

ANTICUERPO ANTI-ORAI1CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a la provisión de un
5 anticuerpo anti-Orai1 más altamente activo para el
tratamiento de trastornos y enfermedades.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los canales de calcio activados por liberación de calcio
(CRAC) son un subconjunto de canales operados por
10 almacenamiento (SOC) que se abren en respuesta al agotamiento
del calcio almacenado en el retículo endoplásmico
intracelular, son responsables por la entrada de calcio
extracelular a células no excitables particulares,
particularmente, células del sistema inmunitario incluyendo
15 células T y mastocitos, y la activación resultante de las
células. Los inhibidores de la actividad del canal CRAC son
conocidos en la técnica, y su identificación y potenciales
terapéuticos se describen por Feske y colaboradores
(Literatura no de Patente 1 y 2).

20 El Orai1 (CRACM1: modulador 1 de calcio activado por
liberación de calcio, proteína transmembrana 142A: TMEM142A),
una proteína transmembrana de 4 pasos compuesta de 301
residuos de aminoácidos, se ha identificado como un
componente que constituye la subunidad formadora de poros de
25 los canales CRAC al formar un homotetrámero (Literatura de

Patente 1 y Literaturas no de Patente 3 a 5). La familia del gen Orai comprende el gen Orai1 humano junto con los genes Orai2 humano y Orai3 humano que tienen cada uno 90% o más de homología al gen Orai1 humano (Literatura no de Patente 6).

5 En algunos casos, la posibilidad de formar un heterotetrámero o un heterohexámero que contiene la proteína Orai2 y/o Orai3 y Orai1 también se han reportado (Literatura no de Patente 7 y 8). El Orai1 está constituido por regiones citoplásmicas N-terminal y C-terminal que se acoplan a la STIM-1 (molécula 1
10 de interacción estromal) o STIM-2, que es una proteína que detecta el agotamiento del calcio almacenado en el retículo endoplásmico intracelular, y 4 dominios transmembrana, el cebador dominio de bucle extracelular que se compone de aproximadamente 20 residuos de aminoácidos, y el segundo
15 dominio de bucle extracelular se compone de aproximadamente 40 residuos de aminoácidos (Literatura no de Patente 9). La secuencia de ADN y la secuencia de aminoácidos de Orai1 son disponibles en una base de datos pública y pueden ser referidas bajo, por ejemplo, Nos. de Acceso NM_032790 y
20 NP_116179 (NCBI).

Se ha encontrado que un defecto congénito en la función del gen Orai1 humano elimina la actividad del canal CRAC y cancela las respuestas del cuerpo a inmunógenos, dando por resultado varias afecciones inmunodeficientes. Por lo tanto,
25 la función molecular de Orai1 se ha aprobado esencial para la

activación de los canales CRAC (Literatura no de Patente 10 y 11). De esta manera, la función de los anticuerpos de bloqueo que fijan como diana la molécula Orai1 puede servir como inhibidores de la actividad del canal CRAC.

5 En vista de la información que sugiere que los inhibidores de la actividad del canal CRAC se pueden usar para tratar pacientes con enfermedades inmunológicas, enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias, rechazo a trasplante de células u órganos, trombosis, cánceres, etc.,
10 (Literatura no de Patente 12), se han hecho intentos para obtener anticuerpos anti-Orai1 con el objetivo de inhibir la función molecular de Orai1, y sus efectos se han estudiado (Literatura de Patente 2 y 3 y Literatura no de Patente 13 y 14). Aunque esta literatura indica que cada anticuerpo solo
15 inhibe la activación de células T, la actividad inhibidora todavía no es suficientemente fuerte. La aplicación clínica de estos anticuerpos como agentes biológicos que fijan como diana Orai1 no pueden cumplir con las necesidades médicas en términos de la necesidad por dosis altas o administración
20 frecuente, métodos de administración limitada, o similares.

Lista de Referencias

Literatura de Patente

Literatura de Patente 1: Publicación Internacional No. W007/081804

25 Literatura de Patente 2: Publicación Internacional No.

W011/063277

Literatura de Patente 3: Publicación Internacional No.
W013/091903

Literatura no de Patente

5 Literatura no de Patente 1: Feske S, Nature Rev.
Immunol. 7, p. 690-702 (2007)

Literatura no de Patente 2: Derler I, y colaboradores,
Expert Opin. Drug Discovery 3 (7), p. 787-800 (2008)

Literatura no de Patente 3: Prakriya M, y colaboradores,
10 Nature 443, p. 230-233 (2006)

Literatura no de Patente 4: Vig M, y colaboradores,
Science 312, p. 1220-1223 (2006)

Literatura no de Patente 5: Park CY, y colaboradores,
Cell 136, p. 876-890 (2008)

15 Literatura no de Patente 6: Mercer JC, y colaboradores,
J. Biol. Chem. 281, p. 24979-24990 (2006)

Literatura no de Patente 7: Gwack Y, y colaboradores, J.
Biol. Chem. 282, p. 16232-16243 (2007)

Literatura no de Patente 8: Hou X, y colaboradores,
20 Science 338, p. 1308-1313 (2012)

Literatura no de Patente 9: Vig M, y colaboradores,
Curr. Biol. 16, p. 2073-2079 (2006)

Literatura no de Patente 10: Feske S, Nature 441, p.
179-185 (2006)

25 Literatura no de Patente 11: McCarl CA, y colaboradores,

J. Allergy Clin. Immunol. 124, p. 1311-1318 (2009)

Literatura no de Patente 12: McCarl CA, y colaboradores,

J. Immunol. 185, p. 5845-5858 (2010)

Literatura no de Patente 13: Lin F, y colaboradores, J.

5 Pharmacol. Exp. Ther. 345, p. 225-238 (2013)

Literatura no de Patente 14: Cox JH, y colaboradores,

PLOS ONE 8 (12), e82944 (2013)

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Problema Técnico

10 Un objetivo de la presente invención es proporcionar un agente terapéutico y/o profiláctico para rechazos de trasplantes, enfermedades inmunológicas, enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias trombosis, cánceres, etc.

15 Solución al Problema

Los presentes inventores han obtenido anticuerpos anti-Orai1 de rata para el propósito de buscar sustancias que tengan un efecto terapéutico y/o profiláctico en rechazos de trasplantes, enfermedades inmunológicas, enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias, trombosis, o cánceres. Los anticuerpos anti-Orai1 de rata obtenidos se han humanizado, y la CDRs, estructuras, y regiones variables de los anticuerpos humanizados se han modificado. De esta manera, se ha llevado a cabo la presente invención.

25 Específicamente, la presente invención abarca los

siguientes aspectos:

(1) Un anticuerpo o un fragmento de ligación a antígeno del anticuerpo que se liga específicamente a la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2, en donde la
5 secuencia de cadena pesada comprende una región variable que tiene CDRH1, CDRH2, y CDRH3, en donde la CDRH1 consiste de la secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO: 102, la CDRH2 consiste de una secuencia de aminoácido representada por cualquiera de SEQ ID NOs: 104, 106, 107, y 108, y la
10 CDRH3 consiste de una secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO: 109 o 110; y

la secuencia de cadena ligera comprende una región variable que tiene CDRL1, CDRL2, y CDRL3, en donde la CDRL1 consiste de una secuencia de aminoácido representada por
15 cualquiera de SEQ ID NOs: 93, 94, y 95, la CDRL2 consiste de una secuencia de aminoácido representada por cualquiera de SEQ ID NOs: 96, 97, y 98, y la CDRL3 consiste de la secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO: 101.

(2) El anticuerpo o fragmento de ligación a antígeno
20 del anticuerpo de acuerdo con (1), en donde la secuencia de cadena pesada comprende una región variable que tiene CDRH1, CDRH2, y CDRH3, en donde la CDRH1 consiste de la secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO: 102, la CDRH2 consiste de la secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO:
25 106, y la CDRH3 consiste de la secuencia de aminoácido

representada por SEQ ID NO: 110; y

La secuencia de cadena ligera comprende una región variable que tiene CDRL1, CDRL2, y CDRL3, en donde la CDRL1 consiste de la secuencia de aminoácido representada por SEQ
5 ID NO: 93, la CDRL2 consiste de la secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO: 96, y la CDRL3 consiste de la secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO: 101.

(3) El anticuerpo o fragmento de ligación a antígeno del anticuerpo de acuerdo con (1), en donde la secuencia de
10 cadena pesada comprende una región variable que tiene CDRH1, CDRH2, y CDRH3, en donde la CDRH1 consiste de la secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO: 102, la CDRH2 consiste de la secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO: 106, y la CDRH3 consiste de la secuencia de aminoácido
15 representada por SEQ ID NO: 110; y

la secuencia de cadena ligera comprende una región variable que tiene CDRL1, CDRL2, y CDRL3, en donde la CDRL1 consiste de la secuencia de aminoácido representada por SEQ
ID NO: 94, la CDRL2 consiste de la secuencia de aminoácido
20 representada por SEQ ID NO: 97, y la CDRL3 consiste de la secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO: 101.

(4) El anticuerpo o fragmento de ligación a antígeno del anticuerpo de acuerdo con (1), en donde la secuencia de cadena pesada comprende una región variable que tiene CDRH1,
25 CDRH2, y CDRH3, en donde la CDRH1 consiste de la secuencia de

aminoácido representada por SEQ ID NO: 102, la CDRH2 consiste de la secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO: 106, y la CDRH3 consiste de la secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO: 110; y

5 la secuencia de cadena ligera comprende una región variable que tiene CDRL1, CDRL2, y CDRL3, en donde la CDRL1 consiste de la secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO: 95, la CDRL2 consiste de la secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO: 98, y la CDRL3 consiste de la
10 secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO: 101.

(5) El anticuerpo o fragmento de ligación a antígeno del anticuerpo de acuerdo con (1), en donde la secuencia de cadena pesada comprende una región variable que tiene CDRH1, CDRH2, y CDRH3, en donde la CDRH1 consiste de la secuencia de
15 aminoácido representada por SEQ ID NO: 102, la CDRH2 consiste de la secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO: 107, y la CDRH3 consiste de la secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO: 110; y

la secuencia de cadena ligera comprende una región
20 variable que tiene CDRL1, CDRL2, y CDRL3, en donde la CDRL1 consiste de la secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO: 93, la CDRL2 consiste de la secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO: 96, y la CDRL3 consiste de la secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO: 101.

25 (6) El anticuerpo o fragmento de ligación a antígeno

del anticuerpo de acuerdo con (1), en donde la secuencia de cadena pesada comprende una región variable que tiene CDRH1, CDRH2, y CDRH3, en donde la CDRH1 consiste de la secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO: 102, la CDRH2 consiste
5 de la secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO: 108, y la CDRH3 consiste de la secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO: 110; y

la secuencia de cadena ligera comprende una región variable que tiene CDRL1, CDRL2, y CDRL3, en donde la CDRL1
10 consiste de la secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO: 93, la CDRL2 consiste de la secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO: 96, y la CDRL3 consiste de la secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO: 101.

(7) El anticuerpo o fragmento de ligación a antígeno
15 del anticuerpo de acuerdo con (1), en donde la secuencia de cadena pesada comprende una región variable que tiene CDRH1, CDRH2, y CDRH3, en donde la CDRH1 consiste de la secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO: 102, la CDRH2 consiste de la secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO:
20 104, y la CDRH3 consiste de la secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO: 109; y

la secuencia de cadena ligera comprende una región variable que tiene CDRL1, CDRL2, y CDRL3, en donde la CDRL1 consiste de la secuencia de aminoácido representada por SEQ
25 ID NO: 93, la CDRL2 consiste de la secuencia de aminoácido

representada por SEQ ID NO: 96, y la CDRL3 consiste de la secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO: 101.

(8) El anticuerpo o fragmento de ligación a antígeno del anticuerpo de acuerdo con (1) o (2), en donde el
5 anticuerpo comprende una secuencia de región variable de cadena pesada que consiste de residuos de aminoácidos de las posiciones 20 a 136 en la secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO: 62 y una secuencia de región variable de cadena ligera que consiste de residuos de
10 aminoácidos de las posiciones 21 a 126 en la secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO: 56.

(9) El anticuerpo o fragmento de ligación a antígeno del anticuerpo de acuerdo con (8), en donde el anticuerpo consiste de una secuencia de cadena pesada que consiste de
15 residuos de aminoácidos de las posiciones 20 a 465 o 20 a 466 en la secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO: 62 y una secuencia de cadena ligera que consiste de residuos de aminoácidos de las posiciones 21 a 234 en la secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO: 56.

20 (10) El anticuerpo o fragmento de ligación a antígeno del anticuerpo de acuerdo con (8), en donde el anticuerpo consiste de una secuencia de cadena pesada que consiste de residuos de aminoácidos de las posiciones 20 a 465 o 20 a 466 en la secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO: 70
25 y una secuencia de cadena ligera que consiste de residuos de

aminoácidos de las posiciones 21 a 234 en la secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO: 56.

(11) El anticuerpo o fragmento de ligación a antígeno del anticuerpo de acuerdo con (1) o (3), en donde el
5 anticuerpo comprende una secuencia de región variable de cadena pesada que consiste de residuos de aminoácidos de las posiciones 20 a 136 en la secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO: 62 y una secuencia de región variable de cadena ligera que consiste de residuos de
10 aminoácidos de las posiciones 21 a 126 en la secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO: 58.

(12) El anticuerpo o fragmento de ligación a antígeno del anticuerpo de acuerdo con (11), en donde el anticuerpo consiste de una secuencia de cadena pesada que consiste de
15 residuos de aminoácidos de las posiciones 20 a 465 o 20 a 466 en la secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO: 62 y una secuencia de cadena ligera que consiste de residuos de aminoácidos de las posiciones 21 a 234 en la secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO: 58.

20 (13) El anticuerpo o fragmento de ligación a antígeno del anticuerpo de acuerdo con (1) o (4), en donde el anticuerpo comprende una secuencia de región variable de cadena pesada que consiste de residuos de aminoácidos de las posiciones 20 a 136 en la secuencia de aminoácido
25 representada por SEQ ID NO: 62 y una secuencia de región

variable de cadena ligera que consiste de residuos de aminoácidos de las posiciones 21 a 126 en la secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO: 60.

(14) El anticuerpo o fragmento de ligación a antígeno
5 del anticuerpo de acuerdo con (13), en donde el anticuerpo
consiste de una secuencia de cadena pesada que consiste de
residuos de aminoácidos de las posiciones 20 a 465 o 20 a 466
en la secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO: 62
y una secuencia de cadena ligera que consiste de residuos de
10 aminoácidos de las posiciones 21 a 234 en la secuencia de
aminoácido representada por SEQ ID NO: 60.

(15) El anticuerpo o fragmento de ligación a antígeno
del anticuerpo de acuerdo con (1) o (5), en donde el
anticuerpo comprende una secuencia de región variable de
15 cadena pesada que consiste de residuos de aminoácidos de las
posiciones 20 a 136 en la secuencia de aminoácido
representada por SEQ ID NO: 64 y una secuencia de región
variable de cadena ligera que consiste de residuos de
aminoácidos de las posiciones 21 a 126 en la secuencia de
20 aminoácido representada por SEQ ID NO: 56.

(16) El anticuerpo o fragmento de ligación a antígeno
del anticuerpo de acuerdo con (15), en donde el anticuerpo
consiste de una secuencia de cadena pesada que consiste de
residuos de aminoácidos de las posiciones 20 a 465 o 20 a 466
25 en la secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO: 64

y una secuencia de cadena ligera que consiste de residuos de aminoácidos de las posiciones 21 a 234 en la secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO: 56.

(17) El anticuerpo o fragmento de ligación a antígeno
5 del anticuerpo de acuerdo con (1) o (6), en donde el anticuerpo comprende una secuencia de región variable de cadena pesada que consiste de residuos de aminoácidos de las posiciones 20 a 136 en la secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO: 66 y una secuencia de región
10 variable de cadena ligera que consiste de residuos de aminoácidos de las posiciones 21 a 126 en la secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO: 56.

(18) El anticuerpo o fragmento de ligación a antígeno del anticuerpo de acuerdo con (17), en donde el anticuerpo
15 consiste de una secuencia de cadena pesada que consiste de residuos de aminoácidos de las posiciones 20 a 465 o 20 a 466 en la secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO: 66 y una secuencia de cadena ligera que consiste de residuos de aminoácidos de las posiciones 21 a 234 en la secuencia de
20 aminoácido representada por SEQ ID NO: 56.

(19) El anticuerpo o fragmento de ligación a antígeno del anticuerpo de acuerdo con (1) o (7), en donde el anticuerpo comprende una secuencia de región variable de cadena pesada que consiste de residuos de aminoácidos de las
25 posiciones 20 a 136 en la secuencia de aminoácido

representada por SEQ ID NO: 43 y una secuencia de región variable de cadena ligera que consiste de residuos de aminoácidos de las posiciones 21 a 126 en la secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO: 56.

5 (20) El anticuerpo o fragmento de ligación a antígeno del anticuerpo de acuerdo con (19), en donde el anticuerpo consiste de una secuencia de cadena pesada que consiste de residuos de aminoácidos de las posiciones 20 a 465 o 20 a 466 en la secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO: 43
10 y una secuencia de cadena ligera que consiste de residuos de aminoácidos de las posiciones 21 a 235 en la secuencia de aminoácido representada por SEQ ID NO: 56.

 (21) El fragmento de ligación a antígeno del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de (1) a (20), en donde el
15 fragmento de ligación a antígeno se selecciona del grupo que consiste de Fab, F(ab')₂, Fab', y Fv.

 (22) El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de (1) a (8), (11), (13), (15), (17), y (19), en donde el anticuerpo es un scFv.

20 (23) Una composición farmacéutica que comprende al menos cualquiera de un anticuerpo o fragmento de ligación a antígeno del anticuerpo de acuerdo con (1) a (22).

 (24) La composición farmacéutica de acuerdo con (23), en donde la composición farmacéutica es un agente terapéutico
25 y/o profiláctico para rechazos de trasplantes, enfermedades

relacionadas inmunitarias, enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias, o cánceres, un activador anti-plaquetas o anti-trombótico, o un inhibidor de la activación de células que expresan Orai1.

5 (25) La composición farmacéutica de acuerdo con (24), en donde los rechazos de trasplantes son respuestas de rechazo y los rechazos de hospedero versus injerto al trasplante de un órgano o un tejido tal como el corazón, los riñones, el hígado, la médula ósea, o la piel, y enfermedad de injerto
10 versus hospedero provocada por el trasplante de células hematopoyéticas (médula ósea, sangre periférica, sangre del cordón umbilical, etc.).

 (26) La composición farmacéutica de acuerdo con (24), en donde las enfermedades relacionadas inmunitarias son
15 enfermedades del tejido conjuntivo o musculoesqueléticos (artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, lupus eritematoso sistémico, escleroderma, polimiositis, dermatomiositis, etc.), enfermedades hematológicas (anemia aplásica, púrpura trombocitopénica idiopática, etc.),
20 enfermedades gastrointestinales (enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, etc.), enfermedades neurológicas (esclerosis múltiple, miastenia grave, etc.), enfermedades oftálmicas (uveítis, etc.), enfermedades vasculares (enfermedad de Behcet, granulomatosis de Wegener, etc.), enfermedades
25 epidérmicas (psoriasis, pénfigo, leucoderma, etc.),

enfermedades endocrinas (diabetes mellitus tipo 1, tiroiditis autoinmunitaria, enfermedad de Graves, enfermedad de Hashimoto, etc.), y similares, las enfermedades alérgicas son dermatitis atópica, asma, anafilaxis, reacción anafilactoide, 5 alergia a alimentos, rinitis, otitis media, reacción a fármacos, reacción a etiquetas de insectos, reacción a plantas, alergia al látex, conjuntivitis, urticaria, y similares, y las enfermedades inflamatorias son enfermedades renales inflamatorias (glomerulonefritis, nefrosis, etc.), 10 enfermedades pulmonares inflamatorias (enfermedad pulmonar obstructiva crónica, fibrosis cística, neumonía intersticial, etc.), enfermedades intestinales inflamatorias (colitis ulcerativa, ileitis, etc.), enfermedades hepáticas inflamatorias (hepatitis autoinmunitaria, hepatitis viral, 15 etc.), enfermedades cardíacas inflamatorias (miocarditis, enfermedad cardíaca isquémica, aterosclerosis, etc.), enfermedades de la piel inflamatorias (dermatitis por contacto, eccema, etc.), enfermedades oculares inflamatorias (tracoma, endoftalmitis, etc.), enfermedades nerviosas 20 centrales inflamatorias (meningitis, encefalomiелitis, encefalitis autoinmunitaria, etc.), enfermedades articulares inflamatorias (artritis, osteoartritis, etc.), inflamaciones sistémicas (septicemia, hemorragia, hipersensibilidad, síntomas de choque atribuidos a quimioterapia de cáncer o 25 similares, etc.), y similares.

(27) La composición farmacéutica de acuerdo con (24), en donde los cánceres son cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de piel, leucemia y similares, y casos en los cuales la actividad anti-plaquetas o anti-trombótica es útil para
5 tratamiento y/o prevención de infarto al miocardio, apoplejía, enfermedades cardíacas sistémicas, trombosis, y similares, y casos en los cuales la inhibición de la activación de células que expresan Orai1 es útil para el
10 tratamiento y/o prevención de leucemia de mastocitos, mastocitosis, leucemia basofílica, endometriosis, miopatía agregada tubular, síndrome de Stormorken, artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, dermatitis atópica y similares.

(28) Un polinucleótido que codifica un anticuerpo o un
15 fragmento de ligación a antígeno del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de (1) a (22).

(29) Un vector que comprende un polinucleótido de acuerdo con (28).

(30) Una célula hospedera transformada que comprende un
20 polinucleótido de acuerdo con (28).

(31) Una célula hospedera transformada que comprende un vector de acuerdo con (29).

(32) Un método para producir un anticuerpo o un
fragmento de ligación a antígeno del anticuerpo de acuerdo
25 con cualquiera de (1) a (22), que comprende el paso de

cultivar una célula hospedera de acuerdo con (30) o (31) y purificar un anticuerpo del producto de cultivo.

(33) Un anticuerpo o un fragmento de ligación a antígeno del anticuerpo que se liga específicamente a la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2, en donde la concentración en la cual la cantidad de IL-2 liberada de células Jurkat tratadas con PMA y A23187 se inhibe por 50% es 80 ng/mL o más baja.

(34) El anticuerpo o fragmento de ligación a antígeno del anticuerpo de acuerdo con (33), en donde la concentración en la cual la cantidad de IL-2 liberada de las células Jurkat tratadas con PMA y A23187 se inhibe por 50% es 10 ng/mL o más baja.

(35) Un anticuerpo o un fragmento de ligación a antígeno del anticuerpo que se liga específicamente a la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2, en donde la concentración en la cual la cantidad de IL-2 liberada de células mononucleares de sangre periférica humanas (PBMC) tratadas con PMA y A23187 se inhibe por 50% es 100 ng/mL o más baja.

(36) El anticuerpo o fragmento de ligación a antígeno del anticuerpo de acuerdo con (35), en donde la concentración en la cual la cantidad de IL-2 liberada de PBMC humanas tratadas con PMA y A23187 se inhibe por 50% es 20 ng/mL o más baja.

(37) Un anticuerpo o un fragmento de ligación a antígeno del anticuerpo que se liga específicamente a la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2, en donde la concentración en la cual la cantidad de IFN- γ liberada de 5 PBMC humanas tratadas con PMA y A23187 se inhibe por 50% es 800 ng/mL o más baja.

(38) El anticuerpo o fragmento de ligación a antígeno del anticuerpo de acuerdo con (37), en donde la concentración en la cual la cantidad de IFN- γ liberada de PBMC humanas 10 tratadas con PMA y A23187 se inhibe por 50% es 40 ng/mL o más baja.

Efectos Ventajosos de la Invención

De acuerdo con la presente invención, se puede obtener un agente terapéutico y/o profiláctico para rechazos de 15 trasplantes, enfermedades inmunológicas, enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias, trombosis, o cánceres basados en la inhibición de la actividad del canal CRAC como el mecanismo de acción.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

20 La Figura 1 es un diagrama que muestra que R118 y R198 se ligan cada uno a células HEK293T transfectadas con pcADN3.1-hOrai1 en una manera dependiente de concentración.

La Figura 2 es un diagrama que muestra que R118 y R198 inhiben cada uno, en una manera dependiente de concentración, 25 la liberación de IL-2 de células Jurkat tratadas con PMA y

A23187.

La Figura 3 es un diagrama que muestra que cR118 y cR198 se ligan cada una a células HEK293T transfectadas con pcADN3.1-hOrai1 en una manera dependiente de concentración.

5 La Figura 4 es un diagrama que muestra que cR118 y cR198 inhiben cada uno, en una manera dependiente de concentración, la liberación de IL-2 de células Jurkat tratadas con PMA y A23187.

La Figura 5 es un diagrama que muestra que los
10 anticuerpos anti-Orai1 humano humanos humanizados hR198_H1/L1, hR198_H2/L2, hR198_H3/L3, y hR198_H4/L4 se ligan cada uno a células HEK293T transfectadas con pcADN3.1-hOrai1, en una manera dependiente de concentración, como con el anticuerpo precursor cR118 o cR198.

15 La Figura 6 es un diagrama que muestra que los anticuerpos Orai1 anti-humanos humanizados inhiben cada uno, en una manera dependiente de concentración, la liberación de IL-2 de células Jurkat tratadas con PMA y A23187.

Las Figuras 7A, 7B y 7C son un diagrama que muestra que
20 los clones de Fab mutados LCDR60, LCDR67, LCDR83, CE151, PE057, HCDR046, HCDR047, HEP087, HEP124, y HEP237 obtenidos por expresión de ribosomas se ligan cada uno en gran medida a células HEK293T transfectadas con pcADN3.1-hOrai1 como son comparados con el Fab de anticuerpo precursor hR198_H4/L4-
25 Fab.

La Figura 8 es un diagrama que muestra que los anticuerpos de maduración por afinidad hR198_H3/LG1, hR198_HG1/LG1, hR198_HG1/LG2, hR198_HG1/LG3, hR198_HG2/LG1, y hR198_HG3/LG1 cada uno se liga a células HEK293T
5 transfectadas con pcADN3.1-hOrai1 en un nivel equivalente a o más potente que aquel del anticuerpo precursor hR198_H3/L3 o hR198_H4/L4.

La Figura 9 es un diagrama que muestra que los anticuerpos de maduración por afinidad inhiben cada uno, en
10 una manera dependiente de concentración, la liberación de IL-2 de células Jurkat tratadas con PMA y A23187.

La Figura 10 es un diagrama que muestra que los anticuerpos 10F8, 14F74, y 17F6 se ligan cada uno a células HEK293T transfectadas con pcADN3.1-hOrai1.

15 La Figura 11 es un diagrama que muestra que los anticuerpos hR198_HG1/LG1, hR198_HG1-LALA/LG1, 2C1.1, y 5H3.1 se ligan cada uno a células HEK293T transfectadas con pcADN3.1-hOrai1.

La Figura 12 es un diagrama que muestra que los
20 anticuerpos monoclonales anti-Orai1 inhiben cada uno, en una manera dependiente de concentración, la liberación de IL-2 de células Jurkat tratadas con PMA y A23187.

La Figura 13 es un diagrama que muestra las concentraciones inhibidoras máximas medias (IC_{50}) y el 80% de
25 concentraciones inhibidoras (IC_{80}) de hR198_HG1/LG1,

hR198_HG1-LALA/LG1, 2C1.1, 5H3.1, 10F8, 14F74, y 17F6 contra la liberación de IL-2 de células Jurkat.

La Figura 14 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica una región variable de cadena ligera R118 y una secuencia de aminoácidos de la región variable.

La Figura 15 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica una Región variable de cadena pesada R118 y una secuencia de aminoácidos de la región variable.

La Figura 16 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica una región variable de cadena ligera R198 y una secuencia de aminoácidos de la región variable.

La Figura 17 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica una Región variable de cadena pesada R198 y una secuencia de aminoácidos de la región variable.

La Figura 18 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera cR118 quimerizada humana y una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera.

La Figura 19 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera cR198 quimerizada humana y una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera.

La Figura 20 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada cR118 quimerizada humana y una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada.

La Figura 21 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada cR198 quimerizada

humana y una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada.

La Figura 22 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera de tipo hR198_L1 y una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera.

5 La Figura 23 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera de tipo hR198_L2 y una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera.

La Figura 24 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera de tipo hR198_L3 y
10 una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera.

La Figura 25 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera de tipo hR198_L4 y una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera.

La Figura 26 es un diagrama que muestra una secuencia de
15 nucleótidos que codifica una cadena pesada de tipo hR198_H1 y una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada.

La Figura 27 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada de tipo hR198_H2 y una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada.

20 La Figura 28 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada de tipo hR198_H3 y una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada.

La Figura 29 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada de tipo hR198_H4 y
25 una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada.

La Figura 30 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera de tipo hR198_LG1 y una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera.

La Figura 31 es un diagrama que muestra una secuencia de
5 nucleótidos que codifica una cadena ligera de tipo hR198_LG2 y una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera.

La Figura 32 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera de tipo hR198_LG3 y una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera.

10 La Figura 33 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada de tipo hR198_HG1 y una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada.

La Figura 34 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada de tipo hR198_HG2
15 y una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada.

La Figura 35 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada de tipo hR198_HG3 y una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada.

La Figura 36 es un diagrama que muestra una secuencia de
20 nucleótidos que codifica una cadena pesada de tipo hR198_H4-LALA y una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada.

La Figura 37 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada de tipo hR198_HG1-LALA y una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada.

25 La Figura 38 es un diagrama que muestra SEQ ID NOs que

corresponden a la secuencia CDR contenidas en cada una de las cadenas ligeras cR118, cR198, hR198_L1 a hR198_L4, y hR198_LG1 a hR198_LG3 y cada una de las cadenas pesadas de cR118, cR198, hR198_H1 a hR198_H4, hR198_HG1 a hR198_HG3, 5 hR198_H4-LALA, y hR198_HG1-LALA.

La Figura 39 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada del anticuerpo 2C1.1 y una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada.

La Figura 40 es un diagrama que muestra una secuencia de 10 nucleótidos que codifica una cadena ligera del anticuerpo 2C1.1 y una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera.

La Figura 41 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada del anticuerpo 5H3.1 y una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada.

15 La Figura 42 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera del anticuerpo 5H3.1 y una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera.

La Figura 43 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada del anticuerpo 20 10F8 y una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada.

La Figura 44 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera del anticuerpo 10F8 y una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera.

La Figura 45 es un diagrama que muestra una secuencia de 25 nucleótidos que codifica una cadena pesada de anticuerpo

14F74 y una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada.

Figura 46 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera de anticuerpo 14F74 y una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera.

5 La Figura 47 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada del anticuerpo 17F6 y una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada.

La Figura 48 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera del anticuerpo
10 17F6 y una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera.

La Figura 49 es un diagrama que muestra una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada de tipo hR198_H0 y una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada.

La Figura 50 es un diagrama que muestra una secuencia de
15 nucleótidos que codifica una cadena pesada de tipo hR198_H5 y una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada.

La Figura 51 es un diagrama que muestra que los anticuerpos monoclonales anti-Orai1 inhiben cada uno, en una manera dependiente de concentración, la liberación de IL-2 de
20 las PBMC humanas tratadas con PMA y A23187.

La Figura 52 es un diagrama que muestra las concentraciones inhibitoras máximas medias (IC_{50}) y 80% de concentraciones inhibitoras (IC_{80}) de hR198_HG1/LG1, hR198_HG1-LALA/LG1, 2C1.1, 5H3.1, 10F8, 14F74, y 17F6 contra
25 la liberación de IL-2 de PBMC humanas.

La Figura 53 es un diagrama que muestra que los anticuerpos monoclonales anti-Orai1 inhiben cada uno, en una manera dependiente de concentración, la liberación de IFN- γ de las PBMC humanas tratadas con PMA y A23187.

5 La Figura 54 es un diagrama que muestra las concentraciones inhibitoras máximas medias (IC₅₀) y 80% de las concentraciones inhibitoras (IC₈₀) de hR198_HG1/LG1, hR198_HG1-LALA/LG1, 2C1.1, 5H3.1, 10F8, 14F74, y 17F6 contra la liberación de IFN- γ de las PBMC humanas.

10 La Figura 55 es un diagrama que muestra que el hR198_HG1/LG1 inhibe la pérdida corporal asociada con la enfermedad de injerto versus hospedero que se desarrolla por el trasplante de PBMC humanas a varios ratones inmunodeficientes combinados.

15 La Figura 56 es un diagrama que muestra que el hR198_HG1/LG1 suprime la reacción de anafilaxis cutánea pasiva inducida en ratones inactivados de Orai1 humanos.

Las Figuras 57A, 57B y 57C son un diagrama que muestra que el hR198_HG1/LG1 suprimió la reacción de
20 hipersensibilidad de tipo retardada inducida en los ratones inactivados de Orai1 humano, en cada punto en el tiempo de 6 horas (Figura 57A), 24 horas (Figura 57B), y 48 horas (Figura 57C) después de la administración del antígeno. [Figura 58]

La Figura 58 es un diagrama que muestra la viscosidad medida
25 en concentraciones de 90 mg/mL, 120 mg/mL, y 150 mg/mL de los

anticuerpos hR198_HG1/LG1, hR198_H3/LG1, hR198_HG1-LALA/LG1, y 2C1.1.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En la presente descripción, el término "gen" incluye no solo ADN sino también ARNm, ADNc y ARNc.

En la presente descripción, el término "polinucleótido" se usa con el mismo significado como un ácido nucleico y también incluye ADN, ARN, sondas, oligonucleótidos, y cebadores.

En la presente descripción, el término "polipéptido" y el término "proteína" se usan intercambiabilmente entre sí.

En la presente descripción, el término "fracción de ARN" se refiere a una fracción que contiene ARN.

En la presente descripción, el término "célula" incluye células dentro del animal individual y células cultivadas.

En la presente descripción, el término "Orai1" se usa con el mismo significado como proteína Orai1.

En la presente descripción, el término "fragmento de ligación a antígeno del anticuerpo" significa un fragmento parcial del anticuerpo que tiene actividad de ligación contra el antígeno e incluye Fab, F(ab')₂, Fv, scFv, diacuerpos, anticuerpos lineales, y anticuerpos multiespecíficos formados de fragmentos de anticuerpos, etc. El fragmento de ligación a antígeno del anticuerpo también incluye Fab', que es un fragmento monovalente de regiones variables de anticuerpo

obtenidas por el tratamiento de $F(ab')_2$ bajo condiciones de reducción. Sin embargo el fragmento de ligación a antígeno del anticuerpo no se limita a estas moléculas siempre y cuando el fragmento de ligación a antígeno tenga la capacidad
5 de ligarse al antígeno. Este fragmento de ligación a antígeno incluye no solo un fragmento obtenido al tratar una molécula de longitud completa de la proteína de anticuerpo con una enzima apropiada sino también una proteína producida en células hospederas apropiadas usando un gen de anticuerpo
10 genéticamente modificado.

Las cadenas pesadas y ligeras de una molécula de anticuerpo son conocidas por tener cada una tres regiones determinadoras de complementariedad (CDRs). Las regiones determinadoras de complementariedad también son llamadas
15 dominios hipervariables. Estas regiones se sitúan en las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo. Estos sitios tienen una estructura primaria particularmente en la medida variable y se separan en tres posiciones en las estructuras primarias respectivas de las
20 cadenas de polipéptido de cadena pesada y ligera. En la presente descripción, las regiones determinadoras de complementariedad del anticuerpo son referidas como CDRH1, CDRH2, y CDRH3 de la amino-terminal de la secuencia de aminoácidos de cadena pesada para las regiones determinadoras
25 de complementariedad de la cadena pesada y como CDRL1, CDRL2,

y CDRL3 de la amino-terminal de la secuencia de aminoácidos de cadena ligera para las regiones determinadoras de complementariedad de la cadena ligera. Estos sitios están próximos entre sí en la estructura tridimensional y
5 determinan la especificidad para que el antígeno se ligue.

En la presente invención, la frase "hibridar bajo condiciones rigurosas" significa la hibridación bajo condiciones que implican la hibridación a 68°C en una solución de hibridación comercialmente disponible ExpressHyb
10 Hybridization Solution (Clontech Laboratories, Inc.), o hibridación a 68°C en presencia de NaCl 0.7 a 1.0 M usando un filtro inmovilizado de ADN, seguido por lavado a 68°C usando una solución SSC que tiene una concentración de 0.1 a 2 x (SSC que tiene una concentración 1 x que consiste de NaCl 150
15 mM y citrato de sodio 15 mM) que permite la identificación, o hibridación bajo condiciones equivalentes a la misma.

En la presente invención, el término "reacción de hospedero versus injerto" se refiere al estado hiperinmunitario de un recipiente observado después del
20 trasplante de órganos, y daño al órgano trasplantado que resulta del mismo.

En la presente invención, el término "enfermedad de injerto versus hospedero" se refiere a síntomas manifestados por el ataque inmunológico de un recipiente por células
25 trasplantadas después del trasplante de células

hematopoyéticas.

1. Orai1

El Orai1 usado en la presente invención se puede purificar directamente de células T o mastocitos de un humano, un mamífero no humano (por ejemplo, un conejillo de indias, una rata, un ratón, un conejo, un cerdo, una oveja, ganado, o un mono, o un pollo, o se puede usar en una fracción de membrana celular preparada de las células. Alternativamente, el Orai1 se puede sintetizar *in vitro* u obtener mediante la producción de células hospederas por manipulación génica. En esta manipulación génica, específicamente, el Orai1 ADNc se inserta en un vector que permite la expresión, y después el Orai1 se puede sintetizar en una solución que contiene una enzima, un sustrato, y una sustancia energética necesaria para transcripción y traducción, o expresada por transformación de células hospederas de un procarionte o eucariota diferente para obtener la proteína.

La secuencia de nucleótidos del Orai1 ADNc humano se registra bajo el No. de Acceso No: NM_032790 en GenBank. La secuencia de nucleótidos de Orai1 ADNc de ratón se registra bajo el No de Acceso: NM_175423 en GenBank. La secuencia de nucleótidos que codifica el Orai1 humano se muestra en SEQ ID NO: 1 del Listado de Secuencias, y la secuencia de aminoácidos del Orai1 humano se muestra en SEQ ID NO: 2 del

Listado de Secuencias. El Orai1 también es llamado modulador 1 de calcio activado por liberación de calcio (CRACM1) o proteína transmembrana 142A (TMEM142A), todos de los cuales indican la misma molécula.

5 El Orai1 ADNc se puede obtener por un así llamado método de PCR que implica llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (a partir de ahora, referida como "PCR") (Saiki, R.K., y colaboradores, Science, (1988) 239, 487-49), por ejemplo, con una biblioteca de ADNc de órganos que expresan
10 Orai1 ARNm como una plantilla que usa cebadores que amplifican específicamente el Orai1 ADNc.

El término "Orai1 ADNc" también incluye un polinucleótido que se hibrida bajo condiciones rigurosas a un polinucleótido que consiste de una secuencia de nucleótidos
15 complementaria a la secuencia de nucleótidos que codifica el Orai1 humano o de ratón y que codifica una proteína que tiene actividad biológica equivalente con Orai1. El término "Orai1 ADNc" incluye además un ADNc para una variante de empalme que se ha transcrito del sitio del gen Orai1 humano o de ratón o
20 un polinucleótido que se hibrida bajo condiciones rigurosas a un polinucleótido que consiste de una secuencia de nucleótidos complementaria con la variante de empalme y que codifica una proteína que tiene actividad biológica equivalente a Orai1.

25 El término "Orai1" también incluye una proteína que

consiste de una secuencia de un aminoácido derivada de la secuencia de aminoácidos de Orai1 humano o de ratón o una secuencia de aminoácidos del mismo libre de la secuencia señal por la sustitución, supresión, o adición de 1, 2 o 3, o 5 4 o 5 aminoácidos, y tiene actividad biológica equivalente a Orai1. El término "Orai1" comprende además una proteína que consiste de una secuencia de aminoácidos codificada por una variante de empalme transcrita del sitio del gen Orai1 humano o de ratón, o una secuencia de aminoácidos derivada de esta 10 secuencia de aminoácidos por la sustitución, supresión o adición de 1, 2 o 3, o 4 o 5 aminoácidos, tiene la actividad biológica equivalente a Orai1.

2. Producción del anticuerpo anti-Orai1

El anticuerpo contra Orai1 de la presente invención se 15 puede obtener de acuerdo con métodos de rutina al inmunizar un animal con Orai1 o un polipéptido arbitrario seleccionado de la secuencia de aminoácidos de Orai1 y recolectar y purificar el anticuerpo producido *in vivo*. Las especies para Orai1 usadas como un antígeno no se limitan a un animal, y el 20 animal se puede inmunizar con Orai1 derivado de un animal no humano tal como un ratón o una rata. En este caso, el anticuerpo obtenido que se liga al Orai1 heterólogo se puede someter a prueba por su reactividad cruzada con Orai1 humano para seleccionar un anticuerpo aplicable a enfermedades 25 humanas. El antígeno Orai1 se puede obtener al permitir que

las células hospederas produzcan en gen Orai1 por la manipulación génica. Específicamente, un vector que permite la expresión del gen Orai1 se prepara y se transfiere a las células hospederas para expresar el gen. El Orai1 expresado
5 se puede purificar.

El anticuerpo contra Orai1 de la presente invención también se puede obtener mediante el uso de un método de inmunización de ADN. El método de inmunización de ADN es un procedimiento que implica transfectar un animal (por ejemplo,
10 rata o ratón) con un plásmido de expresión a antígeno y que exprese el antígeno en el animal para inducir la inmunidad contra el antígeno. El procedimiento de transfección incluye un método para inyectar directamente el plásmido en el músculo, un método para inyectar un complejo del plásmido y
15 un liposoma, polietilenimina, o similar en una vena, un procedimiento que usa un vector viral, un procedimiento para inyectar partículas doradas unidas al plásmido usando una pistola génica, un método hidrodinámico para inyectar rápidamente una solución de plásmido en una gran cantidad en
20 una vena, y similares. Una técnica llamada electroporación *in vivo*, que implica aplicar electroporación a un sitio dado el plásmido intramuscularmente inyectado, es conocido como un procedimiento para mejorar el nivel de expresión del método de transfección para inyectar el plásmido de expresión en el
25 músculo (Aihara H, Miyazaki J., Nat Biotechnol. 1998 Sep; 16

(9): 867-70 o Mir LM, Bureau MF, Gehl J, Rangara R, Rouy D, Caillaud JM, Delaere P, Branellec D, Schwartz B, Scherman D., Proc Natl Acad Sci USA. 1999 Apr 13; 96 (8): 4262-7). Este procedimiento mejora adicionalmente el nivel de expresión al
5 tratar el músculo con hialuronidasa antes de la inyección intramuscular del plásmido (McMahon JM1, Signori E, Wells KE, Fazio VM, Wells DJ., Gene Ther. 2001 Aug; 8 (16): 1264-70).

Un anticuerpo monoclonal también se puede obtener de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica (por ejemplo,
10 Kohler y Milstein, Nature (1975) 256, p. 495-497; y Kennet, R. ed., Monoclonal Antibodies, p. 365-367, Plenum Press, N.Y. (1980)) al fusionar células productoras de anticuerpos que producen el anticuerpo contra Orai1 con células de mieloma para establecer hibridomas. Ejemplos específicos de este
15 compuesto se describen en las Publicaciones Internacionales Nos. WO09/48072 (publicada el 16 de Abril de 2009) y WO10/117011 (publicada el 14 de Octubre de 2010).

Ejemplos actuales del anticuerpo anti-Orai1 humano de rata establecido de esta manera puede incluir los anticuerpos
20 R118 y R198. La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo R118 se muestra en SEQ ID NO: 11 del Listado de Secuencias, y la secuencia de la región variable de cadena pesada del anticuerpo R118 se muestra en SEQ ID NO: 13 del Listado de Secuencias. La
25 secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena

ligera del anticuerpo R198 se muestra en SEQ ID NO: 15 del Listado de Secuencias, y la secuencia de la región variable de cadena pesada del anticuerpo R198 se muestra en SEQ ID NO: 17 del Listado de Secuencias.

5 El anticuerpo de la presente invención incluye el anticuerpo monoclonal contar Orai1 descrito en lo anterior, así como un anticuerpo recombinante artificialmente modificado para el propósito de, por ejemplo, reducir la antigenicidad heterogénea contra humanos, por ejemplo, un
10 anticuerpo quimérico y un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano y similares. Estos anticuerpos se pueden producir mediante el uso de métodos conocidos.

Ejemplos del anticuerpo quimérico pueden incluir un anticuerpo quimérico que comprende regiones variables y
15 regiones constantes de anticuerpos derivados de diferentes especies, por ejemplo, las regiones variables de un anticuerpo derivado de ratón o rata unido a las regiones constantes derivadas humanas (ver Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81, 6851-6855, (1984)).

20 Ejemplos del anticuerpo quimérico derivados del anticuerpo anti-Orai1 humano de rata R118 pueden incluir un anticuerpo que consiste de una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera que consiste de residuos de aminoácidos en las posiciones 21 a 126 de SEQ ID NO: 23 y
25 una cadena pesada que comprende una región variable de cadena

pesada que consiste de residuos de aminoácidos en las posiciones 20 a 136 de SEQ ID NO: 27. Un ejemplo de este anticuerpo quimérico derivado de R118 puede incluir un anticuerpo que consiste de una cadena ligera que consiste de
5 residuos de aminoácidos en las posiciones 21 a 234 de SEQ ID NO: 23 y una cadena pesada que consiste de residuos de aminoácidos en las posiciones 20 a 466 de SEQ ID NO: 27. En la presente descripción, este anticuerpo es referido como "cR118" o un "anticuerpo cR118".

10 Ejemplos del anticuerpo quimérico derivados del anticuerpo anti-Orai1 humano de rata R198 pueden incluir un anticuerpo que consiste de una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera que consiste de residuos de aminoácidos en las posiciones 21 a 126 de SEQ ID NO: 25 y
15 una cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada que consiste de residuos de aminoácidos en las posiciones 20 a 136 de SEQ ID NO: 29. Un ejemplo de este anticuerpo quimérico derivado de R198 puede incluir un anticuerpo que consiste de una cadena ligera que consiste de
20 residuos de aminoácidos en las posiciones 21 a 234 de SEQ ID NO: 25 y una cadena pesada que consiste de residuos de aminoácidos en las posiciones 20 a 466 de SEQ ID NO: 29. En la presente descripción, este anticuerpo es referido como "cR198" o un "anticuerpo cR198".

25 La secuencia del anticuerpo quimérico contra Orai1

descrito en lo se puede modificar artificialmente para preparar un anticuerpo humanizado como un anticuerpo recombinante génico, para el propósito de, por ejemplo, reducir la antigenicidad heterogénea contra humanos. El
5 anticuerpo de la presente invención incluye un anticuerpo cuyas CDRs son CDRs modificadas de un anticuerpo humanizado. Estos anticuerpos se pueden producir mediante el uso de métodos conocidos.

Ejemplos del anticuerpo humanizado pueden incluir un
10 anticuerpo que comprende regiones determinadoras de complementariedad (CDRs) solas injertadas en un anticuerpo derivado humano (ver Nature (1986) 321, p. 522-525), y un anticuerpo que comprende las secuencias CDR así como los residuos de aminoácidos de una porción de la estructura
15 injertada en un anticuerpo humano (Publicación Internacional No. W090/07861).

El anticuerpo humanizado derivado del anticuerpo cR118 o cR198 retiene todas las 6 secuencias de 6 CDR derivadas de cR118 o cR198 y tiene la actividad de inhibir la activación
20 de células T. La región variable de cadena ligera del anticuerpo humanizado retiene cualquiera de una CDRL1 que consiste de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 92 (RASQSIGNSLS) y una CDRL1 que consiste de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 116
25 (RASQISISNSLS), una CDRL2 que consiste de la secuencia de

aminoácidos representada por SEQ ID NO: 96 (STSTLES), y cualquiera de una CDRL3 que consiste de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 99 (LQFATFPDT) y una CDRL3 mostrada en SEQ ID NO: 100 (LQFATYPDT). También, la

5 región variable de cadena pesada del anticuerpo humanizado retiene cualquiera de una CDRH1 que consiste de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 102 (AYYIS) y una CDRH1 mostrada en SEQ ID NO: 103 (SYYIS), cualquiera de una CDRH2 que consiste de la secuencia de aminoácidos

10 representada por SEQ ID NO: 104 (YIDMGNGRTNYNARFKG) y una CDRH2 mostrada en SEQ ID NO: 105 (YVDMGNGRTNYNEKFKG), y una CDRH3 que consiste de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 109 (DSNWGV DY). Estas secuencias de aminoácidos de las CDRs también se muestran en la Figura

15 38.

Ejemplos del anticuerpo que tienen una combinación referida de las CDRs pueden incluir un anticuerpo que comprende CDRL1 que consiste de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 92, CDRL2 que consiste de la

20 secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 96, CDRL3 que consiste de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 100, CDRH1 que consiste de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 103, CDRH2 que consiste de la secuencia de aminoácidos

25 representada por SEQ ID NO: 105, y CDRH3 que consiste de la

secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 109, y un anticuerpo que comprende CDRL1 que consiste de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 92, CDRL2 que consiste de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 96, CDRL3 que consiste de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 99, CDRH1 que consiste de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 102, CDRH2 que consiste de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 104, y CDRH3 que consiste de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 109.

Ejemplos preferidos del anticuerpo humanizado pueden incluir un anticuerpo que consiste de una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera que consiste de residuos de aminoácidos en las posiciones 21 a 126 de SEQ ID NO: 31 y una cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada que consiste de residuos de aminoácidos en las posiciones 20 a 136 de SEQ ID NO: 39, un anticuerpo que consiste de una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera que consiste de residuos de aminoácidos en las posiciones 21 a 126 de SEQ ID NO: 33 y una cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada que consiste de residuos de aminoácidos en las posiciones 20 a 136 de SEQ ID NO: 41, un anticuerpo que consiste de una cadena ligera que comprende una región

variable de cadena ligera que consiste de residuos de aminoácidos en las posiciones 21 a 126 de SEQ ID NO: 35 y una cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada que consiste de residuos de aminoácidos en las
5 posiciones 20 a 136 de SEQ ID NO: 43, y un anticuerpo que consiste de una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera que consiste de residuos de aminoácidos en las posiciones 21 a 126 de SEQ ID NO: 37 y una
10 cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada que consiste de residuos de aminoácidos en las posiciones 20 a 136 de SEQ ID NO: 45.

Ejemplos más preferidos de los mismos pueden incluir un anticuerpo que consiste de una cadena ligera que consiste de residuos de aminoácidos en las posiciones 21 a 234 de SEQ ID
15 NO: 31 y una cadena pesada que consiste de residuos de aminoácidos en las posiciones 20 a 466 de SEQ ID NO: 39, un anticuerpo que consiste de una cadena ligera que consiste de residuos de aminoácidos en las posiciones 21 a 234 de SEQ ID
NO: 33 y una cadena pesada que consiste de residuos de
20 aminoácidos en las posiciones 20 a 466 de SEQ ID NO: 41, un anticuerpo que consiste de una cadena ligera que consiste de residuos de aminoácidos en las posiciones 21 a 234 de SEQ ID
NO: 35 y una cadena pesada que consiste de residuos de aminoácidos en las posiciones 20 a 466 de SEQ ID NO: 43, y un
25 anticuerpo que consiste de una cadena ligera que consiste de

residuos de aminoácidos en las posiciones 21 a 234 de SEQ ID NO: 37 y una cadena pesada que consiste de residuos de aminoácidos en las posiciones 20 a 466 de SEQ ID NO: 45.

El anticuerpo de la presente invención puede ser un anticuerpo con capacidad mejorada para ligarse al Orail1 obtenido al mutar adicionalmente el anticuerpo humanizado descrito en lo anterior. Este procedimiento es llamado maduración por afinidad. Ejemplos específicos del método pueden incluir un método de expresión de ribosomas. El método de expresión de ribosomas es un método que implica usar un complejo tripartita de una proteína ligada a un ARNm que tiene la información genética del mismo a través de un ribosoma y aislar una secuencia génica que codifica la proteína que se liga a una molécula diana (Stafford RL. y colaboradores, Protein Eng. Des. Sel. 2014 (4): 97-109).

La región variable de cadena ligera del anticuerpo modificado genéticamente por el método descrito en lo anterior retiene cualquiera de una CDRL1 que consiste de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 93 (RASQSIGGSLS), una CDRL1 que consiste de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 94 (HASQNIGGSLS), y una CDRL1 que consiste de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 95 (HASRNIGGSLS), cualquiera de una CDRL2 que consiste de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 96 (STSTLES), una CDRL2 que

consiste de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 97 (LTSTLDW), y una CDRL2 que consiste de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 98 (LTSSLDW), y una CDRL3 que consiste de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 101 (LQFAIFPDS). También, la región variable de cadena pesada del anticuerpo modificado genéticamente retiene una CDRH1 que consiste de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 102 (AYYIS), cualquiera de una CDRH2 que consiste de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 104 (YIDMGNGRTNYNARFKG), una CDRH2 que consiste de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 106 (YIDMGNGRTDYNARFKG), una CDRH2 que consiste de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 107 (YIDMGNGRTDYNGRFGK), y una CDRH2 mostrada en SEQ ID NO: 108 (YIDMGNGRTDYNMRFKG), y una CDRH3 que consiste de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 109 (DSNWGVVDY) o a CDRH3 que consiste de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 110 (DSNWGADY). Estas secuencias de aminoácidos del CDRs se muestran en la Figura 38.

Ejemplos del anticuerpo que tiene una combinación referida de las CDRs pueden incluir un anticuerpo que comprende una CDRL1 que consiste de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 93, una CDRL2 que consiste de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ

ID NO: 96, una CDRL3 que consiste de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 101, una CDRH1 que consiste de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 102, una CDRH2 que consiste de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 106, y una CDRH3 que consiste de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 110, un anticuerpo que comprende una CDRL1 que consiste de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 94, una CDRL2 que consiste de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 97, una CDRL3 que consiste de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 101, una CDRH1 que consiste de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 102, una CDRH2 que consiste de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 106, y una CDRH3 que consiste de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 110, un anticuerpo que comprende una CDRL1 que consiste de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 95, una CDRL2 que consiste de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 98, una CDRL3 que consiste de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 101, una CDRH1 que consiste de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 102, una CDRH2 que consiste de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 106, y una CDRH3 que consiste de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ

ID NO: 110, un anticuerpo que comprende una CDRL1 que consiste de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 93, una CDRL2 que consiste de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 96, una CDRL3 que
5 consiste de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 101, una CDRH1 que consiste de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 102, una CDRH2 que consiste de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 107, y una CDRH3 que consiste de la secuencia de
10 aminoácidos representada por SEQ ID NO: 110, un anticuerpo que comprende una CDRL1 que consiste de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 93, una CDRL2 que consiste de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 96, una CDRL3 que consiste de la secuencia de
15 aminoácidos representada por SEQ ID NO: 101, una CDRH1 que consiste de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 102, una CDRH2 que consiste de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 108, y una CDRH3 que consiste de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ
20 ID NO: 110, y un anticuerpo que comprende una CDRL1 que consiste de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 93, una CDRL2 que consiste de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 96, una CDRL3 que consiste de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ
25 ID NO: 101, una CDRH1 que consiste de la secuencia de

aminoácidos representada por SEQ ID NO: 102, una CDRH2 que consiste de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 104, y una CDRH3 que consiste de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 109.

5 Ejemplos preferidos del anticuerpo CDR genéticamente modificado pueden incluir un anticuerpo que consiste de una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera que consiste de residuos de aminoácidos en las posiciones 21 a 126 de SEQ ID NO: 56 y una cadena pesada que
10 comprende una región variable de cadena pesada que consiste de residuos de aminoácidos en las posiciones 20 a 136 de SEQ ID NO: 62, un anticuerpo que consiste de una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera que consiste de residuos de aminoácidos en las posiciones 21 a
15 126 de SEQ ID NO: 58 y una cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada que consiste de residuos de aminoácidos en las posiciones 20 a 136 de SEQ ID NO: 62, un anticuerpo que consiste de una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera que consiste de residuos
20 de aminoácidos en las posiciones 21 a 126 de SEQ ID NO: 60 y una cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada que consiste de residuos de aminoácidos en las posiciones 20 a 136 de SEQ ID NO: 62, un anticuerpo que consiste de una cadena ligera que comprende una región
25 variable de cadena ligera que consiste de residuos de

aminoácidos en las posiciones 21 a 126 de SEQ ID NO: 56 y una cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada que consiste de residuos de aminoácidos en las posiciones 20 a 136 de SEQ ID NO: 64, un anticuerpo que
5 consiste de una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera que consiste de residuos de aminoácidos en las posiciones 21 a 126 de SEQ ID NO: 56 y una cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada que consiste de residuos de aminoácidos en las
10 posiciones 20 a 136 de SEQ ID NO: 66, y un anticuerpo que consiste de una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera que consiste de residuos de aminoácidos en las posiciones 21 a 126 de SEQ ID NO: 56 y una cadena pesada que comprende una región variable de cadena
15 pesada que consiste de residuos de aminoácidos en las posiciones 20 a 136 de SEQ ID NO: 43.

Ejemplos preferidos del anticuerpo que comprende la región variable de cadena ligera y la región variable de cadena pesada descritas en lo anterior pueden incluir un
20 anticuerpo que consiste de una cadena ligera que consiste de residuos de aminoácidos en las posiciones 21 a 234 de SEQ ID NO: 56 y una cadena pesada que consiste de residuos de aminoácidos en las posiciones 20 a 466 de SEQ ID NO: 62, un anticuerpo que consiste de una cadena ligera que consiste de
25 residuos de aminoácidos en las posiciones 21 a 234 de SEQ ID

N0: 58 y una cadena pesada que consiste de residuos de aminoácidos en las posiciones 20 a 466 de SEQ ID N0: 62, un anticuerpo que consiste de una cadena ligera que consiste de residuos de aminoácidos en las posiciones 21 a 234 de SEQ ID

5 N0: 60 y una cadena pesada que consiste de residuos de aminoácidos en las posiciones 20 a 466 de SEQ ID N0: 62, un anticuerpo que consiste de una cadena ligera que consiste de residuos de aminoácidos en las posiciones 21 a 234 de SEQ ID

10 N0: 56 y una cadena pesada que consiste de residuos de aminoácidos en las posiciones 20 a 466 de SEQ ID N0: 64, un anticuerpo que consiste de una cadena ligera que consiste de residuos de aminoácidos en las posiciones 21 a 234 de SEQ ID

15 N0: 56 y una cadena pesada que consiste de residuos de aminoácidos en las posiciones 20 a 466 de SEQ ID N0: 66, y un anticuerpo que consiste de una cadena ligera que consiste de residuos de aminoácidos en las posiciones 21 a 234 de SEQ ID

N0: 56 y una cadena pesada que consiste de residuos de aminoácidos en las posiciones 20 a 466 de SEQ ID N0: 43.

Para evitar la citotoxicidad contra células normales que

20 expresan el Orai1 humano, es deseable que un anticuerpo deba tener actividad efectora baja. La actividad efectora se sabe que difiere entre las subclases de anticuerpos. Se observan las siguientes características, por ejemplo, IgG4 tiene ADCC baja y actividades CDC, e IgG2 tiene actividad CDC, pero

25 tiene actividad ADCC baja. Sobre la base de estas

características, es posible preparar un anticuerpo con ADCC reducida y actividades de CDC al reemplazar las regiones constantes de IgG1 con las regiones constantes de IgG2 o IgG4. También, es posible preparar un anticuerpo IgG1 con actividades ADCC y CDC reducidas al sustituir parcialmente las secuencias de región constante de la IgG1 con referencia a IgG2 o IgG4. Como ejemplo, Marjan Hezareh y colaboradores, Journal of Virology, 75 (24): 12161-12168 (2001) muestra que las actividades ADCC y CDC de IgG1 se reducen al reemplazar cada uno de los residuos de leucina en las posiciones 234 y 235 (las posiciones son indicadas por el índice de EU de Kabat y colaboradores) de IgG1 con un residuo de alanina.

Ejemplos de la cadena pesada del anticuerpo anti-Orai1 preparados por el método descrito en lo anterior pueden incluir una secuencia de cadena pesada mostrada en SEQ ID NO: 68 o 70. La cadena pesada mostrada en SEQ ID NO: 68 o 70 se puede combinar con cada secuencia de cadena ligera descrita en la presente descripción y se usa como un anticuerpo terapéutico. Ejemplos específicos de la cadena ligera que se combina pueden incluir la cadena ligera descrita en SEQ ID NO: 31, 33, 35, 37, 56, 58, o 60. Ejemplos del anticuerpo que tiene una combinación preferida de la cadena ligera y la cadena pesada pueden incluir un anticuerpo que consiste de una cadena ligera que consiste de residuos de aminoácidos en las posiciones 21 a 234 de SEQ ID NO: 56 y una cadena pesada

que consiste de residuos de aminoácidos en las posiciones 20 a 466 de SEQ ID NO: 70, un anticuerpo que consiste de una cadena ligera que consiste de residuos de aminoácidos en las posiciones 21 a 234 de SEQ ID NO: 58 y una cadena pesada que
5 consiste de residuos de aminoácidos en las posiciones 20 a 466 de SEQ ID NO: 70, y un anticuerpo que consiste de una cadena ligera que consiste de residuos de aminoácidos en las posiciones 21 a 234 de SEQ ID NO: 60 y una cadena pesada que consiste de residuos de aminoácidos en las posiciones 20 a
10 466 de SEQ ID NO: 70.

Se sabe que los residuos de lisina carboxilo-terminales se suprimen en las cadenas pesadas de los anticuerpos producidos en las células de mamífero cultivadas (Journal of Chromatography A, 705: 129-134 (1995)). También se sabe que
15 dos residuos de aminoácidos carboxilo-terminales (glicina lisina) se suprimen en las cadenas pesadas, y un residuo de prolina recientemente colocado en la carboxilo-terminal se amida (Analytical Biochemistry, 360: 75-83 (2007)). Sin embargo, esta supresión y modificación de las secuencias de
20 cadena pesada no tienen influencia en la capacidad del anticuerpo de ligarse al antígeno y las funciones efectoras (activación del complemento y efecto citotóxico celular dependiente de anticuerpo, etc.) del anticuerpo. De esta manera, el anticuerpo de la presente invención también
25 incluye un anticuerpo modificado de esta manera. Ejemplos de

los mismos pueden incluir un mutante de supresión obtenido por la supresión de 1 o 2 aminoácidos en la carboxilo-terminal de cadena pesada, y una forma amidada de este mutante de supresión (por ejemplo, una cadena pesada amidada en el residuo de prolina en el sitio carboxilo-terminal). Sin embargo, el mutante de supresión de carboxi-terminal de la cadena pesada del anticuerpo de acuerdo con la presente invención no se limita a los tipos descritos en lo anterior siempre y cuando el mutante de supresión mantenga la capacidad de ligarse al antígeno y a las funciones efectoras. Dos cadenas pesadas que constituyen el anticuerpo de acuerdo con la presente invención pueden ser cualquiera de un tipo de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste de cadenas pesadas de longitud completa y las cadenas pesadas de los mutantes de supresión descritas en lo anterior y o pueden ser una combinación de cualquiera de dos tipos seleccionados de los mismos. La relación cuantitativa de cada mutante de supresión se puede incluir por el tipo y condiciones de cultivo de las células de mamífero cultivadas que producen el anticuerpo de acuerdo con la presente invención. Ejemplos del componente principal del anticuerpo de acuerdo con la presente invención pueden incluir dos cadenas pesadas, ambas de las cuales carecen de un residuo de aminoácido carboxi-terminal. Específicamente, una cadena pesada que consiste de residuos de aminoácido en las posiciones 20 a 465 en una

secuencia de cadena pesada mostrada en cada una de las SEQ ID
N0s: 27, 29, 39, 41, 43, 45, 62, 64, 66, 68, y 70 del Listado
de Secuencias, o una cadena pesada que consiste de residuos
de aminoácidos en las posiciones 20 a 464 en la misma también
5 se pueden usar en el anticuerpo de la presente invención.

Los anticuerpos obtenidos por estos métodos se pueden
evaluar por su actividad de ligación contra el antígeno para
seleccionar un anticuerpo adecuado. Un ejemplo de otro índice
para comparar las propiedades de anticuerpos. Pueden incluir
10 la estabilidad del anticuerpo. La calorimetría de exploración
diferencial (DSC) es un método capaz de medir rápida y
precisamente un punto medio de desnaturalización térmica
(T_m), que sirve como un buen índice para la estabilidad
estructural relativa de las proteínas. Los valores se pueden
15 medir usando DSC y se comparan para determinar la estabilidad
de calor distintivo. La estabilidad de almacenamiento de un
anticuerpo se sabe que se correlaciona con la estabilidad de
calor del anticuerpo a algún grado (Lori Burton, y
colaboradores, Pharmaceutical Development and Technology
20 (2007) 12, p. 265-273). Un anticuerpo adecuado se puede
seleccionar con estabilidad térmica como un índice. Ejemplos
de otros índices para seleccionar el anticuerpo pueden
incluir altos rendimientos en células hospederas apropiadas,
y baja agregación en una solución acuosa. Por ejemplo, puesto
25 que no siempre es verdad que un anticuerpo que tiene el

rendimiento más alto muestre la estabilidad térmica más alta, un anticuerpo que debe ser adecuado para la administración a humanos tiene que ser seleccionado por juicio sintético basado en los índices mencionados en lo anterior.

5 Un método para obtener una inmunoglobulina de cadena individual al ligar las secuencias de cadena pesada y ligera de longitud completa del anticuerpo a través de un ligador apropiado también se muestra (Lee, H-S, y colaboradores, Molecular Immunology (1999) 36, p. 61-71; y Schirrmann, T. y
10 colaboradores, mAbs (2010), 2 (1), p. 73-76). Esta inmunoglobulina de cadena individual se puede dimerizar para mantener de esta manera una estructura y actividades similares a aquellas del anticuerpo, que es originalmente un tetrámero. También, el anticuerpo de la presente invención
15 puede ser un anticuerpo que tiene una región variable de cadena pesada individual y no tiene una secuencia de cadena ligera. Este anticuerpo, llamado un anticuerpo de dominio individual (sdAb) o nanocuerpo, se ha observado actualmente en camellos y llamas y se ha reportado por mantener la
20 estabilidad a la ligación al antígeno (Muyldemans S. y colaboradores, Protein Eng. (1994) 7 (9), 1129-35; y Hamers-Casterman C. y colaboradores, Nature (1993) 363 (6428), 446-8). Estos anticuerpos se pueden interpretar como una clase de fragmento de ligación a antígeno del anticuerpo de acuerdo
25 con la presente invención.

La actividad citotóxica celular dependiente de anticuerpo del anticuerpo de la presente invención se puede mejorar al ajustar la modificación de una cadena de azúcar ligada al anticuerpo. Por ejemplo, los métodos descritos en 5 W099/54342, W000/61739, y W002/31140 son conocidos como ejemplos de esta técnica para ajustar una modificación de cadena de azúcar de un anticuerpo, aunque esta técnica no se limita a la misma.

En el caso de preparar un anticuerpo al aislar 10 temporalmente el gen de anticuerpo y después al transferir el gen a un hospedero apropiado, el hospedero apropiado se puede usar en combinación con un vector de expresión. Ejemplos específicos del gen de anticuerpo pueden incluir una combinación de un gen que codifica una secuencia de cadena 15 pesada y un gen que codifica una secuencia de cadena ligera del anticuerpo descrito en la presente descripción. Para la transformación de las células hospederas, el gen de secuencia de cadena pesada y el gen de secuencia de cadena ligera se pueden insertar en el mismo vector de expresión o se pueden 20 insertar en vectores de expresión separados. En caso de usar células eucariotas hospederas, se pueden usar células animales, células vegetales o microbios eucariotas. Ejemplos de las células animales pueden incluir células de mamífero, por ejemplo, células COS de mono (Gluzman, Y., Cell (1981) 25 23, p. 175-182, ATCC CRL-1650), fibroblasto de ratón NIH3T3

(ATCC No. CRL-1658), y líneas deficientes de dihidrofolato reductasa (Urlaub, G. and Chasin, L.A., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1980) 77, p. 4126-4220) de células de ovario de hámster chino (células CHO, ATCC CCL-61). En caso de usar
5 células procariotas, ejemplos de los mismas pueden incluir *E. coli* y *Bacillus subtilis*. El gen de anticuerpo de interés se transfiere a estas células por transformación, y las células transformadas se cultivan *in vitro* para obtener el anticuerpo. Este método de cultivo puede diferir en
10 rendimiento dependiendo de la secuencia del anticuerpo. Un anticuerpo que es fácil de producir como un fármaco se puede seleccionar, al usar su rendimiento como un índice, entre anticuerpos que tienen actividad de ligación equivalente.

Ejemplos del isotipo del anticuerpo de la presente
15 invención pueden incluir, pero no se limitan a, IgG (IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4), IgM, IgA (IgA1 e IgA2), IgD, e IgE. El isotipo puede ser de manera preferente IgG o IgM, de manera más preferente IgG1 o IgG2.

El anticuerpo de la presente invención puede ser un
20 fragmento de ligación a antígeno del anticuerpo que tiene el sitio de ligación a antígeno del anticuerpo, o una forma modificada del mismo. El fragmento de anticuerpo se puede obtener al tratar el anticuerpo con una enzima proteolítica tal como papaína o pepsina o al expresar un gen de anticuerpo
25 genéticamente modificado en las células cultivadas

apropiadas. Entre estos fragmentos de anticuerpo, un fragmento que mantiene la totalidad o una porción de las funciones poseídas por la molécula de longitud completa del anticuerpo puede ser referido como un fragmento de ligación a
5 antígeno del anticuerpo.

Ejemplos de las funciones del anticuerpo pueden incluir en general actividad de ligación a antígeno, la actividad para neutralizar la actividad del antígeno, la actividad para mejorar la actividad del antígeno, actividad citotóxica
10 celular dependiente de anticuerpo, actividad citotóxica dependiente de complemento, y actividad citotóxica celular dependiente de complemento. La función poseída por el fragmento de ligación a antígeno del anticuerpo de acuerdo con la presente invención es la actividad de ligación contra
15 Orai1 y es de manera preferente la actividad de inhibición de la activación de las células T, de manera más preferente la actividad de inhibición de la producción de IL-2 y/o interferón γ por las células T.

Ejemplos del fragmento del anticuerpo pueden incluir
20 Fab, F(ab')₂, Fv, Fv de cadena individual (scFv) que comprenden las Fvs de cadena pesada y ligera ligadas a través de un ligador apropiado, diacuerpos, anticuerpos lineales, y anticuerpo multiespecíficos formados de fragmentos de anticuerpos. El fragmento del anticuerpo también incluye
25 Fab', que es un fragmento monovalente de las regiones

variables del anticuerpo obtenidas por el tratamiento de $F(ab')_2$ bajo condiciones reductoras.

El anticuerpo de la presente invención puede ser un anticuerpo multiespecífico que tiene especificidad para al menos dos tipos diferentes de antígenos. Esta molécula se liga usualmente a dos tipos de antígenos (es decir, un anticuerpo biespecífico). El "anticuerpo multiespecífico" de acuerdo con la presente invención abarca un anticuerpo que tiene especificidad para más tipos (por ejemplo, 3 tipos) de antígenos.

El anticuerpo multiespecífico de la presente invención puede ser un anticuerpo que consiste de un anticuerpo de longitud completa, o puede ser un fragmento de este anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo biespecífico $F(ab')_2$). El anticuerpo biespecífico se puede preparar al ligar las cadenas pesadas y ligeras (pares HL) de dos tipos de anticuerpos, o se puede preparar al fusionar hibridomas que producen diferentes anticuerpos monoclonales para preparar células de fusión que producen el anticuerpo biespecífico (Millstein y colaboradores, Nature (1983) 305, p. 537-539).

El anticuerpo de la presente invención puede ser un anticuerpo de cadena individual (Fv de cadena individual; también referido como "scFv"). El scFv se obtiene al ligar las regiones variables de cadena pesada y ligera del anticuerpo a través de un ligador de un polipéptido

(Pluckthun, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, 113 (Rosenberg and Moore ed., Springer Verlag, New York, p. 269-315 (1994); y *Nature Biotechnology* (2005), 23, p. 1126-1136). También, un fragmento biscFv preparado al ligar dos scFvs a través de un ligador de polipéptido también se puede usar como un anticuerpo biespecífico.

El método para preparar el scFv es bien conocido en la técnica (ver por ejemplo, Patentes de E.U.A. Nos. 4,946,778, 5,260,203, 5,091,513, y 5,455,030). En este scFv, la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera se ligan a través de un ligador, de manera preferente un ligador de polipéptido, que les impide formar un conjugado (Huston, J.S. y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1988), 85, p. 5879-5883). La región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera en el scFv se pueden derivar del mismo anticuerpo o se pueden derivar de diferentes anticuerpos. Por ejemplo, un péptido de cadena ligera individual arbitrario que consiste de 12 a 19 residuos se usa como el ligador de polipéptido que liga estas regiones variables.

A fin de obtener el ADN que codifica el scFv, cada porción de ADN que codifica la secuencia de aminoácidos completa o deseada en las secuencias de ADN que codifican la cadena pesada o la región variable de cadena pesada del anticuerpo y el ADN que codifica la cadena ligera o la región

variable de cadena ligera de la misma, se usa como una plantilla y es amplificado por la PCR usando un par de cebadores que flanquean ambos extremos de la plantilla. Subsecuentemente, el ADN que codifica la porción ligadora de polipéptido se amplifica adicionalmente en combinación con un par de cebadores que flanquean ambos extremos del ADN de modo que el fragmento obtenido se puede ligar en sus extremos a los ADNs de cadena pesada y ligera, respectivamente.

Una vez que el ADN que codifica el scFv se prepara, un vector de expresión que contiene el ADN y un hospedero transformado con el vector de expresión se pueden obtener de acuerdo con los métodos de rutina. Además, el hospedero se puede usar para obtener el scFv de acuerdo con los métodos de rutina. Estos fragmentos de anticuerpos se pueden producir por un hospedero de la misma manera como en lo anterior al obtener y al expresar el gen.

El anticuerpo de la presente invención se puede multimerizar para mejorar de esta manera su afinidad para el antígeno. Los anticuerpos del mismo tipo se pueden multimerizar, o una pluralidad de anticuerpos que reconocen una pluralidad de epítomos, respectivamente, del mismo antígeno se puede multimerizar. Ejemplos de un método para multimerizar estos anticuerpos pueden incluir la ligación de dos scFvs a un dominio IgG CH3, la ligación del mismo a estreptavidina, y la introducción de un motivo de hélice-

vuelta-hélice.

El anticuerpo de la presente invención puede ser un anticuerpo policlonal que es una mezcla de tipos plurales de anticuerpos anti-Orai1 que difieren en la secuencia de aminoácidos. Un ejemplo del anticuerpo policlonal puede incluir una mezcla de tipos plurales de anticuerpos que difieren en CDRs. Un anticuerpo obtenido al cultivar una mezcla de células que producen anticuerpos diferentes, seguido por purificación de los cultivos se puede usar como un anticuerpo policlonal (ver W02004/061104).

Un anticuerpo conjugado con cualquiera de las diversas moléculas tal como polietilenglicol (PEG) también se puede usar como una forma modificada del anticuerpo.

El anticuerpo de la presente invención puede ser adicionalmente cualquiera de los conjugados formados por estos anticuerpos con otros fármacos (inmunoconjugados). Ejemplos de este anticuerpo puede incluir el anticuerpo conjugado con un material radioactivo o un compuesto que tiene un efecto farmacológico (Nature Biotechnology (2005) 23, p. 1137-1146).

El anticuerpo obtenido se puede purificar hasta que sea homogéneo. Se pueden usar métodos de separación y purificación de proteínas usuales para la separación y purificación del anticuerpo. El anticuerpo se puede separar y purificar por procedimiento(s) aproximadamente

seleccionados o combinados, por ejemplo, cromatografía de columna, filtración a través de un filtro, ultrafiltración, eliminación de sal, diálisis, electroforesis en gel de poliacrilamida preparativa, y/o
5 enfoque isoelectrico (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual, Daniel R. Marshak y colaboradores eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996); and Antibodies: A Laboratory Manual. Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor
10 Laboratory (1988)), aunque el método de separación y purificación no se limita a los mismos.

Ejemplos de esta cromatografía pueden incluir cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrofóbica, cromatografía de
15 filtración en gel, cromatografía en fase inversa, y cromatografía de adsorción. Estos procedimientos de cromatografía se pueden llevar a cabo usando cromatografía líquida tal como HPLC o FPLC. Ejemplos de la columna para el uso en la cromatografía de afinidad pueden incluir columnas
20 de proteína A y columnas de proteína G. Ejemplos de las columnas de la proteína A pueden incluir Hyper D, POROS, y Sepharose F.F. (Pharmacia Corp.). También, el anticuerpo se puede purificar mediante el uso de su actividad de ligación contra el antígeno usando un portador inmovilizado con
25 antígeno.

3. Fármaco que contiene el anticuerpo anti-Orai1

Un anticuerpo que neutraliza la actividad biológica del Orai1 se puede obtener de entre los anticuerpos anti-Orai1 obtenidos por los métodos descritos en el párrafo anterior

5 "2. Producción del anticuerpo anti-Orai1". Este anticuerpo, que neutraliza la actividad biológica de Orai1, puede inhibir la actividad biológica *in vivo* de Orai1, es decir, la activación de los canales de calcio activados por liberación de calcio (canales CRAC) de las células que expresan Orai1

10 tipificadas por las células T y mastocitos, y como tales, se pueden usar farmacéuticamente como un agente terapéutico y/o profiláctico para enfermedades provocadas por la activación de los canales CRAC de estas células.

Las enfermedades o afecciones provocadas por la

15 activación del canal CRAC incluyen rechazo de trasplantes, enfermedades relacionadas inmunitarias. Enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias, trombosis, y cánceres, etc.

Ejemplos del tratamiento y/o prevención de rechazo de

20 trasplantes incluyen el tratamiento y/o prevención de respuestas de rechazo y reacciones de hospedero versus injerto al trasplante de un órgano o un tejido tal como el corazón, los riñones, el hígado, médula ósea, o piel, y enfermedad de injerto versus hospedero provocada por el

25 trasplante de células hematopoyéticas (médula ósea, sangre

periférica, sangre del cordón umbilical, etc.).

Los ejemplos de enfermedades relacionadas inmunitarias incluyen enfermedades de tejido conjuntivo o musculoesqueléticas (artritis reumatoide, espondilitis 5 anquilosante, lupus eritematoso sistémico, escleroderma, polimiositis, dermatomiositis, etc.), enfermedades hematológicas (anemia aplásica, púrpura trombocitopénica idiopática, etc.), enfermedades gastrointestinales (enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, etc.), enfermedades 10 neurológicas (esclerosis múltiple, miastenia grave, etc.), enfermedades oftálmicas (uveítis, etc.), enfermedades vasculares (enfermedad de Behcet, granulomatosis de Wegener, etc.), enfermedades epidérmicas (psoriasis, pénfigo, leucoderma, etc.), y enfermedades endocrinas (diabetes 15 mellitus tipo 1, tiroiditis autoinmunitaria, enfermedad de Graves, enfermedad de Hashimoto, etc.),

Los ejemplos de las enfermedades alérgicas incluyen dermatitis atópica, asma, anafilaxis, reacción anafilactoide, alergia a alimentos, rinitis, otitis media, reacción a 20 fármacos, reacción a piquetes de insectos, reacción a plantas, alergia al látex conjuntivitis, y urticaria.

Ejemplos de las enfermedades inflamatorias incluyen enfermedades renales inflamatorias (glomerulonefritis, nefrosis, etc.), enfermedades pulmonares inflamatorias 25 (enfermedad pulmonar obstructiva crónica, fibrosis cística,

neumonía intersticial, etc.), enfermedades intestinales antiinflamatorias (colitis ulcerativa, ileitis, etc.), enfermedades hepáticas inflamatorias (hepatitis autoinmunitaria, hepatitis viral, etc.), enfermedades
5 cardíacas inflamatorias (miocarditis, enfermedad cardíaca isquémica, aterosclerosis, etc.), enfermedades de la piel inflamatorias (dermatitis por contacto, eccema, etc.), enfermedades oculares inflamatorias (tracoma, endoftalmitis, etc.), enfermedades nerviosas centrales inflamatorias
10 (meningitis, encefalomiелitis, encefalitis autoinmunitaria, etc.), enfermedades articulares inflamatorias (artritis, osteoartritis, etc.), e inflamaciones sistémicas (septicemia, hemorragia, hipersensibilidad, síntomas de choque atribuidos a quimioterapia de cáncer o similares, etc.).

15 Los ejemplos de casos en los cuales la actividad antiplaquetas o anti-trombótica son útiles para el tratamiento y/o prevención son infarto al miocardio, apoplejía, enfermedades cardíacas isquémicas y trombosis.

Ejemplos de tratamiento de cánceres incluyen cáncer de
20 mama, cáncer de pulmón, cáncer de piel y leucemia.

Ejemplos adicionales de las enfermedades que se pueden tratar por el anticuerpo de la presente invención incluyen: afecciones patológicas que implican mastocitos y basófilos, tales como leucemia de mastocitos, mastocitos, leucemia
25 basofílica, y endometriosis; y miopatía agregada tubular,

síndrome de Stormorken, artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, y dermatitis atópica, que se desarrollan o cuyo riesgo de desarrollo se incrementa por la función y genética de los canales CRAC.

5 Los ejemplos del anticuerpo anti-Orai1 como el fármaco pueden incluir anticuerpos humanizados preparados del anticuerpo R118 y/o el anticuerpo R198, y forman modificadas de CDR de las mismas.

La actividad neutralizante *in vitro* del anticuerpo anti-Orai1 contra la actividad biológica de Orai1 se puede medir sobre la base de, por ejemplo, la actividad anti-inhibidora contra la activación de células que expresan Orai1. Por ejemplo, el anticuerpo anti-Orai1 se agrega en concentraciones variantes a la línea de células derivadas de células T humanas, células Jurkat, y la actividad inhibidora contra la liberación de IL-2 de las células Jurkat estimuladas con PMA y A23187 se puede medir. También, el anticuerpo anti-Orai1 se agrega en concentraciones variantes a las células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC), y la actividad inhibidora contra la liberación de IL-2 e interferón γ de PBMC estimuladas con PMA A23187 se puede medir.

Es un hecho experimentalmente probado, y ampliamente reconocido, que las células responsables por el desarrollo de la enfermedad de injerto versus hospedero son células T.

Cuando las células T trasplantadas reconocen el recipiente como materia extraña, la autopropagación basada en la interleucina 2 (IL-2) producida por las mismas, y la liberación de las citocinas inflamatorias tales como interferón gamma (IFN- γ) por la activación provocan una reacción de inflamación inmunológica sistémica, dando por resultado el desarrollo de enfermedad de injerto versus hospedero. De esta manera, la inhibición de la producción de estas citocinas conduce a la prevención o tratamiento de la enfermedad de injerto versus hospedero, mientras que la utilidad del anticuerpo anti-Orai1 como un fármaco terapéutico se puede determinar al usar su actividad inhibidora como un índice.

Ejemplos preferidos del anticuerpo de acuerdo con la presente invención pueden incluir un anticuerpo o un fragmento de ligación a antígeno del anticuerpo que se liga específicamente a la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2, en donde la concentración en la cual la cantidad de IL-2 liberada de células Jurkat tratadas con PMA y A23187 se inhibe por 50% es 80 ng/mL o más baja. Ejemplos más preferidos de este anticuerpo pueden incluir el anticuerpo o fragmento de ligación a antígeno del anticuerpo, en donde la concentración en la cual la cantidad de IL-2 liberada de las células Jurkat tratadas con PMA y A23187 se inhibe por 50% es 10 ng/mL o más baja. El anticuerpo de la

presente invención también incluye un anticuerpo o un fragmento de ligación a antígeno del anticuerpo, en donde la concentración en la cual la cantidad de IL-2 liberada de Las células Jurkat tratadas con PMA y A23187 se inhibe por 80% es 60000 ng/mL o más baja, y un anticuerpo o un fragmento de ligación a antígeno del anticuerpo, en donde la concentración en la cual la cantidad de IL-2 liberada de las células Jurkat tratadas con PMA y A23187 se inhibe por 80% es 200 ng/mL o más baja.

10 Ejemplos preferidos alternativos del anticuerpo de acuerdo con la presente invención pueden incluir un anticuerpo o un fragmento de ligación a antígeno del anticuerpo que se liga específicamente a la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2, en donde la
15 concentración en la cual la cantidad de IL-2 liberada de PBMC humanas tratadas con PMA y A23187 se inhibe por 50% es 100 ng/mL o más baja. Ejemplos más preferidos de este anticuerpo pueden incluir el anticuerpo o fragmento de ligación a antígeno del anticuerpo, en donde la concentración en la cual
20 la cantidad de IL-2 liberada de PBMC humanas tratadas con PMA y A23187 se inhibe por 50% es 20 ng/mL o más baja. El anticuerpo de la presente invención también puede incluir un anticuerpo o un fragmento de ligación a antígeno del anticuerpo, en donde la concentración en la cual la cantidad
25 de IL-2 liberada de PBMC humanas tratadas con PMA y A23187 se

inhibe por 80% es 17000 ng/mL o más baja, y un anticuerpo o un fragmento de ligación a antígeno del anticuerpo, en donde la concentración en la cual la cantidad de IL-2 liberada de PBMC humanas tratadas con PMA y A23187 se inhibe por 80% es 5 400 ng/mL o más baja.

Ejemplos preferidos alternativos adicionales del anticuerpo de acuerdo con la presente invención pueden incluir un anticuerpo o un fragmento de ligación a antígeno del anticuerpo que se liga específicamente a la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2, en donde la 10 concentración en la cual la cantidad de IFN- γ liberada de PBMC humanas tratadas con PMA y A23187 se inhibe por 50% es 800 ng/mL o más baja. Ejemplos más preferidos de este anticuerpo pueden incluir el anticuerpo o fragmento de 15 ligación a antígeno del anticuerpo, en donde la concentración en la cual la cantidad de IFN- γ liberada de PBMC humanas tratadas con PMA y A23187 se inhibe por 50% es 40 ng/mL o más baja. El anticuerpo de la presente invención puede incluir un anticuerpo o un fragmento de ligación a antígeno del 20 anticuerpo, en donde la concentración en la cual la cantidad de IFN- γ liberada de PBMC humanas tratadas con PMA y A23187 se inhibe por 80% es 300000 ng/mL o más baja, y un anticuerpo o un fragmento de ligación a antígeno del anticuerpo, en donde la concentración en la cual la cantidad de IFN- γ 25 liberada de PBMC humanas tratadas con PMA y A23187 se inhibe

por 80% es 2000 ng/mL o más baja.

El efecto terapéutico profiláctico *in vivo* del anticuerpo anti-Orai1 en la enfermedad de injerto versus hospedero en un animal de laboratorio se puede confirmar, por ejemplo, al medir la inhibición de la pérdida de peso en un modelo de enfermedad de injerto versus hospedero de ratón trasplantado con PBMC humanas. Específicamente, los ratones NOG o NSG, que son ratones inmunodeficientes diversamente combinados, se irradian con rayos X de 2.0 Gy. Al siguiente día, 200 µL de una solución de PBS que contiene 15,000,000 a 50,000,000 de células de PBMC humanas por mL se trasplanta cada ratón a través de la vena de la cola. Un grupo de ratones irradiados con rayos X que no ha recibido las PBMC humanas se usa como un grupo de enfermedad no de injerto versus hospedero, y un grupo trasplantado con PBMC humanas administrado solamente con una solución de vehículo para el anticuerpo se usa como un grupo de enfermedad de injerto versus hospedero. Antes o después del trasplante de PBMC humanas, el anticuerpo anti-Orai1 se administra ya sea intravenosamente a la cola o intraperitonealmente para medir el efecto inhibidor en la pérdida de peso en el grupo de enfermedad de injerto versus hospedero.

Además, el efecto terapéutico profiláctico del anticuerpo anti-Orai1 en varias enfermedades también se puede confirmar por los siguientes sistemas de evaluación *in vivo*

usando un ratón inactivado de Orai1 humano.

Para el efecto en la dermatitis, una solución de antígeno de proteína se administra intraperitoneal o intravenosamente a un ratón, y después de 2 semanas, el
5 antígeno se inyecta al mismo como un refuerzo. Después, la misma solución de antígeno de proteína como en lo anterior se aplica repetitivamente a la oreja o en el lomo 3 a 6 veces en intervalos de 3 días a 2 semanas para provocar la dermatitis. El efecto en la dermatitis se evalúa al comparar el espesor
10 de la aurícula, la puntuación macroscópica de dermatitis en el lomo, las concentraciones del anticuerpo, citocinas, o biomarcadores en suero en la sangre o tejidos, y la actividad de crecimiento, la capacidad de producción de citocinas, o antígenos superficiales de células obtenidas de la piel,
15 sangre periférica, el timo, el bazo, el nodo linfático, o la médula ósea entre un grupo de anticuerpo anti-Orai1 y un grupo no de administración.

Para el efecto en el prurito, una crema de antígeno de ácaros se aplica repetitivamente a la aurícula o el molo 3 a
20 6 veces en intervalos de 3 días a 2 semanas, o un hapteno se aplica a la aurícula, la región abdominal, o el lomo cada dos días a una vez a la semana, o una sustancia que induce el prurito se administra intracutáneamente a la aurícula, subcutáneamente a la espalda, o por la vía intratecal. La
25 acción prurítica inducida por este método se cuantifica al

medir el número de eventos pruríticos usando imanes unidos al dorso de ambas patas del ratón y un aparato de medición de acción prurítica o al examinar los signos patológicos en la piel, sangre periférica o tejidos de la médula espinal. El
5 efecto en el prurito se evalúa al comparar los resultados obtenidos entre un grupo de anticuerpos anti-Orai1 y un grupo no de administración.

Para el efecto en la psoriasis, se aplica imiquimod a ambos lados o un lado de la aurícula y el lomo afeitado, o
10 una suspensión de zymosan se administra intraperitonealmente, o una citocina tal como IL-23 se administra intracutáneamente a un lado de la aurícula del ratón. La dermatitis psoriática inducida por este método se cuantifica por el examen del peso y espesor de un sitio de inflamación, la actividad de
15 mieloperoxidasa de los neutrófilos infiltrados en el sitio, el análisis de citometría de flujo de las células infiltradas, el análisis génico, la medición de concentración de citocinas, etc. El efecto en la psoriasis se evalúa al comparar los resultados obtenidos entre un grupo de
20 anticuerpo anti-Orai1 y un grupo no de administración.

Para el efecto en la esclerosis múltiple, una solución de glicoproteína de oligodendrocito de mielina o un antígeno de péptido parcial del mismo se emulsiona al mezclarse con una solución acuosa de un adyuvante completo de Freund en
25 cantidades iguales. Esta emulsión se administra

intracutáneamente al flanco o región abdominal de un ratón. Después, una solución de toxina de pertussis acuosa se administra a la vena la de cola. Después de algunos días, la solución de toxina de pertussis se administra adicionalmente
5 otra vez a la vena de la cola para inducir la encefalomiелitis experimental. Los síntomas de parálisis que se desarrollan después de 1 semana a 2 semanas del experimento y se expanden de la cola hasta las patas inferiores y las extremidades anteriores se clasifica por la
10 observación macroscópica. El efecto en la esclerosis múltiple se evalúa al comparar los resultados obtenidos entre un grupo de anticuerpo anti-Orai1 y un grupo no de administración.

Para el efecto en la artritis, una emulsión obtenida al mezclar colágeno tipo II de bovino y un adyuvante completo de
15 Freund se administra intracutáneamente a la base de la cola del ratón. Después de 2 a 3 semanas, la misma administración como en lo anterior se lleva a cabo. Después, el efecto en la artritis se evalúa al comparar la puntuación del hinchamiento de la articulación, las concentraciones del anticuerpo,
20 citocinas, o biomarcadores en suero en la sangre o tejidos, la actividad de crecimiento, capacidad de producción de citocinas, o antígenos superficiales de las células obtenidas de la piel, sangre periférica, el timo, el bazo, el nodo linfático, o la médula ósea, etc., entre un grupo de
25 anticuerpo anti-Orai1 y un grupo no de administración.

Para el efecto en la colitis, se administra ácido trinitrobencenosulfónico en el tracto intestinal de un ratón puesto en ayunas durante 24 horas, o al ratón se le permite beber libremente una solución acuosa que contiene 1 a 10% de sulfato de dextrano sódico de una botella de alimentación de agua durante 4 días a 2 semanas, o células T CD4+CD25-CD45RBhi recolectadas y purificadas del nodo linfático y el bazo de un ratón inactivado de Orai1 humano se trasplantan intraperitonealmente en un ratón Rag2-/- . El efecto en la colitis inducida por este método se evalúa al comparar el peso corporal durante el período de observación, el grado de espesor del tracto intestinal, el número y tamaño de pólipos, y signos patológicos examinados por autopsia después de la terminación de la prueba, las concentraciones del anticuerpo, citocinas, o biomarcadores en suero en sangre o tejidos, la actividad de crecimiento, la capacidad de producción de citocinas o antígenos superficiales de células obtenidas del tracto intestinal, sangre periférica, el timo, el bazo, el nodo linfático, o la médula ósea, etc., entre un grupo de anticuerpo anti-Orai1 y un grupo no de administración.

Para el efecto en el lupus eritematoso sistémico, albúmina de huevo u otro antígeno no estimulador se administra intraperitoneal o subcutáneamente un máximo de 15 veces en intervalos de 5 a 10 días para inducir síntomas similares a lupus eritematoso sistémico. El efecto en el

lupus eritematoso sistémico se evalúa al comparar las concentraciones del anticuerpo, citocinas, o biomarcadores en suero en la sangre o tejidos recolectados a través del tiempo durante el período de observación, el título del anticuerpo o
5 concentración de biomarcadores en la orina, síntomas inducidos en un ratón no tratado por el trasplante de células preparadas de un órgano tal como el bazo o el nodo linfático recolectado después de la terminación de la prueba, etc., entre un grupo de anticuerpo anti-Orai1 y un grupo no de
10 administración.

Para el efecto en la hepatitis, se administra intraperitonealmente D-galactosamina ya sea sola o en combinación con lipopolisacárido a un ratón, o la concanavalina A se administra intravenosamente sola a la
15 cola. El efecto en la hepatitis inducida por este método se evalúa al comparar las concentraciones de GOT y GPT en la sangre recolectada 1 hora a 1 semana después de la administración de la sustancia causante, y las condiciones histopatológicas de las lesiones hepáticas entre un grupo de
20 anticuerpo anti-Orai1 y un grupo no de administración.

Para el efecto de la tasa de supervivencia de injerto en el trasplante de células de médula ósea o el efecto profiláctico en la enfermedad de injerto versus hospedero, las células dentro de la médula ósea recolectadas del hueso
25 del muslo o la espinilla de un ratón inactivado de Orai1

humano se trasplanta a un ratón recipiente irradiado con rayos X ya sea solo o en combinación con células del bazo recolectadas del bazo del ratón inactivado de Orai1 humano. El efecto en la tasa de supervivencia del injerto o el efecto
5 profiláctico se evalúa al comparar el cambio en el peso corporal o tasas de supervivencia durante 4 a 16 semanas, la concentraciones del anticuerpo, citocinas, o biomarcadores en suero en la sangre o tejido en la terminación de la prueba, y los antígenos superficiales, actividad de crecimiento, o
10 capacidad de producción de citocinas de las células obtenidas del tracto intestinal, sangre periférica, el timo, el bazo, el nodo linfático, o la médula ósea entre un grupo de anticuerpo anti-Orai1 y un grupo no de administración.

Para el efecto en la tasa de supervivencia de injerto de
15 un órgano trasplantado, la piel recolectada de la base de la cola de un ratón hospedero se fija al panniculus carnosus expuesto al cortar la piel en el lomo de un ratón inactivado Orai1 humano. El tamaño del trasplante y su estado de injerto se clasifican durante 4 a 16 semanas después del trasplante.
20 El efecto en la tasa de supervivencia del injerto se evalúa al comparar los resultados obtenidos entre un grupo de anticuerpo anti-Orai1 y un grupo no de administración.

El anticuerpo obtenido de esta manera, que neutraliza la actividad biológica de Orai1, es útil como un fármaco,
25 particularmente, como un anticuerpo para la prevención o

tratamiento de rechazos de trasplantes, enfermedades relacionadas inmunitarias, enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias, trombosis o cánceres, etc.

Como un ejemplo, el anticuerpo anti-Orai1 se puede
5 administrar ya sea solo o en combinación con al menos un agente terapéutico adicional para el tratamiento o prevención de rechazos de trasplantes, enfermedades relacionadas inmunitarias, enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias, trombosis, o cánceres. Ejemplos del agente
10 terapéutico adicional que se pueden administrar en combinación con el anticuerpo anti-Orai1 pueden incluir, pero no se limitan a, antifolatos, inhibidores de calcineurina, esteroides corticales adrenérgicos, globulinas antitimocitos, anti-metabolitos de ácido nucleico, inhibidores de la
15 síntesis de ácido nucleico, antígenos de superficie celular que toman como diana agentes biológicos, y citocinas que toman como diana agentes biológicos o receptores de citocinas.

Ejemplos específicos de estos agentes terapéuticos
20 pueden incluir: metotrexato como el antifolato; ciclosporina y tacrolimo como los inhibidores de calcineurina; metilprednisolona como el esteroide cortical adrenérgico; ciclofosfamida como los inhibidores de la síntesis de ácido nucleico; Zetbulina, linfoglobulina, y timoglobulina como las
25 globulinas antitimocitos; micofenolato mofetil como el

antimetabolito de ácido nucleico; alemtuzumab y rituximab como los antígenos de superficie celular que toman como diana agentes biológicos; e infliximab, etanercept, y rituximab como las citocinas que toman como diana los agentes
5 biológicos o receptores de citocinas.

Dependiendo de las condiciones de los rechazos de trasplantes, enfermedades relacionadas inmunitarias, enfermedades alérgicas, enfermedades inflamatorias, trombosis, o cánceres o el objetivo de tratamiento y/o
10 prevención de los mismos, 2, 3, o más tipos de agentes terapéuticos adicionales se pueden administrar, y estos agentes terapéuticos adicionales se pueden encerrar en la misma preparación y administrar al mismo tiempo el agente terapéutico adicional y el anticuerpo anti-Orai1 se pueden
15 encerrar en la misma preparación y administrar al mismo tiempo. Alternativamente, el anticuerpo anti-Orai1 y el agente terapéutico adicional se pueden encerrar en preparaciones separadas y administrar al mismo tiempo. Adicionalmente, el agente terapéutico adicional y el
20 anticuerpo anti-Orai1 se pueden administrar separadamente en una manera escalonada. Específicamente, el agente terapéutico que contiene el anticuerpo anti-Orai1 o el fragmento de ligación a antígeno del anticuerpo como un ingrediente activo se puede administrar después de la administración del agente
25 terapéutico adicional, o el agente terapéutico adicional se

puede administrar después de la administración del agente terapéutico que contiene el anticuerpo anti-Orai1 o el fragmento de ligación a antígeno del anticuerpo como un ingrediente activo. En el caso de administración para la

5 terapia génica, un gen de un agente terapéutico proteínico y el gen del anticuerpo anti-Orai1 se puede insertar cadena abajo de las regiones promotoras separadas o la misma región promotora e introducir en vectores separados o el mismo vector.

10 El anticuerpo anti-Orai1 o el fragmento del mismo se puede conjugar con un agente terapéutico para producir un conjugado de fármaco tomado como diana descrito en M.C. Garnet, "Targeted drug conjugates: principles and progress", Advanced Drug Delivery Reviews, (2001) 53, 171-216. Para este

15 propósito, la molécula de anticuerpo así como cualquier fragmento de anticuerpo es aplicable siempre y cuando el fragmento de anticuerpo no pierda completamente la propiedad de reconocer células T. Ejemplos del fragmento pueden incluir fragmentos Fab, F(ab')₂, y Fv. Como tal, el anticuerpo y el

20 fragmento se pueden usar en la presente invención. el patrón de conjugación entre el anticuerpo anti-Orai1 o el tratamiento del anticuerpo y el agente terapéutico puede ser cualquiera de diversos patrones descritos en M.C. Garnet, "Targeted drug conjugates: principles and progress", Advanced

25 Drug Delivery Reviews, (2001) 53, 171-216, G.T. Hermanson,

"Bioconjugate Techniques", Academic Press, California (1996), Putnam and J. Kopecek, "Polymer Conjugates with Anticancer Activity", Advances in Polymer Science (1995) 122, 55-123, etc. Ejemplos específicos de los mismos pueden incluir un patrón en el cual el anticuerpo anti-Orai1 y el agente terapéutico se conjugan directamente en una manera química o a través de un espaciador tal como un oligopéptido, y un patrón en el cual el anticuerpo anti-Orai1 y el agente terapéutico se conjugan a través de un portador de fármaco apropiado. Ejemplos de portador de fármaco pueden incluir liposomas y polímeros solubles en agua. Ejemplos de este patrón mediado por estos portadores de fármacos pueden incluir más específicamente un patrón en el anticuerpo y el agente terapéutico se encierran en un liposoma por la conjugación de liposoma y el anticuerpo, y un patrón en el cual el agente terapéutico se conjuga con un polímero soluble en agua (un compuesto que tiene un peso molecular en el orden de 1000 a 100,000) directamente en una manera química o a través de un espaciador tal como un oligopéptido mientras que el anticuerpo se conjuga con el polímero soluble en agua. La conjugación del anticuerpo (o fragmento) con el agente terapéutico o el portador de fármaco (por ejemplo, liposoma y polímero soluble en agua) se puede llevar a cabo por un método bien conocido por aquellas personas expertas en la técnica, por ejemplo, un método descrito en G.T. Hermanson,

"Bioconjugate Techniques", Academic Press, California (1996), and Putnam and J. Kopecek, "Polymer Conjugates with Anticancer Activity", Advances in Polymer Science (1995) 122, 55-123. En encerramiento del agente terapéutico en el
5 liposoma se puede llevar a cabo por un método bien conocido por aquellas personas expertas en la técnica, por ejemplo, un método descrito en D.D. Lasic, "Liposomes: From Physics to Applications", Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam (1993), etc. La conjugación del agente terapéutico con el
10 polímero soluble en agua se puede llevar a cabo por un método bien conocido por aquellas personas expertas en la técnica, por ejemplo, un método descrito en D. Putnam and J Kopecek, "Polymer Conjugates with Anticancer Activity", Advances in Polymer Science (1995) 122, 55-123. El conjugado del
15 anticuerpo (o el fragmento) y un agente terapéutico proteínico (o el fragmento) se pueden preparar por cualquiera de los métodos descritos en lo anterior así como métodos de modificación genética bien conocidos por aquellas personas expertas en la técnica.

20 La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéutico y/o profilácticamente efectiva del anticuerpo anti-Orai1 y un diluyente farmacéuticamente aceptable, vehículo, solubilizante, emulsificante, conservador y/o
25 aditivo.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéutica y/o profilácticamente efectiva del anticuerpo anti-Orai1, una cantidad terapéutica y/o profilácticamente efectiva de al menos un agente terapéutico, y un diluyente farmacéuticamente aceptable, vehículo, solubilizante, emulsificante, conservador y/o aditivo. Ejemplos del agente terapéutico pueden incluir, pero no se limitan a los antifolatos mencionados en lo anterior, inhibidores de calcineurina, esteroides corticales adrenérgicos, globulinas anti-timocitos, anti-metabolitos de ácido nucleico, inhibidores de síntesis ácido nucleico, antígenos de superficie celular que toman como diana agentes biológicos, y citocinas que toman como diana agentes biológicos o receptores de citocinas.

Se prefiere que la sustancia farmacéuticamente aceptable usada en la composición farmacéutica de la presente invención no debe ser toxica a un recipiente de la composición farmacéutica, de manera preferente en términos de una dosis o una concentración administrada.

La composición farmacéutica de la presente invención puede contener materiales farmacéuticos para cambiar o mantener el pH, presión osmótica, viscosidad, transparencia, color, isotonicidad, esterilidad, estabilidad, solubilidad, liberación sostenida, capacidad

de absorción, o permeabilidad. Ejemplos de los materiales farmacéuticos pueden incluir, pero no se limitan a, lo siguiente: aminoácidos tales como glicina, alanina, glutamina, asparagina, arginina, y lisina; agentes antimicrobianos; antioxidantes tales como ácido ascórbico, sulfato de sodio, y bisulfito de sodio; soluciones amortiguadoras tales como fosfato, citrato, o soluciones amortiguadoras de borato, bicarbonato de sodio, y soluciones de Tris-HCl; rellenos tales como manitol y glicina; agentes quelantes tales como ácido etilendiamintetracético (EDTA); agentes formadores de complejo tales como cafeína, polivinilpirrolidina, β -ciclodextrina, e hidroxipropil- β -ciclodextrina; agentes de volumen tales como glucosa, manosa, y dextrina; otros carbohidratos tales como monosacáridos y disacáridos; agentes colorantes; correctores; diluyentes; emulsificantes; polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona; polipéptidos de peso molecular bajo; contraiones formadores de sales; antisépticos tales como cloruro de benzalconio, ácido benzoico, ácido salicílico, timerosal, alcohol fenético, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico, y peróxido de hidrógeno, solventes tales como glicerina, propilenglicol, y polietilenglicol; alcoholes azúcar tales como manitol y sorbitol; agentes de suspensión; agentes tensioactivos

tales como éster de sorbitán, polisorbato tales como polisorbato 20 y polisorbato 80, tritón, trometamina, lecitina, y colesterol; mejoradores de estabilidad tales como sacarosa y sorbitol; mejoradores de elasticidad tal
5 como cloruro de sodio, cloruro de potasio, manitol, y sorbitol; agentes de transporte; excipientes; y/o aditivos farmacéuticos. La cantidad de estos materiales farmacéuticos agregados es de manera preferente de 0.01 a 100 veces, de manera particular, 0.1 a 10 veces el peso
10 del anticuerpo anti-Orai1. Una receta adecuada para la composición farmacéutica en una preparación se puede determinar apropiadamente por aquellas personas expertas en la técnica de acuerdo con una enfermedad aplicable, una vía de administración aplicable, etc.

15 El excipiente o el vehículo en la composición farmacéutica pueden ser líquidos o sólidos. Los excipientes o vehículos apropiados pueden ser otros materiales usualmente usados en el agua inyectable, solución salina fisiológica, líquido cefalorraquídeo artificiales, y administración
20 parenteral. La solución salina fisiológica neutra o solución salina fisiológica que contiene albúmina de suero se puede usar como un vehículo. La composición farmacéutica puede contener una solución amortiguadora Tris de pH 7.0 a 8.5, una solución amortiguadora de acetato de pH 4.0 a 5.5, o una
25 solución amortiguadora de citrato de pH 3.0 a 6.2. Estas

soluciones amortiguadoras también pueden contener sorbitol u otros compuestos. Ejemplos de la composición farmacéutica de la presente invención pueden incluir una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-Orai1, y una
5 composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-Orai1 y al menos un agente terapéutico. La composición farmacéutica de la presente invención se prepara en la forma de un producto secado por congelación o un líquido como un fármaco que tiene una fórmula seleccionada y una pureza
10 requerida. La composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-Orai1, o la composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-Orai1 y al menos un agente terapéutico también se pueden formar como un producto secado por congelación usando un excipiente apropiado tal como
15 sacarosa.

La composición farmacéutica de la presente invención se puede preparar para la administración parenteral o se puede preparar para adsorción en el tracto digestivo a través de una vía oral. La fórmula y concentración de la preparación se
20 puede determinar de acuerdo con el método de administración. Mientras es más alta la afinidad del anticuerpo anti-Orai1 contenido en la composición farmacéutica de la presente invención para el Orai1, es decir, una constante de disociación más baja (valor K_d) para Orai1, es más baja la
25 dosis del anticuerpo anti-Orai1 que puede mostrar eficacia en

un humano. Por lo tanto, la dosis de la composición farmacéutica de la presente invención a un humano también se puede determinar sobre la base de este resultado. La dosis para la administración del anticuerpo anti-Orai1 de tipo humano a un humano es de aproximadamente 0.1 a 100 mg/kg, que se puede administrar una vez por 1 a 180 días.

Ejemplos de la forma de la composición farmacéutica de la presente invención pueden incluir inyecciones incluyendo gotas intravenosas, supositorios, formulaciones transnasales, formulaciones sublinguales, y formulaciones de absorción transdérmica.

Aunque las preparaciones de anticuerpos más aprobadas se administran intravenosamente, la administración subcutánea es frecuentemente más preferida en la práctica médica. En este caso, el volumen se limita de 1.0 a 1.5 mL. Por lo tanto, una solución de anticuerpo que tiene una alta concentración es requerida dependiendo de la dosis. Sin embargo, puesto que una concentración más alta incrementa la viscosidad de la solución de fármaco, puede existir una situación en la cual la solución de fármaco no se puede inyectar mediante el uso de una aguja de inyección que tenga un espesor rutinariamente utilizado, debido a su alta viscosidad. En resumen, en caso de seleccionar una inyección como la forma de la composición farmacéutica, la baja viscosidad es una propiedad importante que se le debe dar la prioridad más alta. De esta manera, un

anticuerpo adecuado se puede seleccionar con la viscosidad como un índice.

EJEMPLOS

A partir de ahora, la presente invención se describirá específicamente con referencia a los Ejemplos. Sin embargo, la presente invención no se propone ser limitada por ellos. Cada procedimiento relacionado con la manipulación de genes en los siguientes ejemplos se llevó a cabo de acuerdo con los métodos descritos en "Molecular Cloning" (Sambrook, J.,
5 Fritsch, E.F. and Maniatis, T., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), o usando reactivos comercialmente disponible o kits de acuerdo con los manuales de instrucciones de los productos comerciales, a menos que se especifique de otra manera.

15 Ejemplo 1 Preparación del anticuerpo anti-Orai1 humano de rata

1)-1 Inmunización

1)-1-1 Construcción del vector de Orai1 humano (pcADN3.1-hOrai1)

20 El clon ORF final (No. de Clon IOH40869, Life Technologies Corp.) clonado en pDONR221 (Life Technologies Corp.) se adquirió y se usó como la secuencia de genes del Orai1 humano. La secuencia de genes se muestra en SEQ ID NO: 1 del Listado de Secuencias, y la secuencia de aminoácidos se
25 muestra en SEQ ID NO: 2 del Listado de Secuencias. También,

el pcADN3.1(+) se modificó en un vector de destino con Gateway Vector Conversion System (Life Technologies Corp.) para preparar el pcADN3.1-DEST. La secuencia de genes se recombinó con pcADN3.1-DEST dentro de la secuencia att usando
5 la mezcla de enzimas Gateway LR Clonase (Life Technologies Corp.) para preparar un vector de expresión Orai1 humano pcADN3.1-hOrai1. El kit EndoFree Plasmid Giga (Qiagen N.V.) se usó en la preparación a gran escala del vector de expresión Orai1 humano.

10 1)-1-2 Inmunización de la rata

Ratas WKY/Izm hembras (Japón SLC, Inc.) se usaron en la inmunización. Primero, ambas patas inferiores de cada rata se pre-trataron con hialuronidasa (Sigma-Aldrich Corp.), y después, pcADN3.1-hOrai1 se inyectó intramuscularmente a esos
15 sitio. Subsecuentemente, la electroporación *in vivo* se llevó a cabo en los sitios usando ECM830 (BTX) y un electrodo de dos agujas. Después de la repetición de la electroporación *in vivo* similar una vez cada dos semanas, el nodo linfático de la rata se recolectó y se usó en la preparación del
20 hibridoma.

1)-2 Preparación del hibridoma

Las células del nodo linfático se fusionaron eléctricamente con las células SP2/0-ag14 de mieloma de ratón usando el Sistema de Producción de Hibridoma Hybrimmune (Cyto
25 Pulse Sciences Inc.). Las células fusionadas se diluyeron con

Medio D de selección ClonaCell-HY (StemCell Technologies Inc.) y se cultivaron. Las colonias de hibridomas que se presentaron se recuperaron para preparar los hibridomas monoclonales. Cada colonia de hibridoma recuperada se
5 cultivó, y el sobrenadante del cultivo de hibridoma obtenido se usó para clasificación de un hibridoma que produce el anticuerpo anti-Orai1 humano.

1)-3 Clasificación primaria por el ELISA de células

1)-3-1 Preparación de la célula que expresa el gen de 10 antígeno para el ELISA celular

Las células HEK293 se prepararon a 7.5×10^5 células/mL en un medio DMEM que contiene 10% de FBS. Las células se transfectaron con pcADN3.1-hOrai1 o pcADN3.1-DEST como un control de acuerdo con los procedimientos de transfección
15 usando Lipofectamine 2000, dispensado a 50 μ l/pocillo a una placa de 96 pocillos (Corning Inc.), y se cultivó a 37°C durante dos noches bajo condiciones de CO₂ al 5% en un medio DMEM que contiene 10% de FBS. Las células transfectadas obtenidas se usaron en el estado unido en el ELISA celular.

20 1)-3-2 ELISA celular

Después de la remoción del sobrenadante de cultivo de las células HEK293 transfectadas con el vector de expresión preparado en el Ejemplo 1)-1-1, cada sobrenadante de cultivo de hibridoma se agregó a las células HEK293 transfectadas con
25 pcADN3.1-hOrai1 o pcADN3.1-DEST, y la placa se incubó a 4°C

durante 1 hora. Las células en los pocillos se lavaron una vez con PBS que contiene 5% de FBS. Después, el anticuerpo Anti-IgG-Peroxidasa de Rata producido en el conejo (Sigma-Aldrich Corp.) diluido 500 veces con PBS que contiene 5% de FBS se agregó al mismo, y la placa se incubó a 4°C durante 1 hora. Las células en los pocillos se lavaron 6 veces con PBS que contiene 5% de FBS. Después, una solución cromogénica OPD (solución OPD (clorhidrato de o-fenilendiamina (Wako Pure Chemicals Industries, Ltd.) y H₂O₂ se disolvieron en concentraciones de 0.4 mg/mL y 0.6% (v/v), respectivamente, en citrato de trisodio 0.05 M y dodecahidrato de fosfato de hidrógeno de disodio 0.1 M, pH 4.5)) se agregó al mismo a 25 µL/pocillo. La reacción de color se llevó a cabo con agitación ocasional se detuvo por la adición de HCl 1 M a 25 µL/pocillo. Después, la absorbancia se midió a 490 nm usando un lector de placas (ENVISION; PerkinElmer, Inc.). A fin de seleccionar un hibridoma que produzca un anticuerpo que se ligue específicamente al Orai1 humano expresado en la superficie de membrana celular, los hibridomas que produjeron un sobrenadante de cultivo que muestran mayor absorbancia para las células HEK293 transfectadas con el vector de expresión pcADN3.1-hOrai1 comparadas con las células HEK293 transfectadas con pcADN3.1-DEST de control se seleccionaron como hibridomas positivos de anticuerpo anti-Orai1 humano.

1)-4 Clasificación secundaria por la citometría de flujo

1)-4-1 Preparación de la célula que expresa el gen de antígeno para el análisis de citometría de flujo

Las células HEK293T se inocularon a 5×10^4 células/cm² sobre un matraz de 225 cm² y se cultivaron durante la noche a 37°C bajo condiciones de CO₂ al 5% en un medio DMEM que contiene 10% de FBS. Al siguiente día, las células HEK293T se transfectaron con pcADN3.1-hOrai1 o pcADN3.1-DEST como un control usando Lipofectamina 2000 y se cultivaron adicionalmente a 37°C durante dos noches bajo condiciones de CO₂ al 5%. Al siguiente día, las células HEK293T transfectadas con el vector de expresión se trataron con TrypLE Express (Life Technologies Corp.), se lavaron con DMEM que contiene 10% de FBS, y después se suspendieron en PBS que contiene 5% de FBS. La suspensión celular obtenida se usó en el análisis de citometría de flujo.

1)-4-2 Análisis de citometría de flujo

La especificidad de ligación a Orai1 humano del anticuerpo producido por cada hibridoma confirmado por ser positivo por el ELISA celular en el Ejemplo 1)-3 se confirmó adicionalmente por la citometría de flujo. Cada suspensión de células HEK293T preparada en el Ejemplo 1)-4-1 se centrifugó para remover el sobrenadante. Después, las células pcADN3.1-DEST transfectadas con HEK293T o las células HEK293T transfectadas con pcADN3.1-hOrai1 se suspendieron mediante la adición del sobrenadante de cultivo de hibridoma y se

incubaron a 4°C durante 1 hora. Las células se lavaron una vez con PBS que contiene 5% de FBS, después se suspendieron por la adición del conjugado Anti-IgG FITC de rata (Sigma-Aldrich Corp.) diluido 500 veces con PBS que contiene 5% de FBS, y se dejó asentar a 4°C durante 1 hora. Las células se lavaron 3 veces con PBS que contiene 5% de FBS y después se volvieron a suspender en PBS que contiene 5% de FBS y 2 µg/mL de 7-aminoactinomicina D (Molecular Probes, Inc.), seguido por la detección usando un citómetro de flujo (FC500; Beckman Coulter Inc.). Los datos se analizaron usando el Flowjo (Tree Star Inc.). Después de la exclusión de células muertas positivas de 7-aminoactinomicina D por acumulación, la intensidad de fluorescencia FITC de las células vivas se graficó como un histograma. Los hibridomas que produjeron una muestra que exhibe un cambio a intensidad de fluorescencia más potente en el histograma de las células HEK293T transfectadas con pcADN3.1-hOrai1 comparadas con el histograma de intensidad de fluorescencia de las células HEK293T transfectadas con pcADN3.1-DEST de control se obtuvieron como hibridomas que producen el anticuerpo anti-Orai1 humano. Como resultado, 225 hibridomas que muestran un cambio significativo se obtuvieron.

1)-5 Isotipificación del anticuerpo

Los anticuerpos R118 y R198, que se sugirieron para ligarse al Orai1 humano en gran medida, se seleccionaron de

entre los anticuerpos anti-Orai1 humano de rata producidos por los hibridomas obtenidos en 1)-4, y se isotipificaron. Sus isotipos se determinaron usando un kit de prueba de isotipificación monoclonal de rata (AbD Serotec). Como
5 resultado, los isotipos de los anticuerpos monoclonales anti-Orai1 humano de rata R118 y R198 ambos se encontró que son cadenas IgG2a y κ .

1)-6 Preparación del anticuerpo anti-Orai1 humano de rata

10 Cada anticuerpo monoclonal anti-Orai1 humano de rata se purificó del sobrenadante de cultivo de hibridoma.

Primero, el hibridoma que produce R118 o R198 se desarrolló en una cantidad suficiente con el Medio de Selección E ClonaCell-HY. Después, el medio se reemplazó con
15 SFM de Hibridoma (Life Technologies Corp.) complementado con 20% de Ultra Low IgG FBS (Life Technologies Corp.), seguido por el cultivo durante 5 días. Este sobrenadante de cultivo se recolectó y se esterilizó a través de un filtro de 0.45 μm .

20 El anticuerpo se purificó del sobrenadante de hibridoma mediante cromatografía de afinidad de proteína G (de 4 a 6°C) en un paso. El paso de reemplazo de la solución amortiguadora después de la purificación por la cromatografía de afinidad de proteína G se llevó a cabo de 4 a 6°C. Primero, el
25 sobrenadante del cultivo de hibridoma se aplicó a una columna

empacada con proteína G (GE Healthcare Bio-Sciences Corp.) equilibrada con PBS. Después de la entrada del sobrenadante de cultivo completo en la columna, la columna se lavó con PBS de 2 o más veces el volumen de la columna. Después, las
5 fracciones que contienen anticuerpo se recolectaron por elución con una solución de clorhidrato de glicina acuosa 0.1 M (pH 2.7). Las fracciones recolectadas se prepararon en pH 7.0 a 7.5 mediante la adición de Tris-HCl 1 M (pH 9.0) y después la solución amortiguadora se reemplazó con PBS usando
10 el Dispositivo de Filtro Centrifugal UF VIVASPIN 20 (corte de peso molecular: UF30K, Sartorius Japón K.K., 4 a 6°C) mientras que se concentró en una concentración de anticuerpo de 0.2 mg/mL o más alta. Finalmente, la solución de anticuerpo se filtró a través de un filtro Minisart-Plus
15 (Sartorius Japón K.K.) y se usó como una muestra purificada.

[Ejemplo 2] Evaluación *in vitro* del anticuerpo anti-Orai1 humano de rata

2)-1 Evaluación de la capacidad del anticuerpo anti-Orai1 humano de rata para la ligación por citometría de flujo

20 A fin de evaluar la especificidad de ligación a Orai1, la suspensión de células HEK293T transfectadas con pcADN3.1-DEST o la suspensión de células HEK293T transfectadas con pcADN3.1-hOrai1 preparadas por el método mostrado en 1)-4-1 se centrifugó para remover el sobrenadante. Después, las
25 células HEK293T se suspendieron por la adición del anticuerpo

monoclonal anti-Orai1 humano de rata R118 o R198 preparado en 1)-6 o un anticuerpo de control IgG de rata (Beckman Coulter Inc.), y se incubó a 4°C durante 30 minutos. Las células se lavaron dos veces con PBS que contiene 5% de FBS, después se suspendieron por la adición del conjugado Anti-IgG FITC de Rata diluido 320 veces con PBS que contiene 5% de FBS, y se incubó a 4°C durante 30 minutos. Las células se lavaron dos veces con PBS que contiene 5% de FBS y después se volvieron a suspender en PBS que contiene 5% de FBS y 1 µg/mL de yoduro de propidio (Life Technologies Corp.), seguido por detección usando un citómetro de flujo (FC500). Los datos se usaron analizando Flowjo. Después de la exclusión de las células muertas positivas de yoduro de propidio por acumulación, la intensidad de fluorescencia FITC de las células vivas se graficó como un histograma para calcular la intensidad de fluorescencia media (MFI). R118 y R198 no se ligaron a las células HEK293T transfectadas con pcADN3.1-DEST y, como se muestra en la Figura 1, cada una se ligó solamente a las células HEK293T transfectadas con pcADN3.1-hOrai1 en una manera dependiente de concentración, mostrando que estos anticuerpos se ligan cada uno específicamente al Orai1 humano. Por otra parte, esta ligación no se observó en el anticuerpo de control IgG de rata.

2)-2 T Efecto inhibidor de la activación celular del anticuerpo anti-Orai1 humano de rata

Células Jurkat de línea de células T humanas se prepararon en una concentración de 1.5×10^6 células/mL en RPMI1640 (Life Technologies Corp.) que contienen 10% de FBS, 100 U/mL de penicilina, y 100 µg/mL de estreptomicina (Life Technologies Corp.), inoculadas a 80 µL/pocillo en una placa de cultivo celular de 96 pocillos, y se pre-trataron con el anticuerpo monoclonal anti-Orai1 humano de rata R118 o R198 o un anticuerpo de control IgG de rata agregado a 10 µL/pocillo a 37°C durante 60 minutos bajo condiciones de CO₂ al 5%. Después, 100 ng/mL PMA (Sigma-Aldrich Corp.) y 1 µg/mL A23187 (Sigma-Aldrich Corp.) se agregaron en 10 µL/pocillo (concentración final: 10 ng/mL de PMA y 100 ng/mL A23187) y se agitaron bien, seguido por cultivo a 37°C durante aproximadamente 16 horas bajo condiciones de CO₂ al 5%. La placa se agitó bien y después se centrifugó a 600 g durante 3 minutos. La concentración de interleucina-2 (IL-2) contenida en el sobrenadante se midió por el ELISA (R&D systems, Inc.). La Figura 2 muestra que los anticuerpos monoclonales anti-Orai1 humano de rata obtenidos muestran cada uno, en una manera dependiente de concentración, la liberación de IL-2 de las células Jurkat tratadas con PMA y A23187. R118 y R198 inhibieron cada uno la liberación de IL-2 de las células Jurkat en una manera dependiente de concentración. Por otra parte, esta inhibición no se observó en el anticuerpo de control IgG de rata.

Ejemplo 3 Determinación de la secuencia de nucleótidos de los ADNcs que codifican regiones variables del anticuerpo anti-Orai1 humano de rata

3)-1 Síntesis del ADNc

5 Un lisado celular (Tris-HCl 50 mM (pH 7.5), LiCl 250 mM, EDTA 5 mM (pH 8), 0.5% de dodecil-sulfato de litio (LiDS), ditioneitol 2.5 mM (DTT)) del hibridoma que produce cada anticuerpo R118 o R198 se mezcló con cuentas magnéticas (Kit de Dynabeads mRNA DIRECT, Invitrogen Corp.) ligadas con oligo
10 dT25 de modo que el ARNm se ligó a las cuentas magnéticas. Después, las cuentas magnéticas se lavaron una vez con solución de lavado A de ARNm (Tris-HCl 10 mM (pH 7.5), LiCl 0.15 M, EDTA 1 mM, 0.1% de LiDS, 0.1% de Triton X-100) y una solución para síntesis de ADNc (Tris-HCl 50 mM (pH 8.3), KCl
15 75 mM, MgCl₂ 3 mM, DTT 5 mM, dNTP 0.5 mM, 0.2% de Triton X-100, 1.2 unidades de inhibidor de RNasa (Life Technologies Corp.)), seguido por síntesis de ADNc usando una solución para síntesis de ADNc complementada con 12 unidades de Transcriptasa Inversa SuperScript III (Life Technologies
20 Corp.). Subsecuentemente, las cuentas magnéticas se lavaron con una solución de reacción de prolongación 3' (fosfato de potasio 50 mM, MgCl₂ 4 mM, dGTP 0.5 mM, 0.2% de Triton X-100, 1.2 unidades de inhibidor de RNasa (Life Technologies Corp.)), seguido por la reacción de prolongación 3' usando
25 una solución de reacción complementada con 48 unidades de

Transferasa Terminal, recombinante (F. Hoffmann-La Roche, Ltd.).

3)-2 Amplificación y secuenciación de fragmentos de genes de región variable de cadena pesada y ligera de
5 inmunoglobulina de rata

Las cuentas magnéticas se lavaron con una solución TE (Tris-HCl 10 mM (pH 7.5), EDTA 1 mM, 0.1% de Triton X-100), y después los genes de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina de rata se amplificaron por 5'-RACE PCR.
10 Específicamente, las cuentas magnéticas se transfirieron a una solución de reacción de PCR (0.2 μ M de cebador, dNTP 0.2 mM, 0.25 unidades de ADN Polimerasa PrimeSTAR HS (Takara Bio Inc.)) y se sometieron a 35 ciclos de reacción cada uno implicando 94°C durante 30 segundos-68°C durante 90 segundos.
15 Los conjuntos de cebadores usados fueron como sigue:

Conjunto de cebadores de PCR (para la cadena pesada)

5'-GCTAGCGCTACCGGACTCAGATCCCCCCCCCCCCDN-3' (Nhe-polyC-S)
(SEQ ID NO: 3)

5'-TCACTGAGCTGGTGAGAGTGTAGAGCCC-3' (rIg γ -AS1) (SEQ ID NO: 4)

20 5'-TCACCGAGCTGCTGAGGGTGTAGAGCCC-3' (rIg γ -AS2) (SEQ ID NO: 5)

Conjunto de cebadores de PCR (para la cadena ligera)

5'-GCTAGCGCTACCGGACTCAGATCCCCCCCCCCCCDN-3' (Nhe-polyC-S)
(SEQ ID NO: 6) (lo mismo como aquella para la cadena pesada)

5'-TCAGTAACACTGTCCAGGACACCATCTC-3' (rIg κ -AS) (SEQ ID NO: 7)

25 Los fragmentos amplificados por la reacción de PCR se

secuenciaron para analizar sus secuencias de nucleótidos. Un oligonucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos de 5'-CTGGCTCAGGGAAATAGCC-3' (rIg_γ-seq) (SEQ ID NO: 8) se usó como un cebador de secuenciación para la cadena pesada, y un
5 oligonucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos de 5'-TCCAGTTGCTAACTGTTCC-3' (rIg_κ-seq) (SEQ ID NO: 9) se usó como un cebador de secuenciación para la cadena ligera.

El análisis de secuenciación se llevó a cabo usando un aparato de análisis de secuencia de genes ("ABI PRISM 3700
10 DNA Analyzer; Applied Biosystems, Inc." or "Applied Biosystems 3730xl Analyzer; Applied Biosystems, Inc."). El Sistema de Secuenciación de Ciclo de Terminador de Tinte con ADN polimerasa AmpliTaq (Life Technologies Corp.) y GeneAmp 9700 (Applied Biosystems, Inc.) se usaron en la reacción de
15 secuenciación.

Las secuencias de nucleótidos determinadas que codifican las regiones variables de cadena pesada y ligera de R118 y R198 se muestran en SEQ ID NOs: 10 (cadena ligera R118) y 12 (cadena pesada R118) y SEQ ID NOs: 14 (cadena ligera R198) y
20 16 (cadena pesada R198), respectivamente, del Listado de Secuencias. Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables se muestran en SEQ ID NOs: 11 (cadena ligera R118) y 13 (cadena pesada R118) y SEQ ID NOs: 15 (cadena ligera R198) y 17 (cadena pesada R198), respectivamente, del Listado
25 de Secuencias. SEQ ID NOs: 10 y 11 se muestran en la Figura

14. SEQ ID N0s: 12 y 13 se muestran en la Figura 15. SEQ ID N0s: 14 y 15 se muestran en la Figura 16. SEQ ID N0s: 16 y 17 se muestran en la Figura 17.

5 Ejemplo 4 Preparación del anticuerpo anti-Orai1 humano quimerizado humano

4)-1 Construcción del vector de expresión de cadena ligera quimerizado y humanizado pCMA-LK

Un fragmento de aproximadamente 5.4 kb obtenido por la digestión de un plásmido pcADN3.3-TOPO/LacZ (Life
10 Technologies Corp.) con enzimas de restricción XbaI y PmeI se ligó con un fragmento de ADN (mostrado en SEQ ID N0: 18 del Listado de Secuencias) que comprende una secuencia que codifica una señal de secreción de cadena κ humana y una región constante de cadena κ humana usando el kit de
15 clonación de PCR In-Fusion Advantage (Clontech Laboratories, Inc.) para preparar el pcADN3.3/LK.

El pcADN3.3/LK se usó como una plantilla en la PCR usando el conjunto de cebadores proporcionado a continuación. El fragmento obtenido de aproximadamente 3.8 kb se fosforiló
20 y después se auto-ligó para construir un vector de expresión de cadena ligera de anticuerpo quimerizado y humanizado pCMA-LK que tiene una secuencia señal, un sitio de clonación, y la secuencia de codificación de región constante de cadena κ humana cadena abajo de un promotor CMV.

25 Conjunto de cebadores

5' -TATACCGTCGACCTCTAGCTAGAGCTTGGC-3' (SEQ ID NO: 19; cebador 3.3-F1)

5' -GCTATGGCAGGGCCTGCCGCCCCGACGTTG-3' (SEQ ID NO: 20; cebador 3.3-R1)

5 4)-2 Construcción del vector de expresión de cadena pesada de tipo IgG1 quimerizado y humanizado pCMA-G1

Un fragmento de ADN obtenido por la digestión de pCMA-LK con XbaI y PmeI para remover la secuencia que codifica una señal de secreción de cadena κ y una región constante de

10 cadena κ humana se ligó con un fragmento de ADN (mostrado en SEQ ID NO: 21 del Listado de Secuencias) que comprende una secuencia que codifica una secuencia señal de cadena pesada humana y aminoácidos de una región constante IgG1 humana usando un kit de clonación de PCR In-Fusion Advantage para

15 construir un vector de expresión de cadena pesada de tipo IgG1 de anticuerpo quimérico y humanizado pCMA-G1 que tiene una secuencia señal, un sitio de clonación, y la secuencia de codificación de región constante de cadena pesada IgG1 humana cadena abajo de un promotor de CMV.

20 4)-3 Construcción del vector de expresión de cadena ligera de anticuerpo anti-Orai1 humano quimerizado humano

4)-3-1 Construcción del vector de expresión R118 de cadena ligera cR118_L quimerizado humano

Un fragmento de ADN que comprende la secuencia de

25 codificación de región variable de cadena ligera R118

obtenida en el Ejemplo 3)-2 se sintetizó (GeneArt Artificial Gene Synthesis service). Un fragmento de ADN de aproximadamente 0.7 kb obtenido mediante la escisión del fragmento de ADN que comprende la secuencia de codificación de región variable de cadena ligera R118 con las enzimas de restricción XbaI y PmeI se insertó en un fragmento de ADN de aproximadamente 3.4 kb obtenido mediante la escisión del vector de propósito general pCMA-LK para la expresión de cadena ligera de anticuerpo quimerizada y humanizada con las mismas enzimas de restricción como en lo anterior usando el Ligation High ver. 2 (Toyobo Co., Ltd.) para construir un vector de expresión de cadena ligera R118 quimerizado (cR118_L). El vector de expresión obtenido se designó como "pCMA-LK/cR118_L". La secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera cR118 quimerizada humana la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera se muestran en SEQ ID NOs: 22 y 23 (Figura 18), respectivamente, del Listado de Secuencias.

4)-3-2 Construcción del vector de expresión R198 de cadena ligera cR198_L quimerizado humano

Un fragmento de ADN que comprende la secuencia de codificación de región variable de cadena ligera R198 obtenida en el Ejemplo 3)-2 se sintetizó (GeneArt Artificial Gene Synthesis service). Un fragmento de ADN de aproximadamente 0.7 kb obtenido por la escisión del fragmento de ADN que comprende la secuencia de codificación de región

variable de cadena ligera R198 con enzimas de restricción XbaI y PmeI se insertó en un fragmento de ADN de aproximadamente 3.4 kb obtenido mediante la escisión del vector de propósito general pCMA-LK para la expresión de

5 cadena ligera de anticuerpo quimerizado y humanizado con las mismas enzimas de restricción como lo anterior usando Ligation High ver. 2 (Toyobo Co., Ltd.) para construir un vector de expresión de cadena ligera R198 quimerizado humano (cR198_L). El vector de expresión obtenido se designó como

10 "pCMA-LK/cR198_L". La secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera cR198 quimerizada humana y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera se muestran en SEQ ID NOs: 24 y 25 (Figura 19), respectivamente, del Listado de Secuencias.

4)-4 Construcción del vector de expresión de cadena

15 pesada de anticuerpo anti-Orai1 humano quimerizado humano

4)-4-1 Construcción del vector de expresión R118 de cadena pesada cR118_H quimerizado humano

Un fragmento de ADN que comprende la secuencia de codificación de región variable de cadena espada R118

20 obtenida en el Ejemplo 3)-2 se sintetizó (GeneArt Artificial Gene Synthesis service). Un fragmento de ADN de aproximadamente 0.3 kb obtenido mediante la escisión del fragmento de ADN que comprende la secuencia de codificación de región variable de cadena pesada R118 con una enzima de

25 restricción BlnI se insertó en un fragmento de ADN de

aproximadamente 4.5 kb obtenido mediante la escisión del vector de expresión de cadena pesada de tipo IgG1 quimerizado y humano pCMA-G1 con la misma enzima de restricción como en lo anterior usando Ligation High ver. 2 para construir un
5 vector de expresión de cadena pesada R118 quimerizado humano (cR118_H). El vector de expresión obtenido se designó como "pCMA-G1/cR118_H". La secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada cR118 quimerizada humana y la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada se muestran en SEQ ID NOs: 26
10 y 27 (Figura 20), respectivamente, del Listado de Secuencias.

4)-4-2 Construcción del vector de expresión R198 de cadena pesada cR198_H quimerizado humano

Un fragmento de ADN que comprende la secuencia de codificación de región variable de cadena pesada R198
15 obtenida en el Ejemplo 3)-2 se sintetizó (GeneArt Artificial Gene Synthesis service). Un fragmento de ADN de aproximadamente 0.3 kb obtenido mediante la escisión del fragmento de ADN que comprende la secuencia de codificación de región variable de cadena pesada R198 con una enzima de
20 restricción BlnI se insertó en un fragmento de ADN de aproximadamente 4.5 kb obtenido mediante la escisión del vector de expresión de cadena pesada de tipo IgG1 quimerizado humanizado pCMA-G1 con la misma enzima de restricción como en lo anterior usando el Ligation High ver. 2 para construir un
25 vector de expresión de cadena pesada R198 quimerizado humano

(cR198_H). El vector de expresión obtenido se designó como "pCMA-G1/cR198_H". La secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada cR198 quimerizada humana y la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada se muestran en SEQ ID NOs: 28 y 29 (Figura 21), respectivamente, del Listado de Secuencias.

4)-5 Preparación del anticuerpo anti-Orai1 humano quimerizado humano

4)-5-1 Producción del anticuerpo anti-Orai1 humano quimerizado humano

10 Células FreeStyle 293F (Life Technologies Corp.) se subcultivaron y se cultivaron de acuerdo con el manual.

10⁷ Células FreeStyle 293F (Life Technologies Corp.) en la fase de crecimiento logarítmica se inocularon en una botella de 30 mL (Thermo Fisher Scientific Inc.), se prepararon a 9 mL por dilución con el medio de expresión FreeStyle 293 (Life Technologies Corp.), y después se cultivaron en agitación a 135 rpm a 37°C durante 1 hora en una incubadora de CO₂ al 8%. 30 µg de polietilenimina (Polysciences #24765) se disolvieron en 500 µL de Opti-Pro SFM (Life Technologies Corp.). Después, cada vector de expresión de cadena pesada de anticuerpo anti-Orai1 quimerizado humano (4 µg) y cada vector de expresión de cadena ligera de anticuerpo anti-Orai1 humano quimerizado humano (6 µg), preparados usando el Kit QIAGEN Plasmid Maxi (Qiagen N.V.), se suspendieron en 500 µL de Opti-Pro SFM. 500

μL de la solución mezclada con vector de expresión/Opti-Pro SFM se agregaron a 500 μL de la solución mezclada con polietilenimina/Opti-Pro SFM, y la mezcla se agitó suavemente, se dejó asentar adicionalmente durante 5 minutos, y después se agregó a las células FreeStyle 293F. Las células se cultivaron con agitación a 95 rpm a 37°C durante 5 a 7 días en una incubadora de CO₂ al 8%, y el sobrenadante de cultivo obtenido se filtró a través de un filtro Millex de 0.22 μm (Millipore Corp.).

La R118 quimerizada humana obtenida por la combinación de pCMA-G1/cR118_H y pCMA-LK/cR118_L se designó como "cR118". Del mismo modo, la R198 quimerizada humana obtenida por la combinación de pCMA-G1/cR198_H y pCMA-LK/cR198_L se designó como "cR198".

4)-5-2 Purificación del anticuerpo anti-Orai1 humano quimerizado humano

Cada sobrenadante de cultivo obtenido en 4)-5-1 se purificó por cromatografía de afinidad de rProteína A en un paso. Primero, 10 mL del sobrenadante de cultivo se aplicó a MabSelectSuRe (GE Healthcare Bio-Sciences Corp.) se equilibró con PBS. Después de la entrada de la solución de cultivo completa en la columna, la columna se lavó con 7 mL de PBS. Después, se llevó a cabo la elución con 5 mL de arginina-HCl 2 M, pH 4.0, y el eluato se reemplazó con solución amortiguadora con 4 mL de una solución amortiguadora de

histidina (histidina 25 mM, 5% de sorbitol, pH 6.0) usando una columna de desalinización PD-10 (GE Healthcare Bio-Sciences Corp.). Finalmente, la solución se concentró en aproximadamente 100 µL usando Amicon Ultracel 30K (corte de peso molecular: 30 K, Millipore Corp.) y se usó como una muestra purificada.

Ejemplo 5. Actividad *in vitro* del anticuerpo anti-Orai1 humano quimerizado humano

5)-1 Actividad de ligación a antígeno del anticuerpo anti-Orai1 humano quimerizado humano por citometría de flujo

A fin de evaluar la especificidad de ligación de Orai1 humano, la suspensión de células HEK293T transfectadas con pcADN3.1-DEST o la suspensión de células HEK293T transfectadas con pcADN3.1-hOrai1 preparadas por el método mostrado en 1)-4-1 se centrifugó para remover un sobrenadante. Después, las células HEK293T se suspendieron por la adición del anticuerpo anti-Orai1 humano quimerizado humano cR118 o cR198 preparado en 4)-5 o un anticuerpo de control IgG humano (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.), y se incubó a 4°C durante 30 minutos. Las células se lavaron dos veces con PBS que contiene 5% de FBS, después se suspendió por la adición del conjugado IgG FITC Anti-humano (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) diluido 100 veces con PBS que contiene 5% de FBS, y se incubó a 4°C durante 30 minutos. Las células se lavaron dos veces con PBS que

contiene 5% de FBS y después se volvió a suspender en PBS que contiene 5% de FBS y 1 µg/mL de yoduro de propidio (Invitrogen Corp.), seguido por detección usando un citómetro de flujo (FC500). Los datos se analizaron usando Flowjo.

5 Después de la exclusión de las células muertas positivas de yoduro de propidio por acumulación, la intensidad de fluorescencia FITC de las células vivas se graficó como un histograma para calcular la intensidad de fluorescencia media (MFI). cR118 y cR198 no se ligaron a las células HEK293T
10 transfectadas con pcADN3.1-DEST y, como se muestra en la Figura 3, cada una se ligó solo a las células HEK293T transfectadas con pcADN3.1-hOrai1 en una manera dependiente de concentración, mostrando que estos anticuerpos se ligan cada uno específicamente a Orai1 humano. Por otra parte, esta
15 ligación no se observó en el anticuerpo de control IgG humano.

5)-2 Efecto inhibidor de la activación de la línea de células T humanas del anticuerpo anti-Orai1 humano quimerizado humano

20 Las células Jurkat de la línea de células T humanas se prepararon en una concentración de 1.5×10^6 células/mL en RPMI1640 que contiene 10% de FBS, 100 U/mL de penicilina, y 100 µg/mL de estreptomicina, se inocularon a 80 µL/pocillo sobre una placa de cultivo celular de 96 pocillos, y se pre-
25 trataron con el anticuerpo anti-Orai1 humano quimerizado

humano cR198 o cR118, el anticuerpo precursor R198, o un anticuerpo de control IgG humano agregado a 10 µL/pocillo a 37°C durante 60 minutos bajo condiciones de CO₂ al 5%. Después, 100 ng/mL de PMA y 1 µg/mL A23187 se agregaron en 10 µL/pocillo y se agitaron bien, seguido por el cultivo a 37°C durante aproximadamente 16 horas bajo condiciones de CO₂ al 5%. La placa se agitó bien y después se centrifugó a 600 g durante 3 minutos. La concentración de IL-2 contenida en el sobrenadante se midió por el ELISA. La Figura 4 muestra que los anticuerpos anti-Orai1 humano quimerizados humanos preparados inhiben cada uno, en una manera dependiente de concentración, la liberación de IL-2 de las células Jurkat tratadas con PMA y A23187. cR118 y cR198 mostraron cada uno la liberación de IL-2 de las células Jurkat en una manera dependiente de concentración con su equivalente de resistencia a la inhibición a aquella del anticuerpo precursor R198. Por otra parte, esta inhibición no se observó en el anticuerpo de control IgG humano.

Ejemplo 6. Diseño de la versión humanizada hR198 del anticuerpo anti-Orai1 humano quimerizado humano cR198

6)-1 Modelación molecular de las regiones variables de R198

La modelación molecular de las regiones variables de cR198 se llevó a cabo por un método en general conocido como modelación de homología (Methods in Enzymology, 203, 121-153,

(1991)). Las regiones variables del R198 determinadas en lo anterior se compararon con las secuencias primarias (son disponibles las estructuras tridimensionales derivadas de las estructuras de cristal de rayos X) de las regiones variables
5 de inmunoglobulina humanas registradas en Protein Data Bank (Nuc. Acid Res. 28, 235-242 (2000)). Como resultado, 1AJ7 se seleccionó como la que tiene la homología de secuencia más alta a la región variable de cadena ligera de cR198. También, 1XGY se seleccionó como la que tiene la homología de
10 secuencia más alta a la región variable de cadena pesada de cR198. Las estructuras tridimensionales de las regiones de estructura se prepararon como un "modelo de estructura" al combinar las coordenadas de 1AJ7 y 1XGY que corresponden a la cadena ligera y la cadena pesada de cR198. Las CDRs de cR198
15 se asignaron como agrupamientos 11A, 7A, 9A, 10A, y 10A a CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, y CDRH2, respectivamente, de acuerdo con la clasificación de Thornton y colaboradores (J. Mol. Biol., 263, 800-815, (1996)). Su CDRH3 se clasificó en k(6)- de acuerdo con la regla H3 (documento FEBS, 399, 1-8
20 (1996)). Subsecuentemente, la conformación típica de cada CDR se incorporó en el modelo de estructura.

Finalmente, un cálculo de energía para excluir el contacto interatómico desventajoso se condujo a fin de obtener modelos moleculares posibles de las regiones
25 variables cR198 en términos de energía. Estos procedimientos

se llevaron a cabo usando un programa de predicción de estructura tridimensional de proteína comercialmente disponible Prime y un programa de investigación de conformación MacroModel (Schrodinger, LLC).

5 6)-2 Diseño de la secuencia de aminoácidos del R198 humanizado

El anticuerpo R198 humanizado se construyó por un método conocido en general como injerto de CDR (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033 (1989)). Un anticuerpo aceptor se
10 seleccionó sobre la base de la homología de los aminoácidos en las regiones de estructura.

Las secuencias de las regiones de estructura cR198 se compararon con las secuencias de todas las estructuras humanas registradas en la base de datos de Kabat (Nuc. Acid
15 Res., 29, 205-206 (2001)) de las secuencias de aminoácidos de anticuerpo. Como resultado, el anticuerpo 1C10'CL se seleccionó como un receptor debido a su 71% de homología de secuencia en cuanto a las regiones de estructura. Los residuos de aminoácidos de las regiones de estructura en
20 1C10'CL se alinearon con los residuos de aminoácidos de las regiones de estructura cR198 para identificar las posiciones de los aminoácidos que no coincidieron entre los mismos. Las posiciones de estos residuos se analizaron usando el modelo tridimensional de cR198 construido en lo anterior. Después,
25 los residuos donadores injertados en el aceptor se

seleccionaron de acuerdo con los criterios proporcionados por Queen y colaboradores (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033 (1989)).

Algunos residuos donadores seleccionados de esta manera
5 se transfirieron al anticuerpo aceptor para construir la secuencia R198 humanizada como se describe en los siguientes Ejemplos.

Además, 1 a 5 residuos de aminoácidos en cada CDR o FR de cR198 se reemplazaron con los residuos de aminoácidos de
10 cR118 para construir una secuencia R198 humanizada modificada CDR como se describe en los siguientes Ejemplos.

6)-3 Diseño de la cadena ligera R198 humanizada hR198_L

6)-3-1 cadena ligera tipo hR198_L1:

La cadena ligera R198 humanizada diseñada al reemplazar
15 un residuo de treonina en la posición de aminoácido 30 con un residuo de serina, un residuo de prolina en la posición de aminoácido 32 con un residuo de serina, un residuo de leucina en la posición de aminoácido 35 con un residuo de valina, un residuo de ácido glutámico en la posición de aminoácido 37
20 con un residuo de ácido aspártico, un residuo de serina en la posición de aminoácido 42 con un residuo de treonina, un residuo de ácido aspártico en la posición de aminoácido 61 con un residuo de glicina, un residuo de glicina en la posición de aminoácido 62 con un residuo de lisina, un
25 residuo de serina en la posición de aminoácido 63 con un

residuo de alanina, un residuo de valina en la posición de aminoácido 64 con un residuo de prolina, un residuo de serina la posición de aminoácido 92 con un residuo de treonina, un residuo de serina en la posición de aminoácido 94 con un
5 residuo de treonina, un residuo de treonina en la posición de aminoácido 96 con un residuo de serina, un residuo de ácido glutámico en la posición de aminoácido 99 con un residuo de glutamina, un residuo de serina en la posición de aminoácido 100 con un residuo de prolina, un residuo de treonina en la
10 posición de aminoácido 120 con un residuo de glutamina, un residuo de leucina en la posición de aminoácido 124 con un residuo de valina, un residuo de leucina en la posición de aminoácido 126 con un residuo de isoleucina, un residuo de arginina en la posición de aminoácido 127 con un residuo de
15 lisina, y un residuo de alanina en la posición de aminoácido 129 con un residuo de treonina conforme a la cadena ligera cR198 mostrada en SEQ ID NO: 25 del Listado de Secuencias se designó como "cadena ligera de tipo hR198_L1".

La secuencia de nucleótidos que codifica la cadena
20 ligera de tipo hR198_L1 se muestra en SEQ ID NO: 30 del Listado de Secuencias. Las posiciones de nucleótidos 61 a 702 codifican una cadena ligera madura formada por la escisión de la secuencia señal. Las posiciones de nucleótidos 61 a 378 codifican la región variable. La secuencia de aminoácidos de
25 la cadena ligera de tipo hR198_L1 se muestra en SEQ ID NO: 31

del Listado de Secuencias. Las posiciones de aminoácidos 21 a 234 representan la cadena ligera madura formada por la escisión de la secuencia señal. Las posiciones de aminoácidos 21 a 126 representan la región variable. Ambas de las 5 secuencias de SEQ ID NOs: 30 y 31 también se muestran en la Figura 22. Cada secuencia CDR y su SEQ ID NO correspondiente se muestran en la Figura 38.

6)-3-2 Cadena ligera tipo hR198_L2:

Una cadena ligera R198 humanizada diseñada al reemplazar 10 un residuo de treonina en la posición de aminoácido 30 con un residuo de serina, un residuo de prolina en la posición de aminoácido 32 con un residuo de serina, un residuo de leucina en la posición de aminoácido 35 con un residuo de valina, un residuo de ácido glutámico en la posición de aminoácido 37 15 con un residuo de ácido aspártico, un residuo de serina en la posición de aminoácido 42 con un residuo de treonina, un residuo de ácido aspártico en la posición de aminoácido 61 con un residuo de glicina, un residuo de glicina en la posición de aminoácido 62 con un residuo de lisina, un 20 residuo de serina en la posición de aminoácido 63 con un residuo de alanina, un residuo de serina en la posición de aminoácido 92 con un residuo de treonina, un residuo de serina en la posición de aminoácido 94 con un residuo de treonina, un residuo de treonina en la posición de aminoácido 25 96 con un residuo de serina, un residuo de ácido glutámico en

la posición de aminoácido 99 con un residuo de glutamina, un residuo de serina en la posición de aminoácido 100 con un residuo de prolina, un residuo de treonina en la posición de aminoácido 120 con un residuo de glutamina, un residuo de leucina en la posición de aminoácido 124 con un residuo de valina, un residuo de leucina en la posición de aminoácido 126 con un residuo de isoleucina, un residuo de arginina en la posición de aminoácido 127 con un residuo de lisina, y un residuo de alanina en la posición de aminoácido 129 con un residuo de treonina conforme a la cadena ligera cR198 en SEQ ID NO: 25 del Listado de Secuencias se designó como una "cadena ligera tipo hR198_L2".

La secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera tipo hR198_L2 se muestra en SEQ ID NO: 32 del Listado de Secuencias. Las posiciones de nucleótidos 61 a 702 codifican una cadena ligera madura formada por la escisión de la secuencia señal. Las posiciones de nucleótidos 61 a 378 codifican la región variable. La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera tipo hR198_L2 se muestra en SEQ ID NO: 33 del Listado de Secuencias. Las posiciones de aminoácidos 21 a 234 representan la cadena ligera madura formada por la escisión de la secuencia señal. Las posiciones de aminoácidos 21 a 126 representan la región variable. Ambas de las secuencias de SEQ ID NOs: 32 y 33 también se muestran en la Figura 23. Cada secuencia CDR y su SEQ ID NO correspondiente

se muestran en la Figura 38.

6)-3-3 Cadena ligera tipo hR198_L3:

Una cadena ligera R198 humanizada diseñada al reemplazar un residuo de treonina en la posición de aminoácido 30 con un
5 residuo de serina, un residuo de prolina en la posición de aminoácido 32 con un residuo de serina, un residuo de leucina en la posición de aminoácido 35 con un residuo de valina, un residuo de ácido glutámico en la posición de aminoácido 37 con un residuo de ácido aspártico, un residuo de serina en la
10 posición de aminoácido 42 con un residuo de treonina, un residuo de ácido aspártico en la posición de aminoácido 61 con un residuo de glicina, un residuo de glicina en la posición de aminoácido 62 con un residuo de lisina, un residuo de serina en la posición de aminoácido 63 con un
15 residuo de alanina, un residuo de valina en la posición de aminoácido 64 con un residuo de prolina, un residuo de serina en la posición de aminoácido 92 con un residuo de treonina, un residuo de serina en la posición de aminoácido 94 con un residuo de treonina, un residuo de treonina en la posición de
20 aminoácido 96 con un residuo de serina, un residuo de ácido glutámico en la posición de aminoácido 99 con un residuo de glutamina, un residuo de serina en la posición de aminoácido 100 con un residuo de prolina, un residuo de tirosina en la posición de aminoácido 114 con un residuo de fenilalanina, un
25 residuo de treonina en la posición de aminoácido 120 con un

residuo de glutamina, un residuo de leucina en la posición de aminoácido 124 con un residuo de valina, un residuo de leucina en la posición de aminoácido 126 con un residuo de isoleucina, un residuo de arginina en la posición de aminoácido 127 con un residuo de lisina, y un residuo de alanina en la posición de aminoácido 129 con un residuo de treonina conforme a la cadena ligera cR198 mostrada en SEQ ID NO: 25 del Listado de Secuencias se designó como "cadena ligera tipo hR198_L3".

La secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera tipo hR198_L3 se muestra en SEQ ID NO: 34 del Listado de Secuencias. Las posiciones de nucleótidos 61 a 702 codifican una cadena ligera madura formada por la escisión de la secuencia señal. Las posiciones de nucleótidos 61 a 378 codifican la región variable. La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera tipo hR198_L3 se muestra en SEQ ID NO: 35 del Listado de Secuencias. Las posiciones de aminoácidos 21 a 234 representan la cadena ligera madura formada por la escisión de la secuencia señal. Las posiciones de aminoácidos 21 a 126 representan la región variable. Ambas de las secuencias de SEQ ID NOs: 34 y 35 también se muestran en la Figura 24. Cada secuencia CDR y su SEQ ID NO correspondiente se muestran en la Figura 38.

6)-3-4 cadena ligera de tipo hR198_L4:

Una cadena ligera R198 humanizada diseñada al reemplazar

un residuo de treonina en la posición de aminoácido 30 con un residuo de serina, un residuo de prolina en la posición de aminoácido 32 con un residuo de serina, un residuo de leucina en la posición de aminoácido 35 con un residuo de valina, un
5 residuo de ácido glutámico en la posición de aminoácido 37 con un residuo de ácido aspártico, un residuo de serina en la posición de aminoácido 42 con un residuo de treonina, un residuo de ácido aspártico en la posición de aminoácido 61 con un residuo de glicina, un residuo de glicina en la
10 posición de aminoácido 62 con un residuo de lisina, un residuo de serina en la posición de aminoácido 63 con un residuo de alanina, un residuo de serina en la posición de aminoácido 92 con un residuo de treonina, un residuo de serina en la posición de aminoácido 94 con un residuo de
15 treonina, un residuo de treonina en la posición de aminoácido 96 con un residuo de serina, un residuo de ácido glutámico en la posición de aminoácido 99 con un residuo de glutamina, un residuo de serina en la posición de aminoácido 100 con un residuo de prolina, un residuo de tirosina en la posición de
20 aminoácido 114 con un residuo de fenilalanina, un residuo de treonina en la posición de aminoácido 120 con un residuo de glutamina, un residuo de leucina en la posición de aminoácido 124 con un residuo de valina, un residuo de leucina en la posición de aminoácido 126 con un residuo de isoleucina, un
25 residuo de arginina en la posición de aminoácido 127 con un

residuo de lisina, y un residuo de alanina en la posición de aminoácido 129 con un residuo de treonina conforme a la cadena ligera cR198 mostrada en SEQ ID NO: 25 del Listado de Secuencias se designó como una “cadena ligera de tipo hR198_L4”.

La secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera de tipo hR198_L4 se muestra en SEQ ID NO: 36 del Listado de Secuencias. Las posiciones de nucleótidos 61 a 702 codifican una cadena ligera madura formada por la escisión de la secuencia señal. Las posiciones de nucleótidos 61 a 378 codifican la región variable. La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera tipo hR198_L4 se muestra en SEQ ID NO: 37 del Listado de Secuencias. Las posiciones de aminoácidos 21 a 234 representan la cadena ligera madura formada por la escisión de la secuencia señal. Las posiciones de aminoácidos 21 a 126 representan la región variable. Ambas de las secuencias de SEQ ID NOs: 36 y 37 también se muestran en la Figura 25. Cada secuencia CDR y su SEQ ID NO correspondiente se muestran en la Figura 38.

6)-4 diseño de la cadena pesada R198 humanizada hR198_H

6)-4-1 Cadena pesada tipo hR198_H1:

Una cadena pesada R198 humanizada diseñada al reemplazar un residuo de glutamina en la posición de aminoácido 24 con un residuo de valina, un residuo de leucina en la posición de aminoácido 30 con un residuo de valina, un residuo de alanina

en la posición de aminoácido 31 con un residuo de lisina, un residuo de serina en la posición de aminoácido 35 con un residuo de alanina, un residuo de metionina en la posición de aminoácido 37 con un residuo de valina, un residuo de isoleucina en la posición de aminoácido 39 con un residuo de valina, un residuo de isoleucina en la posición de aminoácido 56 con un residuo de valina, un residuo de lisina en la posición de aminoácido 57 con un residuo de arginina, un residuo de treonina en la posición de aminoácido 59 con un residuo de alanina, un residuo de treonina en la posición de aminoácido 60 con un residuo de prolina, un residuo de lisina en la posición de aminoácido 86 con un residuo de arginina, un residuo de serina en la posición de aminoácido 95 con un residuo de treonina, un residuo de fenilalanina en la posición de aminoácido 99 con un residuo de tirosina, un residuo de glutamina en la posición de aminoácido 101 con un residuo de ácido glutámico, un residuo de treonina en la posición de aminoácido 106 con un residuo de arginina, un residuo de prolina en la posición de aminoácido 107 con un residuo de serina, un residuo de ácido aspártico en la posición de aminoácido 108 con un residuo de ácido glutámico, un residuo de serina en la posición de aminoácido 110 con un residuo de treonina, un residuo de valina en la posición de aminoácido 130 con un residuo de treonina, y un residuo de metionina en la posición de aminoácido 131 con un residuo de

leucina conforme a la cadena pesada cR198 mostrada en SEQ ID NO: 29 del Listado de Secuencias se designó como una "cadena pesada tipo hR198_H1".

La secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada de tipo hR198_H1 se muestra en SEQ ID NO: 38 del Listado de Secuencias. Las posiciones de nucleótidos 58 a 1398 que codifica una cadena pesada madura formada por la escisión de la secuencia señal. Las posiciones de nucleótidos 58 a 408 codifican la región variable. La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada tipo hR198_H1 se muestra en SEQ ID NO: 39 del Listado de Secuencias. Las posiciones de aminoácidos 20 a 466 representan una cadena pesada madura formada por la escisión de la secuencia señal. Las posiciones de aminoácidos 20 a 136 representan la región variable. Ambas de las secuencias de SEQ ID NOs: 38 y 39 también se muestran en la Figura 26. Cada secuencia CDR y su SEQ ID NO correspondiente mostrada en Figura 38.

6)-4-2 cadena pesada tipo hR198_H2:

Una cadena pesada R198 humanizada diseñada al reemplazar un residuo de glutamina en la posición de aminoácido 24 con un residuo de valina, un residuo de leucina en la posición de aminoácido 30 con un residuo de valina, un residuo de alanina en la posición de aminoácido 31 con un residuo de lisina, un residuo de serina en la posición de aminoácido 35 con un residuo de alanina, un residuo de metionina en la posición de

aminoácido 37 con un residuo de valina, un residuo de isoleucina en la posición de aminoácido 39 con un residuo de valina, un residuo de lisina en la posición de aminoácido 57 con un residuo de arginina, un residuo de treonina en la
5 posición de aminoácido 59 con un residuo de alanina, un residuo de treonina en la posición de aminoácido 60 con un residuo de prolina, un residuo de lisina en la posición de aminoácido 86 con un residuo de arginina, un residuo de serina en la posición de aminoácido 95 con un residuo de
10 treonina, un residuo de fenilalanina en la posición de aminoácido 99 con un residuo de tirosina, un residuo de glutamina en la posición de aminoácido 101 con un residuo de ácido glutámico, un residuo de treonina en la posición de aminoácido 106 con un residuo de arginina, un residuo de
15 prolina en la posición de aminoácido 107 con un residuo de serina, un residuo de ácido aspártico en la posición de aminoácido 108 con un residuo de ácido glutámico, un residuo de serina en la posición de aminoácido 110 con un residuo de treonina, un residuo de valina en la posición de aminoácido
20 130 con un residuo de treonina, y un residuo de metionina en la posición de aminoácido 131 con un residuo de leucina conforme a la cadena pesada cR198 mostrada en SEQ ID NO: 29 del Listado de Secuencias se designó como una "cadena pesada de tipo hR198_H2".

25 La secuencia de nucleótidos que codifica la cadena

pesada tipo hR198_H2 se muestra en SEQ ID NO: 40 del Listado de Secuencias. Las posiciones de nucleótidos 58 a 1398 que codifica una cadena pesada madura formada por la escisión de la secuencia señal. Las posiciones de nucleótidos 58 a 408
5 codifican la región variable. La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo hR198_H2 se muestra en SEQ ID NO: 41 del Listado de Secuencias. Las posiciones de aminoácidos 20 a 466 representan una cadena pesada madura formada por la escisión de la secuencia señal. Las posiciones de aminoácidos
10 20 a 136 representan la región variable. Ambas de las secuencias de SEQ ID NOs: 40 y 41 también se muestran en la Figura 27. Cada secuencia CDR y su SEQ ID NO correspondiente se muestran en la Figura 38.

6)-4-3 Cadena ligera tipo hR198_H3:

15 Una cadena pesada R198 humanizada diseñada al reemplazar un residuo de glutamina en la posición de aminoácido 24 con un residuo de valina, un residuo de leucina en la posición de aminoácido 30 con un residuo de valina, un residuo de alanina en la posición de aminoácido 31 con un residuo de lisina, un
20 residuo de serina en la posición de aminoácido 35 con un residuo de alanina, un residuo de metionina en la posición de aminoácido 37 con un residuo de valina, un residuo de isoleucina en la posición de aminoácido 39 con un residuo de valina, un residuo de serina en la posición de aminoácido 50
25 con un residuo de alanina, un residuo de isoleucina en la

posición de aminoácido 56 con un residuo de valina, un residuo de lisina en la posición de aminoácido 57 con un residuo de arginina, un residuo de treonina en la posición de aminoácido 59 con un residuo de alanina, un residuo de treonina en la posición de aminoácido 60 con un residuo de prolina, un residuo de isoleucina en la posición de aminoácido 67 con un residuo de valina, un residuo de valina en la posición de aminoácido 70 con un residuo de isoleucina, un residuo de ácido glutámico en la posición de aminoácido 81 con un residuo de alanina, un residuo de lisina en la posición de aminoácido 82 con un residuo de arginina, un residuo de lisina en la posición de aminoácido 86 con un residuo de arginina, un residuo de serina en la posición de aminoácido 95 con un residuo de treonina, un residuo de fenilalanina en la posición de aminoácido 99 con un residuo de tirosina, un residuo de glutamina en la posición de aminoácido 101 con un residuo de ácido glutámico, un residuo de treonina en la posición de aminoácido 106 con un residuo de arginina, un residuo de prolina en la posición de aminoácido 107 con un residuo de serina, un residuo de ácido aspártico en la posición de aminoácido 108 con un residuo de ácido glutámico, un residuo de serina en la posición de aminoácido 110 con un residuo de treonina, un residuo de valina en la posición de aminoácido 130 con un residuo de treonina, y un residuo de metionina en la posición de

aminoácido 131 con un residuo de leucina conforme a la cadena pesada cR198 mostrada en SEQ ID NO: 29 del Listado de Secuencias se designó como una "cadena pesada tipo hR198_H3".

La secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada tipo hR198_H3 se muestra en SEQ ID NO: 42 del Listado de Secuencias. Las posiciones de nucleótidos 58 a 1398 que codifica una cadena pesada madura formada por la escisión de la secuencia señal. Las posiciones de nucleótidos 58 a 408 codifican la región variable. La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada tipo hR198_H3 se muestra en SEQ ID NO: 43 del Listado de Secuencias. Las posiciones de aminoácidos 20 a 466 representan una cadena pesada madura formada por la escisión de la secuencia señal. Las posiciones de aminoácidos 20 a 136 representan la región variable. Ambas de las secuencias de SEQ ID NOs: 42 y 43 también se muestran en la Figura 28. Cada secuencia CDR y su SEQ ID NO correspondiente se muestran en la Figura 38.

6)-4-4 Cadena pesada tipo hR198_H4:

Una cadena pesada R198 humanizada diseñada al reemplazar un residuo de glutamina en la posición de aminoácido 24 con un residuo de valina, un residuo de leucina en la posición de aminoácido 30 con un residuo de valina, un residuo de alanina en la posición de aminoácido 31 con un residuo de lisina, un residuo de serina en la posición de aminoácido 35 con un residuo de alanina, un residuo de metionina en la posición de

aminoácido 37 con un residuo de valina, un residuo de isoleucina en la posición de aminoácido 39 con un residuo de valina, un residuo de serina en la posición de aminoácido 50 con un residuo de alanina, un residuo de lisina en la
5 posición de aminoácido 57 con un residuo de arginina, un residuo de treonina en la posición de aminoácido 59 con un residuo de alanina, un residuo de treonina en la posición de aminoácido 60 con un residuo de prolina, un residuo de isoleucina en la posición de aminoácido 67 con un residuo de
10 valina, un residuo de valina en la posición de aminoácido 70 con un residuo de isoleucina, un residuo de ácido glutámico en la posición de aminoácido 81 con un residuo de alanina, un residuo de lisina en la posición de aminoácido 82 con un residuo de arginina, un residuo de lisina en la posición de
15 aminoácido 86 con un residuo de arginina, un residuo de serina en la posición de aminoácido 95 con un residuo de treonina, un residuo de fenilalanina en la posición de aminoácido 99 con un residuo de tirosina, un residuo de glutamina en la posición de aminoácido 101 con un residuo de
20 ácido glutámico, un residuo de treonina en la posición de aminoácido 106 con un residuo de arginina, un residuo de prolina en la posición de aminoácido 107 con un residuo de serina, un residuo de ácido aspártico en la posición de aminoácido 108 con un residuo de ácido glutámico, un residuo
25 de serina en la posición de aminoácido 110 con un residuo de

treonina, un residuo de valina en la posición de aminoácido 130 con un residuo de treonina, y un residuo de metionina en la posición de aminoácido 131 con un residuo de leucina conforme a la cadena pesada cR198 mostrada en SEQ ID NO: 29 del Listado de Secuencias se designó como una "cadena pesada tipo hR198_H4".

La secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada tipo hR198_H4 se muestra en SEQ ID NO: 44 del Listado de Secuencias. Las posiciones de nucleótidos 58 a 1398 que codifica una cadena pesada madura formada por la escisión de la secuencia señal. Las posiciones de nucleótidos 58 a 408 codifican la región variable. La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada tipo hR198_H4 se muestra en SEQ ID NO: 45 del Listado de Secuencias. Las posiciones de aminoácidos 20 a 466 representan una cadena pesada madura formada por la escisión de la secuencia señal. Las posiciones de aminoácidos 20 a 136 representan la región variable. Ambas de las secuencias de SEQ ID NOs: 44 y 45 también se muestran en la Figura 29. Cada secuencia CDR y su SEQ ID NO correspondiente se muestran en la Figura 38.

Ejemplo 7. Preparación del anticuerpo anti-Orai1 humano humanizado

7)-1 Construcción del vector de expresión hR198_L de cadena ligera de anticuerpo anti-Orai1 humano humanizado

25 7)-1-1 Construcción del vector de expresión hR198_L1

Un fragmento de ADN que comprende la secuencia de codificación de región variable hR198_L1 mostrado en las posiciones de nucleótidos 38 a 402 en la secuencia de nucleótidos de hR198_L1 representado por SEQ ID NO: 30 del

5 Listado de Secuencias se sintetizó (GeneArt Artificial Gene Synthesis service). El fragmento de ADN sintetizado se escindió con las enzimas de restricción AvaI y EcoRV y se insertó en el sitio correspondiente del vector de expresión de cadena ligera de anticuerpo quimérico y humanizado pCMA-LK

10 escindido con las mismas enzimas de restricción como lo anterior para construir un vector de expresión hR198_L1. El vector de expresión obtenido se designó como "pCMA-LK/hR198_L1".

7)-1-2 Construcción del vector de expresión hR198_L2

15 Un fragmento de ADN que comprende la secuencia de codificación de región variable hR198_L2 mostrada en las posiciones de nucleótidos 38 a 402 en la secuencia de nucleótidos de hR198_L2 representada por SEQ ID NO: 32 del Listado de Secuencias se sintetizó (GeneArt Artificial Gene

20 Synthesis service). El fragmento de ADN que comprende la secuencia de codificación de región variable hR198_L2 se amplificó con el fragmento de ADN sintetizado como una plantilla usando KOD -Plus- (Toyobo Co., Ltd.), escindida con la enzima de restricción BsiWI, y se insertó en el sitio

25 correspondiente del vector de expresión de cadena ligera de

anticuerpo quimerizado y humanizado pCMA-LK escindido con la enzima de restricción BsiWI para construir un vector de expresión hR198_L2. El vector de expresión obtenido se designó como "pCMA-LK/hR198_L2".

5 7)-1-3 Construcción de los vectores de expresión hR198_L3 y hR198_L4

Un fragmento de ADN que comprende la secuencia de codificación de región variable hR198_L4 mostrada en las posiciones de nucleótidos 38 a 402 en la secuencia de
10 nucleótidos de hR198_L4 representado por SEQ ID NO: 36 del Listado de Secuencias se sintetizó (GeneArt Artificial Gene Synthesis service). Un vector de expresión hR198_L4 se construyó por el mismo método como en el Ejemplo 7)-1-2. El vector de expresión obtenido se designó como "pCMA-
15 LK/hR198_L4".

Una mutación para reemplazar el residuo de valina en la posición de aminoácido 64 con un residuo de prolina se introdujo con pCMA-LK/hR198_L4 como la plantilla usando un kit de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange (Stratagene
20 Corp.). El vector de expresión obtenido que comprende la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 34 del Listado de Secuencias se designó como "pCMA-LK/hR198_L3".

7)-2 Construcción del vector de expresión hR198_H de cadena pesada de anticuerpo anti-Orai1 humano humanizado

25 7)-2-1 Construcción de los vectores de expresión

hR198_H1 y hR198_H2

Un fragmento de ADN que comprende la región variable hR198_H0 que codifica la secuencia mostrada en las posiciones de nucleótidos 36 a 425 en la secuencia de nucleótidos de hR198_H0 representada por SEQ ID NO: 111 del Listado de Secuencias se sintetizó como un candidato para la humanización de la cadena pesada de anticuerpo anti-Orai1 hR198 (GeneArt Artificial Gene Synthesis service). El fragmento de ADN que comprende la secuencia de codificación de región variable hR198_H0 se amplificó con el fragmento de ADN sintetizado como una plantilla usando KOD -Plus- y se insertó en el sitio correspondiente del vector de expresión de cadena pesada de tipo IgG1 de anticuerpo quimérico y humanizado pCMA-G1 escindido con la enzima de restricción BlpI usando un kit de clonación de PCR In-Fusion HD (Clontech Laboratories, Inc.) para construir un vector de expresión hR198_H0. El vector de expresión obtenido se designó como "pCMA-G1/hR198_H0". La secuencia de aminoácidos de hR198_H0 se muestra en SEQ ID NO: 112.

Después, una mutación para reemplazar un residuo de triptófano en la posición de aminoácido 66 con un residuo de tirosina se introdujo con pCMA-G1/hR198_H0 como la plantilla usando un kit de mutagénesis KOD -Plus- (Toyobo Co., Ltd.). El vector de expresión obtenido que comprende la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 40 del Listado de

Secuencias se designó como "pCMA-G1/hr198_H2".

Después, una mutación para reemplazar un residuo de isoleucina en la posición de aminoácido 56 con un residuo de valina se introdujo con pCMA-G1/hr198_H2 como la plantilla usando un kit de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange (Stratagene Corp.) y el conjunto de cebadores se proporciona a continuación. El vector de expresión obtenido que comprende la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 38 del Listado de Secuencias se designó como "pCMA-G1/hr198_H1".

7)-2-2 Construcción de los vectores de expresión hr198_H3, hr198_H4 y hr198_H5

Un fragmento de ADN que comprende la región variable hr198_H5 que codifica la secuencia mostrada en las posiciones de nucleótidos 36 a 425 en la secuencia de nucleótidos de hr198_H5 representada por SEQ ID NO: 113 del Listado de Secuencias se sintetizó como un candidato para la humanización de la cadena pesada de anticuerpo anti-Orai1 hr198 (GeneArt Artificial Gene Synthesis service). Un vector de expresión hr198_H5 se construyó por el mismo método como en el Ejemplo 7)-2-1. El vector de expresión obtenido se designó como "pCMA-G1/hr198_H5". La secuencia de aminoácidos de hr198_H5 se muestra en SEQ ID NO: 114.

Después, las mutaciones que reemplazan un residuo de triptófano en la posición de aminoácido 66 y un residuo de isoleucina en la posición de aminoácido 67 con un residuo de

tirosina y un residuo de valina, respectivamente, se introdujeron con pCMA-G1/H5 como la plantilla usando un kit de mutagénesis KOD -Plus-. El vector de expresión obtenido que comprende la secuencia de nucleótidos representada por
5 SEQ ID NO: 44 se designó como "pCMA-G1/hr198_H4".

Después, una mutación para reemplazar un residuo de isoleucina en la posición de aminoácido 56 con un residuo de valina se introdujo por el mismo método como en el Ejemplo 7)-2-1 con pCMA-G1/hr198_H4 como una plantilla. El vector de
10 expresión obtenido que comprende la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 44 del Listado de Secuencias se designó como "pCMA-G1/hr198_H3".

7)-3 Preparación del anticuerpo anti-Orai1 humano humanizado hr198

15 Células 293F se transfectaron con cada vector de expresión de cadena pesada de anticuerpo anti-Orai1 humano humanizado y cada vector de expresión de cadena ligera de anticuerpo anti-Orai1 humano humanizado por el mismo método como en 4)-5-1 para obtener un sobrenadante de cultivo que
20 contiene el anticuerpo.

Los anticuerpos anti-Orai1 humanos humanizados obtenidos por la combinación de pCMA-G1/hr198_H1 y pCMA-LK/hr198_L1, la combinación de pCMA-G1/hr198_H2 y pCMA-LK/hr198_L2, la combinación de pCMA-G1/hr198_H3 y pCMA-LK/hr198_L3, la
25 combinación de pCMA-G1/hr198_H4 y pCMA-LK/hr198_L4 se

designaron como "hR198_H1/L1", "hR198_H2/L2", "hR198_H3/L3", y "hR198_H4/L4", respectivamente.

Cada sobrenadante de cultivo obtenido se purificó por cromatografía de afinidad de rProteína A por el mismo método
5 como en 4)-5-2 para obtener una muestra de anticuerpo purificada.

Ejemplo 8. Actividad *in vitro* del anticuerpo anti-Orai1 humano humanizado

8)-1 Actividad de ligación a antígeno del anticuerpo
10 anti-Orai1 humano humanizado por citometría de flujo

A fin de evaluar la especificidad de ligación de Orai1 humano en la suspensión de células HEK293T transfectadas con pcADN3.1-DEST o la suspensión de células HEK293T transfectadas con pcADN3.1-hOrai1 preparadas por el método
15 mostrado en 1)-4-1 se centrifugó para remover el sobrenadante. Después, las células HEK293T se suspendieron mediante la adición del anticuerpo anti-Orai1 humanizado hR198_H1/L1, hR198_H2/L2, hR198_H3/L3, o hR198_H4/L4 preparados en 7)-5 o el anticuerpo precursor cR118 o cR198, y
20 se incubaron a 4°C durante 30 minutos. Las células se lavaron dos veces con PBS que contiene 5% de FBS, después se suspendieron por la adición de IgG FITC Anti-humano conjugado diluido 100 veces con PBS que contiene 5% de FBS, y se incubó a 4°C durante 30 minutos. Las células se lavaron dos veces
25 con PBS que contiene 5% de FBS y después se volvió a

suspender en PBS que contiene 5% de FBS y 1 µg/mL de yoduro de propidio, seguido por detección usando un citómetro de flujo (FC500). Los datos se usaron analizando Flowjo. Después de la exclusión de células muertas positivas de yoduro de propidio por acumulación, la intensidad de fluorescencia FITC de las células vivas se graficó como un histograma para calcular la intensidad de fluorescencia media (MFI). Los anticuerpos anti-Orai1 humanos humanizados hR198_H1/L1, hR198_H2/L2, hR198_H3/L3, y hR198_H4/L4 no se ligaron a las células HEK293T transfectadas con pcADN3.1-DEST y, como se muestra en la Figura 5, cada una se ligó solamente a las células HEK293T transfectadas con pcADN3.1-hOrai1 en una manera dependiente de concentración, como con el anticuerpo precursor cR118 o cR198, mostrando que estos anticuerpos se ligan cada uno específicamente al Orai1 humano.

8)-2 Efecto inhibidor de la activación de la línea de células T humanas del anticuerpo anti-Orai1 humano humanizado

Células Jurkat de línea de células T humanas se prepararon en una concentración de 1.5×10^6 células/mL en RPMI1640 que contiene 10% de FBS, 100 U/mL de penicilina, y 100 µg/mL de estreptomicina, se inocularon a 80 µL/pocillo en una placa de cultivo celular de 96 pocillos, y se pre-trataron con el anticuerpo anti-Orai1 humano humanizando hR198_H1/L1, hR198_H2/L2, hR198_H3/L3, o hR198_H4/L4 o el anticuerpo anti-Orai1 humano quimerizado humano cR118 o cR198

agregados en 10 μ L/pocillo a 37°C durante 60 minutos bajo condiciones de CO₂ al 5%. Después, 100 ng/mL de PMA y 1 μ g/mL de A23187 se agregaron en 10 μ L/pocillo y se agitaron bien, seguido por cultivo a 37°C durante aproximadamente 16 horas
5 bajo condiciones de CO₂ al 5%. La placa se agitó bien y después se centrifugó a 600 g durante 3 minutos. La concentración de IL-2 contenida en el sobrenadante se midió por el ELISA. La Figura 6 muestra que los anticuerpos anti-Orai1 humanos humanizados inhiben cada uno, en una manera
10 dependiente de concentración, la liberación de IL-2 de las células Jurkat tratadas con PMA y A23187. Los anticuerpos anti-Orai1 humanos humanizados cada uno mostró la liberación de IL-2 de las células Jurkat en una manera dependiente de concentración, y la actividad inhibidora de hR198_H1/L1 y
15 hR198_H2/L2 fue equivalente a aquella de los anticuerpos anti-Orai1 humano quimerizado humanos cR118 y cR198. Por otra parte, hR198_H3/L3 y hR198_H4/L4 mostraron actividad inhibidora en una concentración más baja que aquella de cR118 y cR198.

20 Ejemplo 9. Identificación de la mutación mejoradora de la actividad por la expresión de ribosomas

9)-1 Preparación de bibliotecas de cadena H y cadena L

Una biblioteca que contiene cadenas H o cadenas L mutadas se construyó con el anticuerpo anti-Orai1 humano
25 humanizado hR198_H4/L4 como una plantilla y se sometió a la

identificación de una mutación mejoradora de actividad por inspección de ribosoma.

9)-1-1 Preparación de la biblioteca de cadena H

80 ciclos de PCR se llevaron a cabo con el gen hR198_H4
5 como una plantilla usando el conjunto de cebadores proporcionados a continuación y la ADN polimerasa rTaq (Toyobo Co., Ltd.) para mutar la región del gen aleatoriamente.

Conjunto de cebadores

10 5'-ATGCAAGTCCAACTGGTTCAATC-3' (SEQ ID NO: 46; cebador Orai1 HF)

5'-TGACGGAGCCAGCGGGAAGAC-3' (SEQ ID NO: 47; cebador Orai1 CH FR)

Después, se llevó a cabo la PCR de solapamiento con cada
15 gen de cadena H mutado aleatoriamente, un sitio 5'UTR que comprende un promotor T7, y un fragmento de gen TolA que comprende la secuencia c-Myc agregada 5' y SecM agregada 3' como plantillas usando el conjunto de cebadores proporcionados a continuación para preparar una biblioteca de
20 cadena H.

Conjunto de cebadores

5'-CAGGAAACAGCTATGACCATG-3' (SEQ ID NO: 48; cebador M13 rev largo)

5'-CTCGAGTTATTCATTAGGTGAGGCGTTGAGG-3' (SEQ ID NO: 49; cebador
25 SecM de detención R)

9)-1-2 Preparación de la biblioteca de cadena L

80 ciclos de PCR se llevaron a cabo con el gen hr198_L4 como una plantilla usando el conjunto de cebadores proporcionados a continuación y la ADN polimerasa rTaq para mutar la región del gen aleatoriamente.

Conjunto de cebadores

5'-ATGGACATTCAACTGACCCAAAGC-3' (SEQ ID NO: 50; cebador Orai1 Lc F)

5'-GATAAAAACACTCGGGGCCGCCAC-3' (SEQ ID NO: 51; cebador Orai1 CL-FR)

De la misma forma como la descripción de 9)-1-1, la PCR de solapamiento se llevó a cabo usando el gen de cadena L aleatoriamente mutado y los dos fragmentos de gen descrito en lo anterior como plantillas para preparar una biblioteca de cadena L.

9)-1-3 Preparación del fragmento del gen de cadena H

La región del gen de cadena H se amplificó por PCR con el gen hr198_H4 como una plantilla usando el conjunto de cebadores proporcionado a continuación y KOD -Plus-.

Conjunto de cebadores

5'-ATGCAAGTCCAACCTGGTTCAATC-3' (SEQ ID NO: 46; cebador Orai1 HF)

5'-

TCATTATTTGTCATCGTCATCTTTATAGTCGAATTCTTCGCCACGATTAAAGGATTTGGTG

AC-3' (SEQ ID NO: 52; cebador Orai1 HR-FLAG R)

Después, la PCR de solapamiento se llevó a cabo con el fragmento del gen y un sitio 5'UTR que comprende un promotor T7 como plantillas usando el conjunto de cebadores proporcionado a continuación para preparar un fragmento de

5 gen de cadena H.

Conjunto de cebadores

5'-CAGGAAACAGCTATGACCATG-3' (SEQ ID NO: 48; cebador M13 rev largo)

5' -

10 TCATTATTTGTCATCGTCATCTTTATAGTCGAATTCTTCGCCACGATTAAAGGATTTGGTG
AC-3' (SEQ ID NO: 52; cebador Orai1 HR-FLAG R)

9)-1-4 Preparación del fragmento del gen de cadena L

La región del gen de cadena L se amplificó por PCR con el gen hr198_L4 como una plantilla usando el conjunto de

15 cebadores proporcionado a continuación y KOD -Plus-.

Conjunto de cebadores

5'-ATGGACATTCAACTGACCCAAAGC-3' (SEQ ID NO: 50; cebador Orai1 Lc F)

5' -

20 TCATTATTTGTCATCGTCATCTTTATAGTCGAATTCTTCGCCACGATTAAAGGATTTGGTG
AC-3' (SEQ ID NO: 53; cebador Orai1 CL-FLAG R)

Después, de la misma forma como la descripción de 9)-1-3 la PCR de solapamiento se llevó a cabo para preparar un fragmento de gen de cadena L.

25 Conjunto de cebadores

5'-CAGGAAACAGCTATGACCATG-3' (SEQ ID NO: 48; cebador M13 rev largo)

5'-

TCATTATTTGTCATCGTCATCTTTATAGTCGAATTCTTCGCCACGATTAAAGGATTTGGTG

5 AC-3' (SEQ ID NO: 53; cebador Orail CL-FLAG R)

9)-1-5 Preparación de mRNA

Cada ARNm se sintetizó con las bibliotecas los fragmentos del gen preparados en los Ejemplos 9)-1-1 a 9)-1-4 como plantillas usando el Sistema de Producción de ARN a Gran Escala T7 RiboMax Express (Promega Corp.).

9)-2 Clasificación para la expresión de ribosoma

Los Fabs que expresan los ribosomas de cadena H se prepararon por la combinación de la biblioteca de cadena H y el fragmento del gen de cadena L, y los Fabs que expresan ribosoma de cadena L se prepararon mediante la combinación de la biblioteca de cadena L y el fragmento de gen de cadena H. 20 pmol de los ARNms de biblioteca de cadena H (o cadena L) y 100 pmol de ribosomas se agregaron a una solución de reacción PUREfrex (GeneFrontier Corp.), y la mezcla se incubó a 30°C durante 45 minutos. Del mismo modo, 40 pmol de los ARNms de cadena L (o cadena H) y 200 pmol de ribosomas se agregaron a una solución de reacción PUREfrex, y la mezcla se incubó a 30°C durante 45 minutos. Después, las soluciones de reacción postraduccionales de la biblioteca de cadena H (o cadena L) y la cadena L (o cadena H) se mezclaron y se incubaron

adicionalmente a 30°C durante 90 minutos para preparar los Fabs que expresan ribosoma de cadena H (o cadena L). Después, la reacción se terminó al enfriar a 4°C. Subsecuentemente, se agregó un antígeno a la solución de reacción, y la mezcla se

5 agitó suavemente a 4°C durante 1 hora de modo que cada Fab se ligó al antígeno. El antígeno usado como una muestra fijada en formalina de células CHO expresan constitutivamente Orai1 humano que se establecieron mediante el uso de pcADN3.1-hOrai1 preparados en 1)-1-1, o el péptido de región de bucle

10 Orai1 humano PEGilado con biotina (Sigma-Aldrich Corp.) se muestran a continuación.

Péptido de región bucle Orai1 humano PEGilado con biotina

Biotina-PEG-SGSGFLPLKKQPGQPRPTSKPPASGAAANVSTSGITPGQAAAIASSTTI

15 (SEQ ID NO: 115)

Los Fabs que expresan ribosoma ligados con el antígeno se recuperaron usando cuentas magnéticas de Estreptavidina Nonolink (SoluLink, Inc.). Subsecuentemente, el antígeno se lavó con Tris-HCl 50 mM (pH 7.4), NaCl 150 mM, Mg(OAc)₂ 15 mM,

20 0.05% de Tween 20, y 1 mg/mL de ARN de levadura, y con Tris-HCl 50 mM (pH 7.4), NaCl 150 mM, Mg(OAc)₂ 15 mM, y 0.05% de Tween 20. Después, el Tris-HCl 50 mM (pH 7.4), NaCl 150 mM, Mg(OAc)₂ 15 mM, y EDTA 50 mM se agregaron al antígeno, y las mezclas se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 10

25 minutos, seguido por la recuperación de un sobrenadante que

contiene ARNms por centrifugación. Los ADNcs se formaron de los ARNms recuperados usando un Kit de Síntesis de ADNc de Alta Fidelidad Transcriptor (F. Hoffmann-La Roche, Ltd.) y después se amplificaron como ADNs por PCR usando el conjunto
 5 de cebadores proporcionado a continuación y KOD -Plus-. Los ARNms se sintetizaron con los ADNs como plantillas y se clasificaron adicionalmente de la misma forma como en lo anterior. El ciclo de clasificación se llevó a cabo varias veces para seleccionar un gen de un anticuerpo que se liga en
 10 gran medida al antígeno.

Conjunto de cebadores

5'-ATGGACATTCAACTGACCCAAAGC-3' (SEQ ID NO: 50; cebador Orai1-LcF)

5'-CAGATCCTCCTCAGAGATCAGCTTCTGCTC-3' (SEQ ID NO: 54; cebador
 15 Myc-R)

9)-3 Preparación de la proteína Fab

Los genes seleccionados se subclonaron en vectores para la expresión en *E. coli* y se clasificaron por el ELISA Celular para clones con actividad de ligación mejorada contra
 20 células CHO que expresan constitutivamente Orai1 humano. Cada ADN seleccionado se escindió con enzimas de restricción EcoRV y XhoI y se insertó en un vector para la expresión Fab (GeneFrontier Corp.) escindida con las mismas enzimas como en lo anterior, que después se transfirió a BL21 de *E. coli*
 25 (DE3). Los transformantes obtenidos de esta manera se

cultivaron a 37°C durante 4 a 5 horas en 150 µL de carbenicilina/0.1% de glucosa/2 x YT por pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo redondo. Después, la placa se enfrió a 4°C, y después, se agregó IPTG a la misma en una
5 concentración final de 0.5 mM, seguido por cultivo de agitación durante la noche a 30°C. Después, las células bacterianas se recuperaron por centrifugación, y después una solución amortiguadora de lisis (2.5 mg/mL de lisosima, 100 U de DNasa I) se agregó a la misma, seguido por agitación a
10 temperatura ambiente durante 60 minutos. Subsecuentemente, el sobrenadante se recuperó por centrifugación para preparar las muestras de Fab.

9)-4 Clasificación por ELISA Celular

Las células que expresan Orai1 humano se cultivaron en
15 una placa de 384 pocillos hasta que se convirtieron a una hoja confluyente. Después, la placa se lavó con una solución amortiguadora de lavado (PBS(-), MgSO₄ 20 mM, 2.5% de FBS). Después, las muestras de Fab se agregaron a la placa, y la placa se agitó a 4°C durante 1 hora. Después del lavado
20 cuatro veces con una solución amortiguadora de lavado, un anticuerpo de cabra F(ab')₂ anti-humano etiquetado con peroxidasa (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) se agregó a la misma, y la placa se agito a 4°C durante 30 minutos. La placa se lavó tres veces con una solución
25 amortiguadora de lavado y después se lavó tres veces con

PBS(-) y MgSO_4 20 mM. Después, un reactivo cromogénico (0.4 mg/mL de tetrametil-bencidina, acetato de sodio 200 mM (pH 3.4), 0.01% de solución de peróxido de hidrógeno acuosa) se agregó a la misma, y la placa se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Después, HCl 2 N se agregó a la misma, seguido por la medición de OD_{450} . Una muestra de Fab que muestra OD_{450} más alta contra las células CHO que expresan constitutivamente Orai1 humano, como es comparado con las células CHO de control, se seleccionó.

10 9)-5 Actividad de ligación a antígeno del anticuerpo anti-Orai1 humano Fab por citometría de flujo

A fin de evaluar la especificidad de ligación a Orai1 humano, la suspensión de células HEK293T transfectadas con pcADN3.1-DEST o la suspensión de células HEK293T transfectadas con pcADN3.1-hOrai1 preparada por el método
15 mostrado en 1)-4-1 se centrifugó para remover el sobrenadante. Después, las células HEK293T se suspendieron por la adición del clon mutado de cadena ligera LCDR60, LCDR67, LCDR83, CE151, o PE057 o el clon mutado de cadena
20 pesada HCDR046, HCDR047, HEP087, HEP124, o HEP237 seleccionados en 9)-4, o el anticuerpo precursor Fab hR198_H4/L4-Fab, y se dejó reposar a 4°C durante 30 minutos. Las células se lavaron dos veces con PBS que contiene 5% de FBS, después se suspendió por la adición del conjugado IgG
25 FITC Anti-humano diluido 100 veces con PBS que contiene 5% de

FBS, y se dejó reposar a 4°C durante 30 minutos. Las células se lavaron dos veces con PBS que contiene 5% de FBS y después se volvieron a suspender en PBS que contiene 5% de FBS y 1 µg/mL de yoduro de propidio, seguido por detección usando un
5 citómetro de flujo (FC500). Los datos se analizaron usando Flowjo. Después de la remoción de las células muertas positivas de yoduro de propidio por acumulación, la intensidad de fluorescencia FITC de las células vivas se graficó a un histograma para calcular la intensidad de
10 fluorescencia media (MFI). Los clones mutados de cadena ligera LCDR60, LCDR67, LCDR83, CE151, y PE057 y los clones mutados de cadena pesada HCDR046, HCDR047, HEP087, HEP124, y HEP237 no se ligaron a las células HEK293T transfectadas con pcADN3.1-DEST, como con el anticuerpo precursor Fab
15 hR198_H4/L4-Fab y, como se muestra en las Figuras 7A-7C, cada uno tendió a ligarse al Orai1 humano en las células HEK293T transfectadas con pcADN3.1-hOrai1 en un nivel equivalente a o más fuerte que aquel del anticuerpo precursor Fab.

Ejemplo 10. Preparación del anticuerpo de maduración por
20 afinidad del anticuerpo anti-Orai1 humano humanizado

100 o más tipos de anticuerpos hR198_H3/L3 modificados se prepararon por la transferencia de algunas mutaciones mejoradoras de actividad encontradas en los clones mutados de cadena ligera LCDR60, LCDR67, LCDR83, CE151, y PE057 y los
25 clones mutados de cadena pesada HCDR046, HCDR047, HEP087,

HEP124, y HEP237 seleccionados en el Ejemplo 9) a hr198_H3/L3, y evaluados desde el punto de vista de la afinidad de ligación, actividad *in vitro*, productividad, y antigenicidad heterogénea contra humanos. Como resultado, los anticuerpos mostrados a continuación fueron seleccionados.

10)-1 Diseño del anticuerpo de maduración por afinidad del anticuerpo anti-Orai1 humano humanizado

10)-1-1 Cadena ligera tipo hr198_LG1:

Una cadena ligera R198 humanizada diseñada al reemplazar un residuo de asparagina en la posición de aminoácido 51 con un residuo de glicina, un residuo de treonina en la posición de aminoácido 113 con un residuo de isoleucina, y un residuo de treonina en la posición de aminoácido 117 con un residuo de serina conforme a la cadena ligera hr198_L3 mostrada en SEQ ID NO: 35 del Listado de Secuencias se designó como una "cadena ligera tipo hr198_LG1".

La secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera tipo hr198_LG1 se muestra en SEQ ID NO: 55 del Listado de Secuencias. Las posiciones de nucleótidos 61 a 702 codifican una cadena ligera madura formada por la escisión de la secuencia señal. Las posiciones de nucleótidos 61 a 378 codifican la región variable. La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera tipo hr198_LG1 se muestra en SEQ ID NO: 56 del Listado de Secuencias. Las posiciones de aminoácidos 21 a 234 representan la cadena ligera madura formada por la

escisión de la secuencia señal. Las posiciones de aminoácidos 21 a 126 representan la región variable. Ambas de las secuencias de SEQ ID NOs: 55 y 56 también se muestran en la Figura 30. Cada secuencia CDR y su SEQ ID NO correspondiente
5 se muestran en la Figura 38.

10)-1-2 cadena ligera tipo hR198_LG2:

Una cadena ligera R198 humanizada diseñada al reemplazar un residuo de arginina en la posición de aminoácido 44 con un residuo de histidina, un residuo de serina en la posición de
10 aminoácido 48 con un residuo de asparagina, un residuo de asparagina en la posición de aminoácido 51 con un residuo de glicina, un residuo de serina en la posición de aminoácido 70 con un residuo de leucina, un residuo de ácido glutámico en la posición de aminoácido 75 con un residuo de ácido
15 aspártico, un residuo de serina en la posición de aminoácido 76 con un residuo de triptófano, un residuo de treonina en la posición de aminoácido 113 con un residuo de isoleucina, y un residuo de treonina en la posición de aminoácido 117 con un residuo de serina conforme a la cadena ligera hR198_L3
20 mostrada en SEQ ID NO: 35 del Listado de Secuencias se designó como una "cadena ligera tipo hR198_LG2".

La secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera tipo hR198_LG2 se muestra en SEQ ID NO: 57 del Listado de Secuencias. Las posiciones de nucleótidos 61 a 702
25 codifican una cadena ligera madura formada por la escisión de

la secuencia señal. Las posiciones de nucleótidos 61 a 378 codifican la región variable. La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera tipo hR198_LG2 se muestra en SEQ ID NO: 58 del Listado de Secuencias. Las posiciones de aminoácidos 21 a 234 representan la cadena ligera madura formada por la escisión de la secuencia señal. Las posiciones de aminoácidos 21 a 126 representan la región variable. Ambas de las secuencias de SEQ ID NOs: 57 y 58 también se muestran en la Figura 31. Cada secuencia CDR y su SEQ ID NO correspondiente se muestran en la Figura 38.

10)-1-3 Cadena ligera tipo hR198_LG3:

Una cadena ligera R198 humanizada diseñada al reemplazar un residuo de arginina en la posición de aminoácido 44 con un residuo de histidina, un residuo de glutamina en la posición de aminoácido 47 con un residuo de arginina, un residuo de serina en la posición de aminoácido 48 con un residuo de asparagina, un residuo de asparagina en la posición de aminoácido 51 con un residuo de glicina, un residuo de serina en la posición de aminoácido 70 con un residuo de leucina, un residuo de treonina en la posición de aminoácido 73 con un residuo de serina, un residuo de ácido glutámico en la posición de aminoácido 75 con un residuo de ácido aspártico, un residuo de serina en la posición de aminoácido 76 con un residuo de triptófano, un residuo de treonina en la posición de aminoácido 113 con un residuo de isoleucina, y un residuo

de treonina en la posición de aminoácido 117 con un residuo de serina conforme a la cadena ligera hR198_L3 mostrada en SEQ ID NO: 35 del Listado de Secuencias se designó como una "cadena ligera tipo hR198_LG3".

5 La secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera tipo hR198_LG3 se muestra en SEQ ID NO: 59 del Listado de Secuencias. Las posiciones de nucleótidos 61 a 702 codifican una cadena ligera madura formada por la escisión de la secuencia señal. Las posiciones de nucleótidos 61 a 378
10 codifican la región variable. La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera tipo hR198_LG3 se muestra en SEQ ID NO: 60 del Listado de Secuencias. Las posiciones de aminoácidos 21 a 234 representan la cadena ligera madura formada por la escisión de la secuencia señal. Las posiciones de aminoácidos
15 21 a 126 representan la región variable. Ambas de las secuencias de SEQ ID NOs: 59 y 60 también se muestran en la Figura 32. Cada secuencia CDR y su SEQ ID NO correspondiente se muestran en la Figura 38.

10)-1-4 Cadena pesada tipo hR198_HG1:

20 Una cadena pesada R198 humanizada diseñada para reemplazar un residuo de asparagina en la posición de aminoácido 78 con un residuo de ácido aspártico, y un residuo de valina en la posición de aminoácido 123 con un residuo de alanina conforme a la cadena pesada hR198_H3 mostrada en SEQ
25 ID NO: 43 del Listado de Secuencias se designó como una

“cadena pesada tipo hR198_HG1”.

La secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada tipo hR198_HG1 se muestra en SEQ ID NO: 61 del Listado de Secuencias. Las posiciones de nucleótidos 58 a 1398
 5 codifican una cadena pesada madura formada por la escisión de la secuencia señal. Las posiciones de nucleótidos 58 a 408 codifican la región variable. La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada tipo hR198_HG1 se muestra en SEQ ID NO: 62 del Listado de Secuencias. Las posiciones de aminoácidos 20 a
 10 466 representan una cadena pesada madura formada por la escisión de la secuencia señal. Las posiciones de aminoácidos 20 a 135 representan la región variable. Ambas de las secuencias de SEQ ID NOs: 61 y 62 también se muestran en la Figura 33. Cada secuencia CDR y su SEQ ID NO correspondiente
 15 se muestran en la Figura 38.

10)-1-5 Cadena pesada tipo hR198_HG2:

Una cadena pesada R198 humanizada diseñada para reemplazar un residuo de valina en la posición de aminoácido 48 con un residuo de isoleucina, un residuo de asparagina en
 20 la posición de aminoácido 78 con un residuo de ácido aspártico, un residuo de alanina en la posición de aminoácido 81 con un residuo de glicina, y un residuo de valina en la posición de aminoácido 123 con un residuo de alanina conforme a la cadena pesada hR198_H3 mostrada en SEQ ID NO: 43 del
 25 Listado de Secuencias se designó como una “cadena pesada tipo

hR198_HG2".

La secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada tipo hR198_HG2 se muestra en SEQ ID NO: 63 del Listado de Secuencias. Las posiciones de nucleótidos 58 a 1398 que
 5 codifica una cadena pesada madura formada por la escisión de la secuencia señal. Las posiciones de nucleótidos 58 a 408 codifican la región variable. La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada tipo hR198_HG2 se muestra en SEQ ID NO: 64 del Listado de Secuencias. Las posiciones de aminoácidos 20 a
 10 466 representan una cadena pesada madura formada por la escisión de la secuencia señal. Las posiciones de aminoácidos 20 a 135 representan la región variable. Ambas de las secuencias de SEQ ID NOs: 63 y 64 también se muestran en la Figura 34. Cada secuencia CDR y su SEQ ID NO correspondiente
 15 se muestran en la Figura 38.

10)-1-6 Cadena pesada tipo hR198_HG3:

Una cadena pesada R198 humanizada diseñada para reemplazar un residuo de valina en la posición de aminoácido 48 con un residuo de isoleucina, un residuo de asparagina en
 20 la posición de aminoácido 78 con un residuo de ácido aspártico, un residuo de alanina en la posición de aminoácido 81 con un residuo de metionina, y un residuo de valina en la posición de aminoácido 123 con un residuo de alanina conforme a la cadena pesada hR198_H3 mostrada en SEQ ID NO: 43 del
 25 Listado de Secuencias se designó como una "cadena pesada tipo

hR198_HG3".

La secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada tipo hR198_HG3 se muestra en SEQ ID NO: 65 del Listado de Secuencias. Las posiciones de nucleótidos 58 a 1398 que
 5 codifica una cadena pesada madura formada por la escisión de la secuencia señal. Las posiciones de nucleótidos 58 a 408 codifican la región variable. La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada tipo hR198_HG3 se muestra en SEQ ID NO: 66 del Listado de Secuencias. Las posiciones de aminoácidos 20 a
 10 466 representan una cadena pesada madura formada por la escisión de la secuencia señal. Las posiciones de aminoácidos 20 a 135 representan la región variable. Ambas de las secuencias de SEQ ID NOs: 65 y 66 también se muestran en la Figura 35. Cada secuencia CDR y su SEQ ID NO correspondiente
 15 se muestran en la Figura 38.

10)-2 Preparación del vector de expresión de anticuerpo de maduración por afinidad del anticuerpo anti-Orai1 humano humanizado

10)-2-1 Construcción del vector de expresión de cadena
 20 ligera tipo hR198_LG1

Las mutaciones para reemplazar un residuo de asparagina en la posición de aminoácido 51 con un residuo de glicina, un residuo de treonina en la posición de aminoácido 113 con un residuo de isoleucina, y un residuo de treonina en la
 25 posición de aminoácido 117 con un residuo de serina se

introdujeron con pCMA-LK/hR198_L3 como la plantilla usando la mutagénesis KOD -Plus-. El vector de expresión obtenido que comprende la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 55 del Listado de Secuencias se designó como “pCMA-LK/hR198_LG1”.

10)-2-2 Construcción de los vectores de expresión de cadena ligera tipo hR198_LG2 y LG3

Un fragmento de ADN que comprende la secuencia de codificación de región variable hR198_LG3 mostrada en las posiciones de nucleótidos 38 a 402 en la secuencia de nucleótidos de hR198_LG3 representada por SEQ ID NO: 59 del Listado de Secuencias se sintetizó (GeneArt Artificial Gene Synthesis service). El fragmento de ADN sintetizado se escindió con enzimas de restricción EcoRV y AvaI se insertó a pCMA-LK/hR198_LG1 escindida con las mismas enzimas de restricción como en lo anterior para construir un vector de expresión hR198_LG3. El vector de expresión obtenido se designó como “pCMA-LK/hR198_LG3”.

Las mutaciones para reemplazar un residuo de arginina en la posición de aminoácido 47 con un residuo de glutamina y un residuo de serina en la posición de aminoácido 73 con un residuo de treonina se introdujeron con pCMA-LK/hR198_LG3 como la plantilla usando la mutagénesis KOD -Plus-. El vector de expresión obtenido que comprende la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 57 del Listado de

Secuencias se designó como "pCMA-LK/hR198_LG2".

10)-2-3 Construcción del vector de expresión de cadena pesada tipo hR198_HG1

Las mutaciones para reemplazar un residuo de asparagina
5 en la posición de aminoácido 78 con un residuo de ácido aspártico y un residuo de valina en la posición de aminoácido 123 con un residuo de alanina se introdujeron con pCMA-G1/hR198_H3 como la plantilla usando La mutagénesis KOD -Plus-. El vector de expresión obtenido que comprende la
10 secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 61 del Listado de Secuencias se designó como "pCMA-G1/hR198_HG1".

10)-2-4 Construcción del vector de expresión de cadena pesada tipo hR198_HG2

Las mutaciones para reemplazar un residuo de valina en
15 la posición de aminoácido 48 con un residuo de isoleucina y un residuo de alanina en la posición de aminoácido 81 con un residuo de glicina se introdujeron con pCMA-G1/hR198_HG1 como la plantilla usando La mutagénesis KOD -Plus-. El vector de expresión obtenido que comprende la secuencia de nucleótidos
20 representada por SEQ ID NO: 63 del Listado de Secuencias se designó como "pCMA-G1/hR198_HG2".

10)-2-5 Construcción del vector de expresión de cadena pesada tipo hR198_HG3

Una mutación para reemplazar un residuo de glicina en la
25 posición de aminoácido 81 con un residuo de metionina se

introdujo con pCMA-G1/hR198_HG2 como la plantilla usando La mutagénesis KOD -Plus-. El vector de expresión obtenido que comprende la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 65 del Listado de Secuencias se designó como “pCMA-
5 G1/hR198_HG3”.

10)-3 Preparación del anticuerpo de maduración por afinidad del anticuerpo anti-Orai1 humano humanizado

Células FreeStyle 293F se transfectaron con cada vector de expresión de cadena pesada de anticuerpo anti-Orai1 humano humanizado y cada vector de expresión de cadena ligera de anticuerpo anti-Orai1 humano humanizado preparados en 10)-2 por el mismo método como en 4)-5-1 para obtener un sobrenadante de cultivo que contiene el anticuerpo.

Los anticuerpos anti-Orai1 humanos humanizados se obtuvieron por la combinación de los pCMA-G1/hR198_H3 o pCMA-G1/hR198_HG1, pCMA-G1/hR198_HG2, o pCMA-G1/hR198_HG3 templados, con pCMA-LK/hR198_LG1, pCMA-LK/hR198_LG2, o pCMA-LK/hR198_LG3 se designaron como “hR198_H3/LG1”, “hR198_HG1/LG1”, “hR198_HG1/LG2”, “hR198_HG1/LG3”, “hR198_HG2/LG1”, y “hR198_HG3/LG1”, respectivamente.
20

Cada sobrenadante de cultivo obtenido se purificó por cromatografía de afinidad de rProteína A por el mismo método como en 4)-5-2 para obtener una muestra de anticuerpo purificada.

25 Ejemplo 11. Actividad *in vitro* del anticuerpo de

maduración por afinidad

11)-1 Evaluación de la capacidad del anticuerpo de maduración por afinidad para ligarse por citometría de flujo

A fin de evaluar la especificidad de ligación a Orail
5 humano, la suspensión de células HEK293T transfectadas con pcADN3.1-DEST o la suspensión de células HEK293T transfectadas con pcADN3.1-hOrail preparadas por el método
mostrado en 1)-4-1 se centrifugaron para remover el sobrenadante. Después, las células HEK293T se suspendieron
10 por la adición del anticuerpo de maduración por afinidad hR198_H3/LG1, hR198_HG1/LG1, hR198_HG1/LG2, hR198_HG1/LG3, hR198_HG2/LG1, o hR198_HG3/LG1 preparados en 10)-3 o el anticuerpo precursor hR198_H3/L3 o hR198_H4/L4, se incubaron a 4°C durante 30 minutos. Las células se lavaron dos veces
15 con PBS que contiene 5% de FBS, después se suspendieron por la adición del conjugado Anti-IgG FITC humano diluido 100 veces con PBS que contiene 5% de FBS, y se incubaron a 4°C durante 30 minutos. Las células se lavaron dos veces con PBS que contiene 5% de FBS y después se volvieron a suspender en
20 PBS que contiene 5% de FBS y 1 µg/mL de yoduro de propidio, seguido por detección usando un citómetro de flujo (FC500). Los datos se analizaron usando el Flowjo. Después de la exclusión de las células muertas positivas de yoduro de propidio por acumulación, la intensidad de fluorescencia FITC
25 de las células vivas se graficó como un histograma para

calcular la intensidad de fluorescencia media (MFI). Los anticuerpos de maduración por afinidad hR198_H3/LG1, hR198_HG1/LG1, hR198_HG1/LG2, hR198_HG1/LG3, hR198_HG2/LG1, y hR198_HG3/LG1 no se ligaron a las células HEK293T
5 transfectadas con pcADN3.1-DEST, como con el anticuerpo precursor hR198_H3/L3 o hR198_H4/L4, y, como se muestra en la Figura 8, cada uno tendió a ligarse al Orai1 humano en las células HEK293T transfectadas con pcADN3.1-hOrai1 en un nivel equivalente a o más potente que aquel del anticuerpo
10 precursor.

11)-2 Efecto inhibidor de la activación de células T del anticuerpo de maduración por afinidad

Células Jurkat de línea de células T humanas se prepararon en una concentración de 1.5×10^6 células/mL en
15 RPMI1640 que contiene 10% de FBS, 100 U/mL de penicilina, y 100 µg/mL de estreptomicina, inoculados a 80 µL/pocillo en una placa de cultivo celular de 96 pocillos, y se pre-trataron con el anticuerpo de maduración por afinidad hR198_H3/LG1, hR198_HG1/LG1, hR198_HG1/LG2, hR198_HG1/LG3,
20 hR198_HG2/LG1, o hR198_HG3/LG1 o el anticuerpo anti-Orai1 humano humanizado hR198_H3/L3 o hR198_H4/L4 agregado a 10 µL/pocillo a 37°C durante 60 minutos bajo condiciones de CO₂ al 5%. Después, 100 ng/mL de PMA y 1 µg/mL de A23187 se agregaron a 10 µL/pocillo y se agitaron bien, seguido por el
25 cultivo a 37°C durante aproximadamente 16 horas bajo

condiciones de CO₂ al 5%. La placa se agitó bien y después se centrifugó a 600 g durante 3 minutos. La concentración de IL-2 contenida en el sobrenadante se midió por el ELISA. La Figura 9 muestra que los anticuerpos de maduración por afinidad inhiben cada uno, en una manera dependiente de concentración, la liberación de IL-2 de las células Jurkat tratadas con PMA y A23187. Los anticuerpos de maduración por afinidad cada uno inhibió la liberación de IL-2 de las células Jurkat en una manera dependiente de concentración y todos fueron superiores en la actividad inhibidora a los anticuerpos anti-Orai1 humanos humanizados hH3/L3 y hH4/L4, que fueron anticuerpos precursores.

Ejemplo 12. Preparación de la forma modificada con la actividad efectora reducida del anticuerpo de maduración por afinidad

Una secuencia hR198_HG1-LALA modificada de región constante derivada de hR198_HG1 por la sustitución de dos residuos de aminoácidos en la región constante se construyó como se describe en los siguientes Ejemplos.

12)-1 Diseño del vector de expresión de cadena pesada tipo LALA

Para evitar la citotoxicidad contra las células normales que expresan Orai1 humano, es deseable que un anticuerpo deba tener una actividad efectora baja. La actividad efectora es conocida por diferir entre las subclases de anticuerpo. Se

observan las siguientes características, por ejemplo, IgG4 tiene actividades ADCC y CDC bajas, y IgG2 tiene actividad CDC, pero tiene actividad ADCC baja. Sobre la base de estas características, es posible preparar un anticuerpo IgG1 con actividades ADCC y CDC reducidas al sustituir parcialmente las secuencias de región constante de IgG1 con referencia a IgG2 o IgG4. Como ejemplo, Marjan Hezareh y colaboradores, Journal of Virology, 75 (24): 12161-12168 (2001) muestra que las actividades ADCC y CDC de la IgG1 se reducen al reemplazar cada uno de los residuos de lisina en las posiciones 234 y 235 (las posiciones son indicadas por el índice de EU de Kabat y colaboradores) de IgG1 con un residuo de alanina. Por consiguiente, una cadena pesada de anticuerpo anti-Orai1 humano humanizado diseñada al reemplazar un residuo de leucina en la posición de aminoácido 253 con un residuo de alanina y un residuo de leucina en la posición de aminoácido 254 con un residuo de alanina conforme a la cadena pesada tipo hR198_HG1 preparada en 10)-1 se designó como una "cadena pesada tipo hR198_HG1-LALA".

12)-2 Construcción del vector de expresión de cadena pesada tipo LALA

12)-2-1 Construcción del vector de expresión de cadena pesada tipo hR198_HG1-LALA

Las mutaciones se introdujeron con la cadena pesada tipo hR198_H4 pCMA-G1/hR198_H4 preparada en 7)-2 como una

plantilla usando un Kit de mutagénesis KOD -Plus- para construir un vector de expresión de cadena pesada tipo hR198_H4-LALA. El vector de expresión obtenido se designó como "pCMA-G1-LALA/hR198_H4". La secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada tipo hR198_H4-LALA y la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada se muestran en SEQ ID NOs: 67 y 68 (Figura 36), respectivamente, del Listado de Secuencias.

Un fragmento de ADN de aproximadamente 0.6 kb que comprende la secuencia de codificación de región variable de anticuerpo se obtuvo por la digestión de pCMA-G1/hR198_HG1 preparado en 10)-2 con las enzimas de restricción PstI y XbaI, y se insertó en un fragmento de ADN de aproximadamente 4.2 kb obtenido por la digestión de pCMA-G1-LALA/hR198_H4 con las mismas enzimas de restricción como en lo anterior usando Ligation High ver. 2 para construir un vector de expresión de cadena pesada tipo hR198_HG1-LALA. El vector de expresión obtenido se designó como "pCMA-G1-LALA/hR198_HG1". La secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada tipo hR198_HG1-LALA y la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada se muestran en SEQ ID NOs: 69 y 70 (Figura 37), respectivamente, del Listado de Secuencias.

12)-3 Preparación de la forma modificada con la actividad efectora reducida del anticuerpo de maduración por afinidad

12)-3-1 Producción de la forma modificada con la actividad efectora reducida del anticuerpo de maduración por afinidad.

Células FreeStyle 293F (Life Technologies Corp.) se
5 subcultivaron y se cultivaron de acuerdo con el manual. 1.2×10^9 células FreeStyle 293F (Life Technologies Corp.) en la fase de crecimiento logarítmico se inocularon en un matraz Fernbach Erlenmeyer de 3 L (Corning Inc.), preparado a 1.0×10^6 células/mL por dilución con el medio de expresión
10 FreeStyle 293 (Invitrogen Corp.), y después se cultivó en agitación a 90 rpm a 37°C durante 1 hora en una incubadora de CO₂ al 8%. 3.6 mg de polietilenimina (Polysciences #24765) se disolvieron en 20 mL de Opti-Pro SFM (Life Technologies Corp.). Después, cada vector de expresión de cadena ligera
15 (0.8 mg) y cada vector de expresión de cadena pesada (0.4 mg) preparados usando el kit de Plásmido PureLink HiPure (Life Technologies Corp.) se agregaron a 20 mL de Opti-Pro SFM (Life Technologies Corp.). 20 mL de la solución mezclada del vector de expresión/Opti-Pro SFM se agregó a 20 mL de la
20 solución mezclada de polietilenimina/Opti-Pro SFM, y la mezcla se agitó suavemente, se dejó reposar durante 5 minutos, y después se agregó a las células FreeStyle 293F. Las células se cultivaron con agitación a 90 rpm a 37°C durante 7 días en una incubadora de CO₂ al 8%, y el
25 sobrenadante de cultivo obtenido se filtró a través de un

Filtro de Cápsula Desechable (ADVANTEC #CCS-045-E1H). El
hR198_HG1/LG1 se produjo por la combinación de pCMA-
G1/hR198_HG1 y pCMA-LK/hR198_LG1, y hR198_HG1-LALA/LG1 se
produjo por la combinación de pCMA-G1-LALA/hR198_HG1 y pCMA-
5 LK/hR198_LG1.

12)-3-2 Purificación en dos pasos de la forma modificada
con la actividad efectora reducida del anticuerpo de
maduración por afinidad

Cada anticuerpo se purificó del sobrenadante de cultivo
10 obtenido en el Ejemplo 12)-3-1 en dos pasos usando la
cromatografía de afinidad de rProteína A (de 4 a 6°C) e
hidroxiapatita de cerámica (a temperatura ambiente). El paso
de reemplazo de solución amortiguadora después de la
purificación por la cromatografía de afinidad de rProteína A
15 y después de la purificación por la hidroxiapatita de
cerámica se llevó a cabo de 4 a 6°C. El sobrenadante de
cultivo se aplicó a MabSelectSuRe (GE Healthcare Bio-Sciences
Corp., columna HiTrap) equilibrado con PBS. Después de la
entrada del sobrenadante de cultivo completo en la columna,
20 la columna se lavó con PBS en 2 o más veces el volumen de la
columna. Después, las fracciones que contienen el anticuerpo
se recolectaron por elusión con una solución de clorhidrato
de arginina 2 M (pH 4.0). Las soluciones amortiguadoras de
las fracciones se reemplazaron con PBS mediante diálisis
25 (Thermo Fisher Scientific Inc., Slide-A-Lyzer Dialysis

Cassette) y después se diluyó 5 veces con una solución amortiguadora de fosfato de sodio 5 mM/MES 50 mM (pH 7.0). La solución de anticuerpo resultante se aplicó a una columna de hidroxapatita de cerámica (Bio-Rad Laboratories, Inc.,
5 columna de Hidroxapatita Tipo 1 Bio-Scale CHT) equilibrada con una solución amortiguadora de NaPi 5 mM/MES 50 mM/NaCl 30 mM (pH 7.0). Las fracciones que contienen el anticuerpo se recolectaron por elución de gradiente de concentración lineal con cloruro de sodio. Las soluciones amortiguadoras de las
10 fracciones se reemplazaron con HBSor (histidina 25 mM/5% de sorbitol, pH 6.0) por diálisis (Thermo Fisher Scientific Inc., Casete de Diálisis Slide-A-Lyzer). La solución se concentró en una concentración de IgG de 5 mg/mL o más alta usando un Dispositivo de Filtración UF de Centrífuga VIVASPIN
15 20 (corte de peso molecular: UF10K, Sartorius Japón K.K., 4°C). Finalmente, la solución de anticuerpo se filtró a través de un filtro Minisart-Plus (Sartorius Japón K.K.) y se usó como una muestra purificada.

Ejemplo 13. Preparación de los vectores de expresión
20 2C1.1 y 5H3.1 de anticuerpo anti-Orai1 humano

Los anticuerpos 2C1.1 y 5H3.1 se prepararon sobre la base de las secuencias de aminoácidos de las cadenas ligeras y pesadas descritas en W02011063277A1.

13)-1 Construcción del vector de expresión de cadena
25 pesada tipo IgG2 quimerizado y humanizada pCMA-G2

Un fragmento de ADN obtenido por la digestión de pCMA-LK con XbaI y PmeI para remover la secuencia que codifica una señal de secreción de cadena κ y una región constante de cadena κ humana se ligó con un fragmento de ADN (mostrado en

5 SEQ ID NO: 71 del Listado de Secuencias) que comprende una secuencia que codifica una señal de secreción de cadena pesada humana y aminoácidos de una región constante IgG2 humana usando el kit de clonación de PCR In-Fusion Advantage para construir un vector de expresión de cadena pesada tipo

10 IgG2 quimérico y humanizado pCMA-G2 que tiene una secuencia señal, un sitio de clonación, y la secuencia de codificación de región constante de cadena pesada IgG2 humana cadena abajo de un promotor CMV.

13)-2 Construcción del vector de expresión de cadena

15 pesada de anticuerpo 2C1.1

Un fragmento de ADN que comprende la secuencia de codificación de región variable de cadena pesada de anticuerpo 2C1.1 mostrada en las posiciones de nucleótidos 36 a 434 en la secuencia de nucleótidos de codificación de

20 cadena pesada de anticuerpo 2C1.1 representada por SEQ ID NO: 72 del Listado de Secuencias se sintetizó (GeneArt Artificial Gene Synthesis service). El fragmento de ADN que comprende la secuencia de codificación de región variable de cadena pesada de anticuerpo 2C1.1 se amplificó con el fragmento de ADN

25 sintetizado como una plantilla usando KOD -Plus- y se insertó

en el sitio correspondiente del vector de expresión de cadena pesadas de tipo IgG2 de anticuerpo quimérico y humanizado pCMA-G2 escindido con una enzima de restricción BlnI usando un kit de clonación In-Fusion HD PCR para construir un vector
5 de expresión de cadena pesada de anticuerpo 2C1.1. El vector de expresión obtenido se designó como "pCMA-G2/2C1.1".

La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de anticuerpo 2C1.1 se muestra en SEQ ID NO: 73 del Listado de Secuencias.

10 13)-3 Construcción del vector de expresión de cadena ligera de anticuerpo 2C1.1

Un fragmento de ADN que comprende las secuencias de codificación (cadena λ) de región variable de región constante de cadena ligera de anticuerpo 2C1.1 mostradas en
15 las posiciones de nucleótidos 38 a 739 en la secuencia de nucleótidos de codificación de cadena ligera de anticuerpo 2C1.1 representada por SEQ ID NO: 74 del Listado de Secuencias se sintetizó (GeneArt Artificial Gene Synthesis service). El fragmento de ADN que comprende la región
20 variable de cadena ligera de anticuerpo 2C1.1 y las secuencias de codificación de región constante se amplificó con el fragmento de ADN sintetizado como una plantilla usando KOD -Plus- y se insertó en el sitio correspondiente del vector de expresión de cadena ligera de anticuerpo quimérico
25 y humanizado pCMA-LK escindido con las enzimas de restricción

BsiWI y PmeI usando un kit de clonación In-Fusion HD PCR para construir un vector de expresión de cadena ligera de anticuerpo 2C1.1. El vector de expresión obtenido se designó como "pCMA-L/2C1.1".

5 La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de anticuerpo 2C1.1 se muestra en SEQ ID NO: 75 del Listado de Secuencias.

13)-4 Construcción del vector de expresión de cadena pesada de anticuerpo 5H3.1

10 Un fragmento de ADN que comprende la secuencia de codificación de región variable de cadena pesada de anticuerpo 5H3.1 mostrada en las posiciones de nucleótidos 36 a 434 en la secuencia de nucleótidos de codificación de cadena pesadas de anticuerpo 5H3.1 representada por SEQ ID
15 NO: 76 del Listado de Secuencias se sintetizó (GeneArt Artificial Gene Synthesis service). Un vector de expresión de cadena pesada de anticuerpo 5H3.1 se construyó por el mismo método como en el Ejemplo 13)-2. El vector de expresión obtenido se designó como "pCMA-G2/5H3.1".

20 La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de anticuerpo 5H3.1 se muestra en SEQ ID NO: 77 del Listado de Secuencias.

13)-5 Construcción del vector de expresión de cadena ligera de anticuerpo 5H3.1

25 Un fragmento de ADN que comprende la región variable de

cadena ligera de anticuerpo 5H3.1 y las secuencias de codificación de región constante mostradas en las posiciones de nucleótidos 38 a 742 en la secuencia de nucleótidos de codificación de cadena ligera de anticuerpo 5H3.1 representada por SEQ ID NO: 78 del Listado de Secuencias se sintetizó (GeneArt Artificial Gene Synthesis service). Un vector de expresión de cadena ligera de anticuerpo 5H3.1 se construyó por el mismo método como en el Ejemplo 13)-3. El vector de expresión obtenido se designó como "pCMA-L/5H3.1".

La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de anticuerpo 5H3.1 se muestra en SEQ ID NO: 79 del Listado de Secuencias.

13)-6 Preparación de los anticuerpos 2C1.1 y 5H3.1

13)-6-1 Producción de los anticuerpos 2C1.1 y 5H3.1

Cada anticuerpo se produjo por el mismo método como en el Ejemplo 12)-3-1. El anticuerpo 2C1.1 se produjo por la combinación de pCMA-G2/2C1.1 y pCMA-L/2C1.1, y el anticuerpo 5H3.1 se produjo por la combinación de pCMA-G2/5H3.1 y pCMA-L/5H3.1.

13)-6-2 Purificación en dos pasos de los anticuerpos 2C1.1 y 5H3.1

Cada anticuerpo se purificó en dos pasos por el mismo método como en el Ejemplo 12)-3-2 del sobrenadante de cultivo producido en el Ejemplo 13)-6-1.

Ejemplo 14. Preparación de anticuerpos anti-Orai1 10F8,

14F74, y 17F6

Los anticuerpos 10F8, 14F74, y 17F6 se prepararon sobre la base de las secuencias de aminoácidos de las cadenas ligeras y pesadas descritas en W02013091903A1.

5 14)-1 Construcción del vector de expresión de cadena pesada de anticuerpo 10F8

Un fragmento de ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de codificación de cadena pesada de anticuerpo 10F8 representada por SEQ ID NO: 80 del Listado de Secuencias
10 se sintetizó (GeneArt Artificial Gene Synthesis service). El fragmento de ADN que comprende la secuencia de codificación de cadena pesada de anticuerpo 10F8 se amplificó con el fragmento de ADN sintetizado como una plantilla usando KOD - Plus- y se insertó en el sitio del cual la secuencia que
15 codifica una señal de secreción de cadena κ y una región constante de cadena κ humana se removió por la digestión del vector de expresión de cadena ligera de anticuerpo quimérico y humanizado pCMA-LK con enzimas de restricción XbaI y PmeI, usando un kit de clonación In-Fusion HD PCR para construir un
20 vector de expresión de cadena pesada de anticuerpo 10F8. El vector de expresión obtenido se designó como "pCMA/10F8H".

La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de anticuerpo 10F8 se muestra en SEQ ID NO: 81 del Listado de Secuencias.

25 14)-2 Construcción del vector de expresión de cadena

ligera de anticuerpo 10F8

Un fragmento de ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de codificación de cadena ligera de anticuerpo 10F8 representado por SEQ ID NO: 82 del Listado de Secuencias se sintetizó (GeneArt Strings DNA Fragments). El fragmento de ADN sintetizado insertado en el sitio del cual la secuencia que codifica una señal de secreción de cadena κ y una región constante de cadena κ humana se removió por la digestión del vector de expresión de cadena ligera de anticuerpo quimérico y humanizado pCMA-LK con las enzimas de restricción XbaI y PmeI, usando un kit de clonación In-Fusion HD PCR para construir un vector de expresión de cadena ligera de anticuerpo 10F8. El vector de expresión obtenido se designó como "pCMA/10F8L".

La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de anticuerpo 10F8 se muestra en SEQ ID NO: 83 del Listado de Secuencias.

14)-3 Construcción del vector de expresión de cadena pesada de anticuerpo 14F74

Un fragmento de ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de codificación de cadena pesada de anticuerpo 14F74 representado por SEQ ID NO: 84 del Listado de Secuencias se sintetizó (GeneArt Artificial Gene Synthesis service). Un vector de expresión de cadena pesada de anticuerpo 14F74 se construyó por el mismo método como en el

Ejemplo 14)-1. El vector de expresión obtenido se designó como "pCMA/14F74H".

La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de anticuerpo 14F74 se muestra en SEQ ID NO: 85 del Listado de
5 Secuencias.

14)-4 Construcción del vector de expresión de cadena ligera de anticuerpo 14F74

Un fragmento de ADN que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera del anticuerpo
10 14F74 representada por SEQ ID NO: 86 del Listado de Secuencias se sintetizó (GeneArt Strings DNA Fragments). El vector de expresión de cadena ligera de anticuerpo 14F74 se construyó por el mismo método como en el Ejemplo 14)-2. El vector de expresión obtenido se designó como "pCMA/14F74L".

15 La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de anticuerpo 14F74 se muestra en SEQ ID NO: 87 del Listado de Secuencias.

14)-5 Construcción vector de expresión de cadena pesada de anticuerpo 17F6

20 Un fragmento de ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de codificación de cadena pesada de anticuerpo 17F6 representada por SEQ ID NO: 88 del Listado de Secuencias se sintetizó (GeneArt Artificial Gene Synthesis service). Un vector de expresión de cadena pesada de anticuerpo 17F6 se
25 construyó por el mismo método como en el Ejemplo 14)-1. El

vector de expresión obtenido se designó como "pCMA/17F6H".

La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de anticuerpo 17F6 se muestra en SEQ ID NO: 89 del Listado de Secuencias.

5 14)-6 Construcción vector de expresión de cadena ligera de anticuerpo 17F6

Un fragmento de ADN que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera de anticuerpo 17F6 representada por SEQ ID NO: 90 del Listado de Secuencias se
10 sintetizó (GeneArt Strings DNA Fragments). Un vector de expresión de cadena ligera de anticuerpo 17F6 se construyó por el mismo método como en el Ejemplo 14)-2. El vector de expresión obtenido se designó como "pCMA/17F6L".

La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de
15 anticuerpo 17F6 se muestra en SEQ ID NO: 91 del Listado de Secuencias.

14)-7 Preparación de los anticuerpo 10F8, 14F74, y 17F6

14)-7-1 Producción de los anticuerpos 10F8, 14F74, y
17F6

20 Cada anticuerpo se produjo por el mismo método como en el Ejemplo 12)-3-1. El anticuerpo 10F8 se produjo por la combinación de pCMA/10F8H y pCMA/10F8L. El anticuerpo 14F74 se produjo por la combinación de pCMA/14F74H y pCMA/14F74L. El anticuerpo 17F6 se produjo por la combinación de
25 pCMA/17F6H y pCMA/17F6L.

14)-7-2 Purificación en dos pasos de anticuerpos 10F8, 14F74, y 17F6

Cada anticuerpo se purificó en dos pasos por el mismo método como en el Ejemplo 12)-3-2 del sobrenadante de cultivo
5 obtenido en el Ejemplo 14)-7-1.

Ejemplo 15. Comparación de la actividad *in vitro* de la forma modificada con la actividad efectora reducida del anticuerpo de maduración por afinidad con otros anticuerpos anti-Orai1 humano

10 15)-1 Actividad de ligación a antígeno del anticuerpo anti-Orai1 humano por citometría de flujo

Una suspensión celular de células HEK293T transfectadas por el método mostrado en 1)-4-2 con cada vector de expresión Orai1 humano construido en 1)-1-1 se centrifugó para remover
15 un sobrenadante. Después, las células HEK293T transfectadas con pcADN3.1-hOrai1 o las células HEK293T transfectadas con pcADN3.1-DEST se suspendieron por la adición de hR198_HG1/LG1 o hR198_HG1/LG1-LALA preparados en 12)-3, 2C1.1 o 5H3.1 preparados en 13)-6, 10F8, 14F74, o 17F6 preparados en 14)-7,
20 o un anticuerpo de control IgG humano o un anticuerpo de control IgG de ratón como un control, y se incubaron a 4°C durante 30 minutos. Las células se lavaron dos veces con PBS que contiene 5% de FBS, después se suspendieron por la adición del conjugado Anti-IgG FITC humano diluido 100 veces
25 con PBS que contiene 5% de FBS para los anticuerpos humanos o

el conjugado Anti-IgG FITC de ratón (Cappel Laboratories, Inc.) para los anticuerpos de ratón, y se incubaron a 4°C durante 30 minutos. Las células se lavaron dos veces con PBS que contiene 5% de FBS y después se volvieron a suspender en
5 PBS que contiene 5% de FBS y 1 µg/mL de yoduro de propidio, seguido por detección usando un citómetro de flujo (FC500). Los datos se usaron analizando Flowjo. Después de la exclusión de las células muertas positivas de yoduro de propidio por acumulación, la intensidad de fluorescencia FITC
10 de las células vivas se graficó como un histograma para calcular la intensidad de fluorescencia media (MFI). hR198_HG1/LG1, hR198_HG1-LALA/LG1, 2C1.1, 5H3.1, 10F8, 14F74, y 17F6 no se ligaron a las células HEK293T transfectadas con pcADN3.1-DEST y, como se muestra en la Figura 10 (anticuerpos
15 humanos) y la Figura 11 (anticuerpos de ratón), cada uno se ligó a las células HEK293T transfectadas con pcADN3.1-hOrai1, mostrando que todos estos anticuerpos se ligan específicamente al Orai1 humano. Por otra parte, no se observó esta ligación en el anticuerpo de control IgG de
20 ratón.

15)-2 Efecto inhibidor de la activación de la línea de células T humanas del anticuerpo anti-Orai1 humano

Células Jurkat de línea de células T humanas se prepararon en una concentración de 1.5×10^6 células/mL en
25 RPMI1640 (que contiene 10% de FBS, 100 U/mL de penicilina, y

100 µg/mL de estreptomicina), inoculadas en 80 µL/pocillo en una placa de cultivo celular de 96 pocillos, y se pre-trataron con hR198_HG1/LG1, hR198_HG1-LALA/LG1, 2C1.1, 5H3.1, 10F8, 14F74, o 17F6 se agregaron a 10 µL/pocillo a 37°C

5 durante 60 minutos bajo condiciones de CO₂ al 5%. Después, 100 ng/mL de PMA y 1 µg/mL de A23187 se agregaron a 10 µL/pocillo (concentración final: 10 ng/mL de PMA y 100 ng/mL de A23187) y se agitó bien, seguido por cultivo a 37°C durante d aproximadamente 16 horas bajo condiciones de CO₂ al

10 5%. La placa se agitó bien y después se centrifugó a 600 g durante 3 minutos. La concentración de IL-2 contenida en el sobrenadante se midió por el ELISA. La Figura 12 muestra que los anticuerpos anti-Orai1 humanos inhiben cada uno, en una manera dependiente de concentración, la liberación de IL-2 de

15 las células Jurkat tratadas con PMA y A23187. La Figura 13 muestra las concentraciones inhibitoras máximas medias (IC₅₀) y el 80% de concentraciones inhibitoras (IC₈₀) de hR198_HG1/LG1, hR198_HG1-LALA/LG1, 2C1.1, 5H3.1, 10F8, 14F74, y 17F6 con la concentración de IL-2 en ausencia del

20 anticuerpo definido como 100%. La IC₅₀ de los anticuerpos de las técnicas anteriores fue 80 ng/mL o más alta, mientras que la IC₅₀ de los anticuerpos típicos de la presente invención fue 10 ng/mL o más baja. La IC₈₀ de los anticuerpos de las técnicas anteriores fue 60000 ng/mL o más alta, mientras que

25 la IC₈₀ de los anticuerpos típicos de la presente invención

fue 200 ng/mL o más baja.

15) -3 Efectos inhibidores de la activación de células mononucleares de sangre periférica humanas de la forma modificada con actividad efectora reducida del anticuerpo de maduración por afinidad y otros anticuerpos anti-Orai1 humanos

Células mononucleares de sangre periférica humanas (PBMC) se adquirieron como un producto congelado de Cellular Technology Ltd., y se usaron después de ser descongeladas de acuerdo con el manual de instrucciones. Las PBMC reparadas en una concentración de 2.0×10^6 células/mL en RPMI1640 que contiene 10% de FBS, 100 U/mL de penicilina, y 100 µg/mL de estreptomicina se inoculó a 80 µL/pocillo en una placa de cultivo de cultivo celular de 96 pocillos, y se pre-trató con cada anticuerpo anti-Orai1 humano agregado en 10 µL/pocillo durante 60 minutos en una incubadora a 37°C. Después, 100 ng/mL de PMA y 1 µg/mL de A23187 se agregaron en 10 µL/pocillo y se agitaron bien, seguido por cultivo a 37°C durante aproximadamente 16 horas bajo condiciones de CO₂ al 5%. La placa se agitó bien y después se centrifugó a 600 g durante 3 minutos. La concentración de IL-2 y la concentración de interferón gamma (IFN-γ) (Mabtech AB) contenido en el sobrenadante se midió por el ELISA. La Figura 51 muestra que los anticuerpos anti-Orai1 humano inhiben cada uno, en una manera dependiente de concentración, la

liberación de IL-2 de las PBMC humanas tratadas con PMA y A23187. La Figura 52 muestra las concentraciones inhibitoras máximas medias (IC_{50}) y el 80% de concentraciones inhibitoras (IC_{80}) de hR198_HG1/LG1, hR198_HG1-LALA/LG1, 2C1.1, 5H3.1, 10F8, 14F74, y 17F6 con la concentración de IL-2 en ausencia del anticuerpo definido como 100%. La IC_{50} de los anticuerpos de las técnicas anteriores fue 100 ng/mL o más alta, mientras que la IC_{50} de los anticuerpos típicos de la presente invención fue 20 ng/mL o más baja. La IC_{80} de los anticuerpos de la técnica anteriores fue 17000 ng/mL o más alta, mientras que la IC_{80} de los anticuerpos típicos de la presente invención fue 400 ng/mL o más baja. La Figura 53 muestra que los anticuerpos anti-Orai1 humanos inhiben cada uno, en una manera dependiente de concentración, la liberación de IFN- γ de las PBMC humanas tratadas con PMA y A23187. La Figura 54 muestra las concentraciones inhibitoras máximas medias (IC_{50}) y el 80% de concentraciones inhibitoras (IC_{80}) de hR198_HG1/LG1, hR198_HG1-LALA/LG1, 2C1.1, 5H3.1, 10F8, 14F74, y 17F6 con la concentración de IFN- γ en ausencia del anticuerpo definido como 100%. La IC_{50} de los anticuerpos de las técnicas anteriores fue 800 ng/mL o más alta, mientras que la IC_{50} de los anticuerpos típicos de la presente invención fue 40 ng/mL o más baja. La IC_{80} de los anticuerpos de las técnicas anteriores fue 300000 ng/mL o más alta, mientras que la IC_{80} de los anticuerpos típicos de la presente

invención fue 2000 ng/mL o más baja.

Ejemplo 16. Actividad *in vivo* de hR198_HG1/LG1

16)-1 Efecto de la administración de hR198_HG1/LG1 en el modelo de enfermedad de injerto versus hospedero de ratón trasplantados con PBMC humanas

Se sabe que la reacción similar a la enfermedad de injerto versus hospedero humana puede ser inducida por el trasplante de las PBMC humanas a ratones NSG (NOD.Cg-*Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ*), que son ratones inmunodeficientes combinados graves (Clinical and Experimental Immunology, 157: 104-118 (2009)). 17 ratones NSG machos de seis semanas de edad adquiridos de Charles River Laboratories Japón, Inc. Se irradiaron con rayos X de 2.0 Gy (aparato de irradiación de rayos X Hitachi MBR-1520R-4). Después, los ratones se dividieron en un grupo que implica dos ratones y 3 grupos que implican cada uno 5 ratones. El hR198_HG1/LG1 preparado en 3 mg/mL y 6 mg/mL con HBSor (25 mM histidina/5% sorbitol, pH 6.0) se administró intravenosamente en 10 mL/kg, es decir, 30 mg/kg y 60 mg/kg, las colas de los ratones de 2 grupos (n = 5). Solo el HBSor se administró a un grupo adicional (n = 5) como un grupo de vehículo. Al siguiente día, las PBMC humanas congeladas (Cellular Technology Ltd.) se descongelaron usando el antiagregado CTL (Cellular Technology Ltd.) de acuerdo con el protocolo, y 3,000,000 de células PBMC humanas se suspendieron en 200 µL de PBS y se trasplantaron a ratones de

los 3 grupos ($n = 5$), mientras que las PBMC humanas no se trasplantaron al grupo 1 ($n = 2$), que se observó a través del tiempo como un grupo de control irradiado por rayos X. 0, 7, 14, y 21 días después de la irradiación de rayos X, 5 hr198_HG1/LG1 o HBSor se administraron en la misma dosis como en lo anterior a los grupos de administración. El peso corporal de cada ratón se midió en los días 0, 1, 4, 7, 9, 10, 11, y 13, y subsecuentemente cada día. El cambio en el peso corporal se calculó en términos de porcentaje con el 10 peso corporal en el día 0 definido como 100%. El cambio en el peso corporal promedio de cada grupo se muestra en la Figura 55. La disminución en el peso corporal promedio del grupo de administración de vehículo comenzó a ser observado de aproximadamente el día 16. El experimento se terminó en el 15 día 21 cuando el peso corporal promedio del grupo de administración de vehículo descendió abajo de 80%. En este punto en el tiempo, el grupo de control irradiado con rayos X que no recibió PBMC humanas no mostró pérdida de peso. Los ratones administrados con hr198_HG1/LG1 a 30 mg/kg y 60 mg/kg 20 no perdieron sus pesos corporales, y el peso corporal promedio fue equivalente a aquel de los ratones no trasplantados con PBMC humanas. hr198_HG1/LG1 (anticuerpo anti-Orai1) que suprimió notablemente los síntomas de la enfermedad de injerto versus hospedero provocada por la 25 activación de las PBMC humanas en este sistema se espera que

tenga un efecto terapéutico y/o profiláctico en la enfermedad de injerto versus hospedero humana.

16)-2 Evaluación de la actividad *in vivo* de hR198_HG1/LG1 usando un ratón inactivado de Orai1 humano

5 16)-2-1 Preparación del ratón inactivado de Orai1 humano

Ratones inactivados de Orai1 humano en los cuales la secuencia de aminoácidos del dominio de bucle extracelular del Orai1 de ratón se reemplazó con una secuencia Orai1 humana se prepararon por Institute of Immunology Co., Ltd. de acuerdo con un método estándar de preparación de ratón genéticamente modificado. En resumen, un vector a diana inactivo del gen Orai1 humano se construyó al reemplazar la secuencia de ADN de una región de codificación de clon BAC que comprende el sitio del gen Orai1 de ratón con el sitio del gen Orai1 humano mientras que se introduce el mismo un gen de resistencia da la neomicina flanqueado por las secuencias loxP. Las células ES de ratón se transfectaron con este vector de orientación a diana para establecer una línea resistente G418. Una línea de células ES que tiene el sitio del gen diana específicamente recombinado se clasificó por hibridación de Southern. El marcador de selección se removió por transfección con un vector de expresión Cre, y la línea de células ES resultante se utilizó para preparar los ratones F1 quiméricos. La genotipificación se llevó a cabo por hibridación de Southern para seleccionar los individuos

10
15
20
25

mutantes heterocigotos de entre los ratones F1. Los individuos mutantes heterocigotos F1 seleccionados se aparearon para preparar los ratones inactivados de *Orai1* humano como mutante homocigotos F2.

5 16)-2-2 Efecto supresor de la reacción de anafilaxis cutánea pasiva (PCA) de hR198_HG1/LG1

La reacción de PCA de ratón se llevó a cabo de acuerdo con un método estándar. Ratones inactivados de *Orai1* humanos de ocho semanas de edad producidos por Institute of
10 Immunology Co., Ltd., o ratones de una camada de tipo silvestre se retuvieron en los posicionadores. Después, hR198_HG1/LG1 preparado en 6 mg/mL con HBSor se administró intravenosamente en 10 mL/kg, es decir, 60 mg/kg, a las colas de los ratones. Solo el HBSor se administró a un grupo de
15 vehículo. Al siguiente día, 10 µL de anti-OVA IgE de orientación (Chondrex, Inc.) ajustado a 10 µg/mL con solución salina fisiológica se administró intracutáneamente a la aurícula de cada ratón bajo anestesia de inhalación con isofluorano (Pfizer Japón Inc.). Después de 24 horas, la
20 solución salina fisiológica que contiene 2 mg/mL de OVA (Albúmina de clara de huevo de pollo, Sigma-Aldrich Corp.) y 20 mg/mL de Evans blue (Merck KGaA) se administró intravenosamente en 5 mg/kg de OVA y 100 mg/kg de Evans blue a la cola. Después de 30 minutos, cada ratón se sacrificó
25 mediante flebotomía bajo anestesia profunda con isofluorano,

y su aurícula se escindió y se sumergió en 0.5 mL de DMSO, seguido por la extracción de Evans blue (37°C, 72 horas). La solución de DMSO que contiene el Evans blue extraído se transfirió a 200 µL/pocillo a una microplaca de 96 pocillos, y 650 nm O.D. Se midieron usando un lector de microplacas (Molecular Devices Corp., SpectraMax M5e). La absorbancia del Evans blue extravasado se determinó de acuerdo con un método de cálculo proporcionado a continuación y se indicó con el valor promedio del grupo de administración de vehículo definido como 100%. La absorbancia de una solución de DMSO se determinó como un blanco. $\% = (\text{muestra OD}_{650} - \text{blanco OD}_{650}) / (\text{vehículo OD}_{650} - \text{blanco OD}_{650})$. La Figura 56 muestra que el hR198_HG1/LG1 suprime la reacción de PCA inducida en ratones inactivados de Orai1 humano. La reacción de PCA de ratones es un sistema modelo básico de anafilaxis de reproducción de alergia de tipo inmediato, que es la reacción alérgica tipo I en humanos, y este sistema es conocido por ser utilizable en la evaluación de fármacos antialérgicos (Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie, 165: 92-102 (1967); and International archives of allergy and applied immunology, 78: 113-117 (1985)). El hR198_HG1/LG1 (anticuerpo anti-Orai1), confirmado en este sistema tiene actividad inhibidora contra la desgranulación de mastocitos dependientes de IgE, se espera que tenga un efecto terapéutico y/o profiláctico en el asma bronquial, rinitis

alérgica, y dermatitis atópica encontrada en los inhibidores de desgranulación de mastocitos existentes, y enfermedades alérgicas tipo 1 similares en humanos, por ejemplo, asma alérgico.

5 16)-2-3 Efecto supresor de la reacción de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) de hR198_HG1/LG1

La reacción DTH de ratón se llevó a cabo de acuerdo con un método estándar. Ratones inactivados de Orai1 humano de ocho semanas de edad producidos por Institute of Immunology
10 Co., Ltd., o ratones de camada de tipo silvestre se retuvieron en los posicionadores. Después, el hR198_HG1/LG1 preparado en 6 mg/mL con HBSor se administró intravenosamente en 10 mL/kg, es decir, 60 mg/kg, a las colas de los ratones. Solo el HBSor se administró a un grupo de vehículo. Al
15 siguiente día, 50 µL de una emulsión preparada al mezclar mBSA (Albúmina Bovino Metilada, Sigma-Aldrich Corp.) diluida en 5 mg/mL con solución salina fisiológica y un adyuvante completo de Freund (Difco Laboratories) en cantidades iguales se administró subcutáneamente a cada una de ambas axilas de
20 cada ratón para inmunización. Después de 6 días, el hR198_HG1/LG1 se administró intravenosamente nuevamente a 60 mg/kg a la cola. Al siguiente día, el mBSA preparado en 0.5 mg/mL con solución salina fisiológica, y solución salina fisiológica se administraron cada una intracutáneamente a la
25 pata inferior bajo anestesia de inhalación con isofluorano.

6, 24, y 48 horas después de la administración, el hinchamiento en la pata se midió usando un indicador de carátula. El cambio dependiente de tiempo en el espesor del hinchamiento en la pata se calculó con el hinchamiento en 0 horas a 0 (10^{-2} mm) y se determinó con el valor promedio del grupo de administración de vehículo definido como 100%. Las Figuras 57A-57C muestran que el hR198_HG1/LG1 suprimió la reacción de DTH inducida en los ratones inactivados de Orai1 huaño en cada punto en el tiempo de 6 horas (fig. 57A), 24 horas (fig. 57B), y 48 horas (fig. 57C) después de la administración del antígeno. La reacción de DTH de ratón es un sistema para observar el establecimiento y respuesta de la inmunización dependiente de células T y es bien sabido que un fármaco que muestra actividad en este sistema se desarrolló como un inmunosupresor potente (Clinical and Experimental Immunology, 52: 599-606 (1983)). El hR198_HG1/LG1 (anticuerpo anti-Orai1), confirmado en este sistema tiene actividad supresora contra la inmunización de células T, se espera que tenga efecto terapéutico y/o profiláctico en las respuestas del cuerpo o enfermedades provocadas por la actividad de células T en humanos, por ejemplo, rechazos de trasplantes, enfermedades inmunológicas y enfermedades inflamatorias.

16)-2-4 Estudio en la actividad supresora del anticuerpo anti-Orai1 contra dermatitis

La dermatitis se induce por cualquiera de los siguientes

métodos: 0.5 mL de una solución de antígeno de albúmina se administra intraperitonealmente a un ratón, y después de 2 semanas, la misma cantidad como en la anterior del antígeno se inyecta al mismo como un refuerzo. Después, la solución de antígeno de albúmina se aplica repetitivamente a la oreja (20 μ L) o el lomo (100 μ L) 3 a 6 veces en intervalos de 3 días a 2 semanas. Alternativamente, una crema de antígeno de ácaros se aplica repetitivamente a la oreja (20 μ L) o el lomo (100 μ L) 3 a 6 veces en intervalos de 3 días a 2 semanas. Se prepara un cloruro de picrilo de hapteno o dinitrofluorobenceno de acuerdo con el protocolo y se aplica a la oreja (20 μ L) o el lomo (100 μ L) una vez o dos veces a la semana durante 8 semanas a lo máximo. Alternativamente, la sustancia que induce la reacción cutánea histamina, Compuesto 40/80, éster de 5- (y 6-)carboxifluoresceín-diacetato succinimidilo, isotiocianato de fluoresceína, o péptido similar a bombesina se administra a la oreja (20 μ L), el lomo (100 μ L), o la médula espinal (5 μ L). El anticuerpo anti-Orai1 se administra intravenosa o subcutáneamente un día antes de la inducción de la dermatitis o 1 hora a 4 horas antes de la inducción de la dermatitis. Después, la frecuencia de la administración se ajusta en intervalos de día 7 al día 28 para continuar la administración del anticuerpo. Después de la inducción de la dermatitis, la medición del espesor de la aurícula usando un indicador de

carátula de espesor o la clasificación macroscópica de dermatitis se lleva a cabo a través del tiempo. Después de la terminación del período de prueba, la cuantificación de las concentraciones del anticuerpo, citocinas, o biomarcadores en suero en sangre o tejidos, la examinación de la actividad de crecimiento, capacidad de producción de citocinas, antígenos superficiales, o similares de las células obtenidas de la piel, sangre periférica, el timo, el bazo, los nodos linfáticos, o la médula ósea, análisis histopatológico, etc., se llevan a cabo para determinar la actividad supresora del anticuerpo anti-Orai1 contra la dermatitis.

16)-2-5 Estudio en la actividad supresora del anticuerpo anti-Orai1 contra la psoriasis

En el caso de usar imiquimod, la dermatitis psoriática se induce por aplicación a ambos lados o un lado de la aurícula (5 a 30 mg) y el lomo afeitado (50 a 100 mg). Alternativamente, la dermatitis se induce por la administración intraperitoneal de 200 μ L de 10 mg/mL de una suspensión de zimosan en una solución amortiguadora de fosfato. En caso de usar una citocina (IL-23, etc.) como una sustancia proflogística, la dermatitis psoriática se induce por la administración intercutánea de 20 a 50 μ L de una solución que contiene 0.1 a 2 μ g de citocinas a un lado de la aurícula de ratón bajo anestesia profunda con 1 a 5% de isofluorano. El anticuerpo anti-Orai1 se administra

intravenosa o subcutáneamente un día antes de la inducción de la dermatitis o 1 hora a 4 horas antes de la inducción de la dermatitis. Después, la frecuencia de la administración se ajusta en intervalos de 7 días a 28 días para continuar la
5 administración del anticuerpo. Después de la inducción de la dermatitis, la medición del espesor de la aurícula usando un indicador de carátula de espesor o la clasificación macroscópica de dermatitis se lleva a cabo a través del tiempo. Después de la terminación del período de prueba, la
10 examinación del peso de un sitio de inflamación, la actividad de mieloperoxidasa de neutrófilos infiltrados en el sitio, el análisis de citometría de flujo de las células infiltradas, el análisis de genes, medición de concentración de citocinas, etc., se llevan a cabo para determinar la actividad supresora
15 del anticuerpo anti-Orai1 contra la psoriasis.

16)-2-6 Estudio en la actividad supresora del anticuerpo anti-Orai1 contra esclerosis múltiple

La glicoproteína de oligodendrocitos de mielina o un antígeno de péptido de la misma se ajusta a 4 mg/mL con
20 solución salina fisiológica y se emulsiona mediante mezclado con un adyuvante completo de Freund ajustado a 8 mg/mL con solución salina fisiológica, en cantidades iguales. 200 µL de esta solución mezclada se administra intracutáneamente al flanco o región abdominal de un ratón. Inmediatamente
25 después, 100 µL de una solución de toxina de pertussis acuosa

de 2 $\mu\text{g/mL}$ se administra a este ratón en la vena de la cola. Después de 2 días, la solución de toxina de pertussis mencionada en lo anterior se administra adicionalmente nuevamente en la vena de la cola para inducir la

5 encefalomiелitis experimental. Después de 1 semana a 2 semanas en el experimento, la encefalomiелitis se desarrolla, y la parálisis se expande desde la cola hasta las patas inferiores y las extremidades anteriores. El grado de esta parálisis se registra al observar macroscópicamente el

10 movimiento de las extremidades y la cola. El anticuerpo anti-Orai1 se administra intravenosa o subcutáneamente un día antes de la inducción de la encefalomiелitis o 1 hora a 4 horas antes de la inducción de la encefalomiелitis. Después, la frecuencia de administración se ajusta en intervalos de 7

15 días a 28 días para continuar con la administración del anticuerpo. Se determina el efecto de la administración del anticuerpo anti-Orai1 en la esclerosis múltiple.

16)-2-7 Estudio en la actividad supresora del anticuerpo anti-Orai1 contra la artritis

20 100 μL de una emulsión obtenida al mezclar 2 mg/mL de colágeno tipo II de bovino y un adyuvante completo de Freund en una relación en volumen de 1:1.3 se administra intracutáneamente a la base de la cola de un ratón usando una jeringa de 1 mL y una aguja de tuberculina. Después de 2 a 3

25 semanas, el mismo tratamiento como en lo anterior se lleva a

cabo. Después, el hinchamiento articular en las extremidades se registra macroscópicamente o usando un indicador de carátula de espesor. En la terminación del período de prueba, las concentraciones del anticuerpo, citocinas, o biomarcadores en suero en la sangre o tejidos, la actividad de crecimiento, capacidad de producción de citocinas, o antígenos superficiales de las células obtenidas de la piel, la sangre periférica, el timo, el bazo, los nodos linfáticos, o la médula ósea, etc., son medidos. El anticuerpo anti-Orai1 se administra intravenosa o subcutáneamente un día antes de la inducción de la artritis o 1 hora a 4 horas antes de la inducción de la artritis. Después, la frecuencia de administración se ajusta en intervalos de 7 días a 28 días para continuar con la administración del anticuerpo. El efecto de la administración del anticuerpo anti-Orai1 o artritis se determina.

16)-2-8 Estudio en la actividad supresora del anticuerpo anti-Orai1 contra la colitis

Los linfocitos recolectados y purificados de los nodos linfáticos y el bazo de un ratón inactivado de Orai1 humano se aíslan con un clasificador de células usando un anticuerpo anti-CD4 GK1.5, un anticuerpo anti-CD25 PC61.5, y un anticuerpo anti-CD45R C363.16A (todos de eBioscience). Las células obtenidas por este método se confirman en un citómetro de flujo que son células T CD4+CD25-CD45RBhi que

tienen una pureza de 95% o más alta. Después, 500,000 células se trasplantan intraperitonealmente a un ratón Rag2-/- de 12 a 16 semanas de edad. Después, la medición del peso corporal y la observación de los síntomas tales como diarrea se llevan a cabo durante 12 semanas. Después de la terminación del período de observación, el grado de espesor del tracto intestinal, el número y tamaño de pólipos, y la presencia o ausencia de signos patológicos se examinan por autopsia. También, las concentraciones del anticuerpo, citocinas, o biomarcadores de suero en la sangre o tejido se cuantifican, y la actividad de crecimiento, capacidad de producción de citocinas, o antígenos superficiales, o similares de las células obtenidas del tracto intestinal, sangre periférica, el timo, el bazo, los nodos linfáticos, o la médula ósea se analizan. El anticuerpo anti-Orai1 se administra intravenosa o subcutáneamente un día antes del trasplante de células o 1 hora a 4 horas antes del trasplante de células. Después, la frecuencia de administración se ajusta en intervalos de 7 días a 28 días para continuar con la administración del anticuerpo. El efecto de la administración del anticuerpo anti-Orai1 en la colitis se determina.

16)-2-9 Estudio en el efecto del anticuerpo anti-Orai1 en el sistema de trasplante de células de médula ósea

El hueso del muslo y la espinilla se escinden de un ratón inactivado de Orai1 humano, y las células en la médula

ósea se extraen mediante la inyección de 1 a 5 mL de un medio RPMI1640 que contienen 10% de FBS de la epífisis usando una jeringa con una aguja. Después del tratamiento con un colador celular, las células de la médula ósea se recuperan por

5 centrifugación y se ajustan tal que 10,000,000 de células de médula ósea están contenidas en 200 μ L de una solución amortiguadora de inyección que contiene HEPES 10 mM, EDTA 0.5 mM, y 0.5% de penicilina/estreptomicina. Al mismo tiempo con el mismo, las células del bazo se recolectan del bazo de los

10 ratones inactivados de Orai1 humano de acuerdo con un método estándar. Un ratón BALB/c de 10 a 13 semanas de edad como un recipiente es irradiado con rayos X de 2.0 a 8.0 Gy. Después, 0 a 4,000,000 de células del bazo donador se agregan a 200 μ L de las células de la médula ósea donadoras, y esta solución

15 mezclada de células se inyecta a la vena de la cola del recipiente. Después, el cambio en el peso corporal y la tasa de supervivencia se examinan durante 4 a 16 semanas. En la terminación de la prueba, las concentraciones del anticuerpo, citocinas, o biomarcadores de suero en la sangre o tejidos

20 del ratón recipiente, y los antígenos superficiales, actividad de crecimiento, o capacidad de producción de citocinas de las células obtenidas del tracto intestinal, sangre periférica, el timo, el bazo, los nodos linfáticos, o la médula ósea se miden. El anticuerpo anti-Orai1 se

25 administra intravenosa o subcutáneamente al ratón recipiente

un día antes del trasplante de médula ósea o 1 hora a 4 horas antes del trasplante de médula ósea. Después, la frecuencia de la administración se ajusta en intervalos de 7 días a 28 días para continuar con la administración del anticuerpo. El efecto del anticuerpo anti-Orai1 en el injerto de las células trasplantadas o la incidencia de la enfermedad de injerto versus hospedero se determina.

Ejemplo 17. Comparación de las propiedades fisicoquímicas entre el anticuerpo madurado por afinidad y otros anticuerpos anti-Orai1 humanos

Medición de la viscosidad usando m-VROC

hR198_HG1/LG1 o hR198_H3/LG1 preparados en 10)-3, hR198_HG1-LALA/LG1 preparado en 12)-3, o 2C1.1 preparado en 13)-6 se concentraron a 150 mg/mL o más alto con VIVAPORE 5 (Sartorius Japón K.K.) y después se prepararon a 90, 120, y 150 mg/mL con HBSor. La viscosidad a 25°C se midió tres veces para cada concentración usando m-VROC (RheoSense, Inc.) para calcular una viscosidad promedio (mPa·s). Los resultados se muestran en la Figura 58 y Tabla 1. Las viscosidades de hR198_HG1/LG1, hR198_H3/LG1, y hR198_HG1-LALA/LG1 en todas las concentraciones fueron menores que la viscosidad de 2C1.1. Particularmente, en 150 mg/mL, las viscosidades de hR198_HG1/LG1, hR198_H3/LG1, y hR198_HG1-LALA/LG1 fueron 11.4, 10.0, y 10.8 mPa·s, respectivamente, mientras que la viscosidad de 2C1.1 fue 21.0 mPa·s, mostrando que los

anticuerpos madurados por afinidad tienen una viscosidad baja aún en una concentración alta, como son comprados con 2C1.1.

Tabla 1

5	Muestra	Concentración [mg/mL]	Viscosidad Promedio	Viscosidad Promedio
			[mPa· s]	[mPa· s]
	hR198_HG1/LG1	90	3.74	0.05
		120	6.11	0.02
		150	11.43	0.09
	hR198_H3/LG1	90	3.66	0.04
		120	5.78	0.07
		150	9.98	0.10
10	hR198_HG1-LALA/LG1	90	3.74	0.06
		120	5.68	0.20
		150	10.82	0.37
	2C1.1	90	4.05	0.02
		120	8.67	0.12
		150	20.96	0.08

Aplicabilidad Industrial

El anticuerpo anti-Orai1 humanizado de la presente invención tiene un efecto inhibidor de la actividad de células T más potente que aquella de los anticuerpos conocidos en la técnica, y puede servir como un agente terapéutico profiláctico para el rechazo de trasplantes, etc.

Texto Libre del Listado de Secuencias

- SEQ ID NO: 1: Secuencia de genes de Orai1 humano
- SEQ ID NO: 2: Secuencia de aminoácidos de Orai1 humano
- 20 SEQ ID NO: 3: cebador de PCR Nhe-polyC-S
- SEQ ID NO: 4: cebador de PCR rIg γ -AS1
- SEQ ID NO: 5: cebador de PCR rIg γ -AS2
- SEQ ID NO: 6: cebador de PCR Nhe-polyC-S
- SEQ ID NO: 7: cebador de PCR rIg κ -AS
- 25 SEQ ID NO: 8: Cebador de secuenciación rIg γ -seq

SEQ ID NO: 9: Cebador de secuenciación rIg κ -seq

SEQ ID NO: 10: Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera R118

SEQ ID NO: 11: Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera R118

5 SEQ ID NO: 12: Secuencia de nucleótidos que codifica la Cadena pesada R118

SEQ ID NO: 13: Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada R118

SEQ ID NO: 14: Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera R198

SEQ ID NO: 15: Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera R198

10 SEQ ID NO: 16: Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada R198

SEQ ID NO: 17: Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada R198

SEQ ID NO: 18: fragmento de ADN que comprende una secuencia que codifican una señal de secreción de cadena κ humana y una región
15 constante de cadena κ humana

SEQ ID NO: 19: cebador de PCR 3.3-F1

SEQ ID NO: 20: cebador de PCR 3.3-R1

SEQ ID NO: 21: Fragmento de ADN que comprende una secuencia que codifica una secuencia señal de cadena pesada humana y aminoácidos de
20 una región constante IgG1 humana

SEQ ID NO: 22: Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera cR118 quimerizada humana

SEQ ID NO: 23: Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera cR118 quimerizada humana

25 SEQ ID NO: 24: Secuencia de nucleótidos que codifica la

cadena ligera R198 quimerizada humana

SEQ ID NO: 25: Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera R198 quimerizada humana

5 SEQ ID NO: 26: Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada R118 quimerizada humana

SEQ ID NO: 27: Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada R118 quimerizada humana

SEQ ID NO: 28: Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada cR198 quimerizada humana quimerizada humana

10 SEQ ID NO: 29: Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada cR198 quimerizada humana

SEQ ID NO: 30: Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera tipo hR198_L1

15 SEQ ID NO: 31: Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera tipo hR198_L1

SEQ ID NO: 32: Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera tipo hR198_L2

SEQ ID NO: 33: Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera tipo hR198_L2

20 SEQ ID NO: 34: Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera tipo hR198_L3

SEQ ID NO: 35: Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera tipo hR198_L3

25 SEQ ID NO: 36: Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera de tipo hR198_L4

SEQ ID NO: 37: Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de tipo hR198_L4

SEQ ID NO: 38: Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada de tipo hR198_H1

5 SEQ ID NO: 39: Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo hR198_H1

SEQ ID NO: 40: Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada de tipo hR198_H2

10 SEQ ID NO: 41: Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de tipo hR198_H2

SEQ ID NO: 42: Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada tipo hR198_H3

SEQ ID NO: 43: Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada tipo hR198_H3

15 SEQ ID NO: 44: Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada tipo hR198_H4

SEQ ID NO: 45: Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada tipo hR198_H4

SEQ ID NO: 46: cebador de PCR Ora1 HF

20 SEQ ID NO: 47: cebador de PCR Ora1 CH FR

SEQ ID NO: 48: cebador de PCR M13 rev largo

SEQ ID NO: 49: cebador de PCR SecM de detención R

SEQ ID NO: 50: cebador de PCR Ora1 Lc F

SEQ ID NO: 51: cebador de PCR Ora1 CL-FR

25 SEQ ID NO: 52: cebador de PCR Ora1 HR-FLAG R

SEQ ID NO: 53: cebador de PCR Orail CL-FLAG R

SEQ ID NO: 54: cebador de PCR Myc-R

SEQ ID NO: 55: Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera tipo hR198_LG1

5 SEQ ID NO: 56: Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera tipo hR198_LG1

SEQ ID NO: 57: Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera tipo hR198_LG2

10 SEQ ID NO: 58: Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera tipo hR198_LG2

SEQ ID NO: 59: Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera tipo hR198_LG3

SEQ ID NO: 60: Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera tipo hR198_LG3

15 SEQ ID NO: 61: Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada tipo hR198_HG1

SEQ ID NO: 62: Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada tipo hR198_HG1

20 SEQ ID NO: 63: Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada tipo hR198_HG2

SEQ ID NO: 64: Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada tipo hR198_HG2

SEQ ID NO: 65: Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada tipo hR198_HG3

25 SEQ ID NO: 66: Secuencia de aminoácidos de la cadena

pesada tipo hR198_HG3

SEQ ID NO: 67: Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada tipo hR198_H4-LALA

5 SEQ ID NO: 68: Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada tipo hR198_H4-LALA

SEQ ID NO: 69: Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada tipo hR198_HG1-LALA

SEQ ID NO: 70: Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada tipo hR198_HG1-LALA

10 SEQ ID NO: 71: Fragmento de ADN que comprende una secuencia que codifica una señal de secreción de cadena pesada humana y aminoácidos de una región constante IgG2 humana

15 SEQ ID NO: 72: Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada de anticuerpo 2C1.1

SEQ ID NO: 73: Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de anticuerpo 2C1.1

SEQ ID NO: 74: Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera de anticuerpo 2C1.1

20 SEQ ID NO: 75: Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de anticuerpo 2C1.1

SEQ ID NO: 76: Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada de anticuerpo 5H3.1

25 SEQ ID NO: 77: Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de anticuerpo 5H3.1

SEQ ID NO: 78: Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera de anticuerpo 5H3.1

SEQ ID NO: 79: Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de anticuerpo 5H3.1

5 SEQ ID NO: 80: Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada de anticuerpo 10F8

SEQ ID NO: 81: La secuencia de aminoácido de la cadena pesada de anticuerpo 10F8

10 SEQ ID NO: 82: Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera de anticuerpo 10F8

SEQ ID NO: 83: Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de anticuerpo 10F8

SEQ ID NO: 84: Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada de anticuerpo 14F74

15 SEQ ID NO: 85: Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de anticuerpo 14F74

SEQ ID NO: 86: Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera de anticuerpo 14F74

20 SEQ ID NO: 87: Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de anticuerpo 14F74

SEQ ID NO: 88: Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada de anticuerpo 17F6

SEQ ID NO: 89: Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de anticuerpo 17F6

25 SEQ ID NO: 90: Secuencia de nucleótidos que codifica la

cadena ligera de anticuerpo 17F6

SEQ ID NO: 91: Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de anticuerpo 17F6

5 SEQ ID NO: 92: CDRL1 de rata (que se derivó de R198 y se usó para las cadenas ligeras de tipo hR198_L1 hR198_L4s)

SEQ ID NO: 93: CDRL1 modificada (que se usó para la cadena ligera tipo hR198_LG1)

SEQ ID NO: 94: CDRL1 modificada (que se usó para la cadena ligera tipo hR198_LG2)

10 SEQ ID NO: 95: CDRL1 modificada (que se usó para la cadena ligera tipo hR198_LG3)

SEQ ID NO: 96: CDRL2 de rata (que fue común para R118 y R198 y se usó para las cadenas ligeras de tipo hR198_L1 a hR198_L4 y hR198_LG1)

15 SEQ ID NO: 97: CDRL2 modificada (que se usó para la cadena ligera tipo hR198_LG2)

SEQ ID NO: 98: CDRL2 modificada (que se usó para la cadena ligera tipo hR198_LG3)

20 SEQ ID NO: 99: CDRL3 de rata (que se derivó de R118 y se usó para las cadenas ligeras tipo hR198_L3 hR198_L4s)

SEQ ID NO: 100: CDRL3 de rata (que se derivó de R198 y se usó para las cadenas ligeras tipo hR198_L1 y hR198_L2)

SEQ ID NO: 101: CDRL3 modificada (que se usó para las cadenas ligeras tipo hR198_LG1 a hR198_LG3)

25 SEQ ID NO: 102: CDRH1 de rata (que se derivó de R118 y

se usó para las cadenas pesadas tipo hR198_H3, hR198_H4, y hR198_HG1 a hR198_HG3)

SEQ ID NO: 103: CDRH1 de rata (que se derivó de R198 y se usó para las cadenas pesadas de tipo hR198_H1 y hR198_H2s)

5 SEQ ID NO: 104: CDRH2 de rata (que se derivó de R118 y se usó para las cadenas pesadas tipo hR198_H3 y hR198_H4)

SEQ ID NO: 105: CDRH2 de rata (que se derivó de R198 y se usó para las cadenas pesadas de tipo hR198_H1 y hR198_H2s)

10 SEQ ID NO: 106: CDRH2 modificada (que se usó para la cadena pesada de tipo hR198_HG1)

SEQ ID NO: 107: CDRH2 modificada (que se usó para la cadena pesada de tipo hR198_HG2)

SEQ ID NO: 108: CDRH2 modificada (que se usó para la cadena pesada de tipo hR198_HG3)

15 SEQ ID NO: 109: CDRH3 de rata (que fue común para R118 y R198 y se usó para la cadena pesada de tipo hR198_H1 a hR198_H4)

SEQ ID NO: 110: CDRH3 modificada (que se usó para las cadenas pesadas de tipo hR198_HG1 a hR198_HG3)

20 SEQ ID NO: 111: Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada de tipo hR198_H0

SEQ ID NO: 112: Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada tipo hR198_H0

25 SEQ ID NO: 113: Secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada tipo hR198_H5

SEQ ID NO: 114: Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada tipo hR198_H5

SEQ ID NO: 115: Secuencia de péptido der región bucle Orail humana PEGilada con Biotina

5 SEQ ID NO: 116: CDRL1 de rata (que se derivó de R118, pero no se usó para anticuerpos humanizados).

10

15

20

25