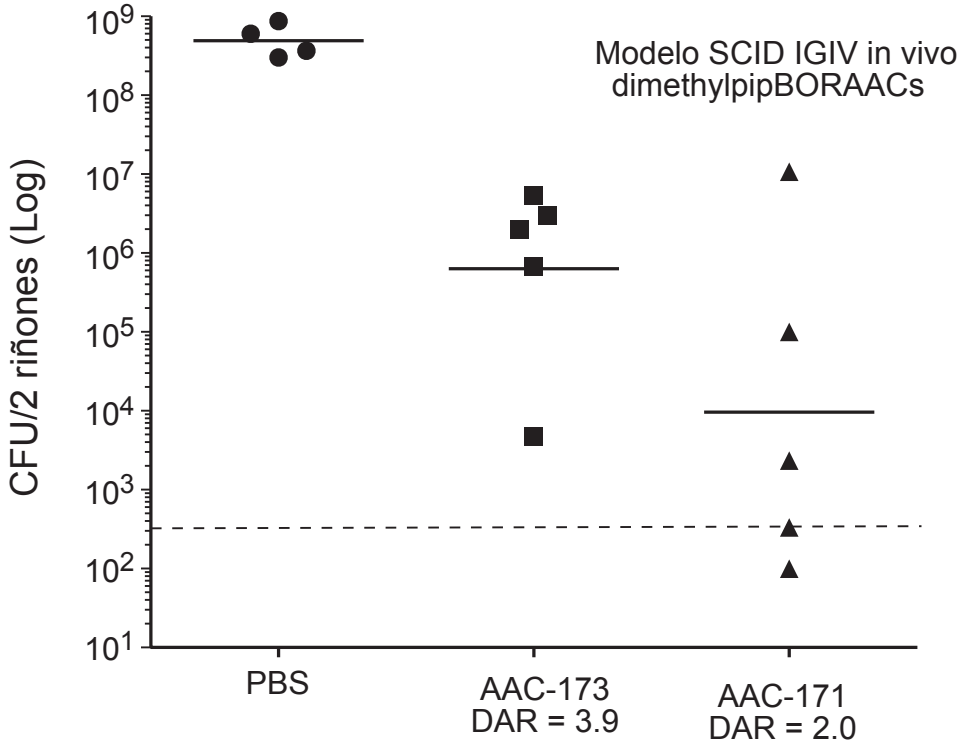

Modelo SCID IGIV in vivo
dimethylpipBORAACs
CFU/2 riñones (Log)
10^9
10^8
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
PBS
AAC-173
DAR = 3.9
AAC-171
DAR = 2.0

FIG. 37

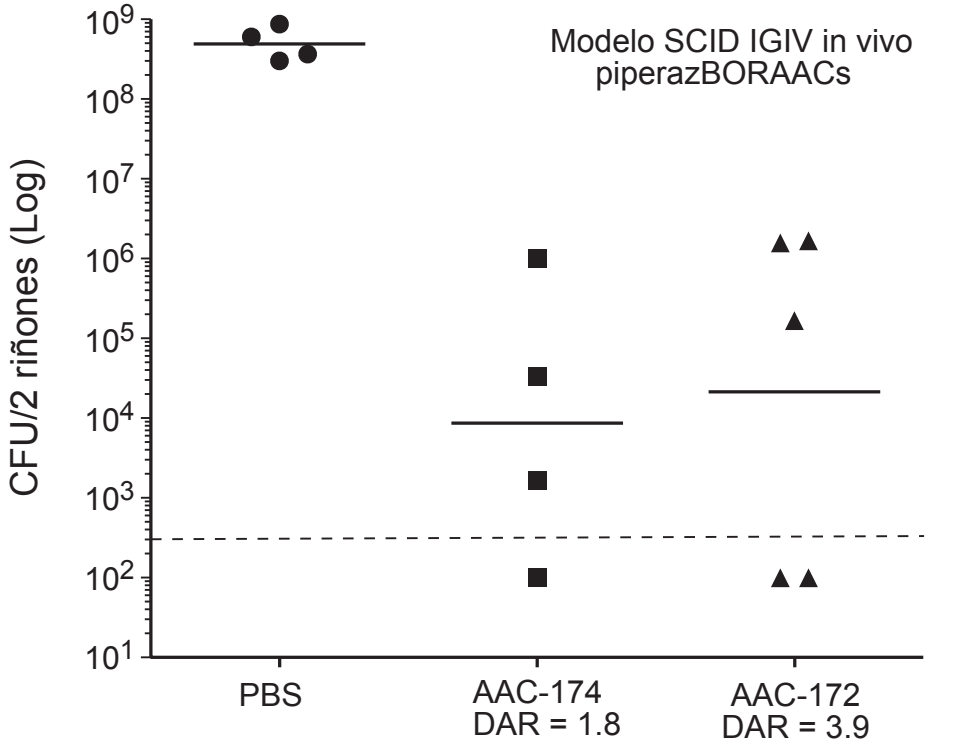

Modelo SCID IGIV in vivo
piperazBORAACs
CFU/2 riñones (Log)
10^9
10^8
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
PBS
AAC-174
DAR = 1.8
AAC-172
DAR = 3.9

FIG. 38