

ANTICUERPOS ANTI-VASA Y MÉTODOS DE PRODUCCIÓN Y USO DE LOS MISMOS

Esta solicitud reclama el beneficio de la prioridad de la Solicitud Provisional Estadounidense No. 62/051,130, presentada el 16 de septiembre de 2014, y la Solicitud Provisional Estadounidense No. 62/089,054, presentada el 8 de diciembre de 2014, cuyo contenido total se incorpora en la presente por referencia en su totalidad.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente divulgación se refiere generalmente a anticuerpos, su producción y uso. Específicamente, la presente divulgación se refiere a los anticuerpos que se unen específicamente a la proteína humana VASA, métodos de producción de estos anticuerpos y métodos de diagnósticos, terapéuticos y clínicos del uso de dichos anticuerpos.

ANTECEDENTES

La proteína VASA fue identificada en *Drosophila* como un componente del germoplasma que codifica una helicasa de ARN dependiente de ATP de la familia DEAD (Liang *et al.* (1994), *Development*, 120:1201-11; Lasko *et al.* (1988), *Nature* 335:611-17). La función molecular de VASA se dirige a ARNms de objetivo de enlace implicados en el establecimiento de la célula germinal, ovogénesis e inicio de la traslación (Gavis *et al.* (1996), *Development* 110:521-28). VASA se requiere para la formación células de polos y está exclusivamente restringida al linaje de células germinales a lo largo del desarrollo.

Los genes homólogos de Vasa han sido aislados en distintas especies animales, y VASA puede ser utilizado como un marcador molecular para el linaje de la célula germinal en la mayoría de las especies animales (Noce *et al.* (2001), *Cell Structure and Function* 26:131-36). Castrillon *et al.* (2000), *Proc. Natl. Acad. Sci. (EUA)* 97 (17): 958590-9590, por ejemplo, se demostró que el gen humano de Vasa se expresa en ovario y testículo pero es indetectable en tejidos somáticos.

La existencia de células madre de líneas germinales de mamíferos hembra, también conocidas como células madre oogoniales o células madre ováricas (OSCs) o células del precursor del huevo, en el tejido somático de ovarios mamíferos fue primero descrito en Johnson *et al.* (2004), *Nature*

428:145-50, y ahora se ha confirmado por otros grupos de investigación (*por ejemplo*, Zou *et al.* (2009), *Nature Cell Biology*, publicaco en línea DOI: 10.1038/ncb1869; Telfer y Albertini (2012), *Nature Medicine* 18(3):353-4). El uso potencial de OSCs para producir ovocitos para su uso en tecnologías de reproducción artificial (ART por sus siglas en inglés), incluyendo fertilización *in vitro* (FIV), o como fuentes de mitocondrias muy funcionales para la transferencia mitocondrial de ovocitos, así como el uso de OSCs para tratar varios síntomas de la menopausia, se han descrito en la literatura científica y de patente (*por ejemplo*, Tilly y Telfer (2009), *Mol. Hum. Repro.* 15(7):393-8; Zou *et al.* (2009), *supra*; Telfer y Albertini (2012), *supra*; White *et al.* (2012), *Nature Medicine* 18(3):413-21; WO 2005/121321; Patente estadounidense No. 7,955,846; patente estadounidense No. 8,652,840; WO2012/142500; patente estadounidense No. 8,642,329 y patente estadounidense No. 8,647,869).

Cuando los OSCs se caracterizaron primero por Johnson *et al.* (2004), *supra*, fue demostrado que las células expresaban la proteína VASA, y los anticuerpos contra la proteína VASA se han utilizado para aislar OSCs de homogenados de tejido ovárico (*p. ej.*, Zou *et al.* (2009), *supra*; White *et al.* (2012), *supra*). Además, White *et al.* (2012), *supra*, demostraron que los anticuerpos a un dominio N-terminal de VASA no podían utilizarse para aislar OSCs de expresión de VASA viables mientras que los anticuerpos a un dominio C-terminal podrían aislar con eficacia las células, sugiriendo que el dominio C-terminal, pero no el dominio N-terminal, era extracelular y por lo tanto accesible para los anticuerpos.

La producción de anticuerpos policlonales anti-VASA fue primero descrita en Castrillon *et al.* (2000), *supra*, y WO01/36445. Los anticuerpos policlonales dirigidos a la porción C-terminal de la proteína humana VASA están comercialmente disponibles de Abcam plc (Cambridge, Reino Unido; código de producto AB13840) y R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN; No. de catálogo AF2030), y un anticuerpo monoclonal dirigido contra la porción N-terminal de VASA humana también está comercialmente disponible de R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN; No. de catálogo AF2030).

Sigue existiendo, sin embargo, una necesidad para anticuerpos de alta afinidad dirigidos al dominio extracelular C-terminal de VASA para identificar (*por ejemplo*, por inmunohistoquímica o anticuerpos marcados) y aislar (*p. ej.*, por clasificación celular magnética o activada por fluorescencia) las células, incluyendo pero no limitado a OSCs, que expresan VASA.

BREVE DESCRIPCIÓN

Se divulgan anticuerpos anti-VASA (mAbs), particularmente mAbs humanizados que se unen específicamente a VASA con alta afinidad. Se proporcionan las secuencias de aminoácidos de los CDRs de cadenas ligeras y cadenas pesadas, así como secuencias de consenso para estos CDRs, de estos mAbs anti-VASA. La divulgación también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican los mAbs anti-VASA, vectores de expresión, células huésped, métodos para hacer los mAbs anti-VASA y métodos para expresar los mAbs anti-VASA. Finalmente, se divulgan métodos para usar los mAbs anti-VASA para aislar y/o purificar las células que expresan VASA.

Estos y otros aspectos y modalidades de la divulgación se ilustran y se describen a continuación. Otros sistemas, procesos y características serán evidentes para un experto en la materia al examinar los siguientes dibujos y descripción detallada. Se pretende que todos dichos sistemas adicionales, procesos y características se incluyan dentro de esta descripción, estén dentro del alcance de la presente invención y sean protegidos por las reivindicaciones que se adjuntan.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 proporciona la secuencia de aminoácidos de la isoforma de proteína VASA humana 1 de Adhesión de GenBank de NP_077726 (SEQ ID NO: 1).

La Figura 2 proporciona la secuencia de aminoácidos de la isoforma de proteína homóloga VASA de ratón 1 de Adhesión de GenBank de NP_001139357 (SEQ ID NO: 2).

La Figura 3 proporciona una alineación de aminoácidos entre la porción C-terminal de la proteína humana VASA (residuos 690-724 de SEQ ID NO: 1) y el homólogo de VASA de ratón (residuos 691-728 de SEQ ID NO: 2).

La Figura 4A muestra la región de los dominios C-terminal del polipéptido VASA/DDX4 que es reactivo con un anticuerpo de la invención y el anticuerpo de control (AB13840, Abcam plc, Cambridge, Reino Unido) y la Figura 4B muestra la unión del anticuerpo de control a la proteína VASA y los polipéptidos V1 y V2.

Figura 5A muestra las curvas de unión de respuesta a la dosis de la afinidad para VASA de 1E9 y 1A12; y la Figura 5B muestra los resultados de ensayos de ELISA con los péptidos de VASA, V1 y V2 que sugieren que 1E9 une el mismo epítipo que el anticuerpo policlonal de conejo comercialmente

disponible (AB13840, Abcam plc, Cambridge, Reino Unido). NC = control negativo; VASA = SEQ ID NO: 1 residuos 700-724; VASA-1 = V1 o SEQ ID NO: 1 residuos 712-721; VASA-2 = V1 o SEQ ID NO: 1 residuos 700-709.

La Figura 6A muestra las curvas de unión de respuesta a la dosis de la afinidad para VASA de las formas IgG y scFv-Fc de 1E9; y la Figura 6B muestra los resultados de los ensayos de ELISA de la unión de las formas de IgG y scFv-Fc de 1E9 con los péptidos de VASA, V1 y V2. NC = control negativo; VASA = SEQ ID NO: 1 residuos 700-724; VASA-1 = V1 o SEQ ID NO: 1 residuos 712-721; VASA-2 = V1 o SEQ ID NO: 1 residuos 700-709.

La Figura 7A muestra los resultados de experimentos de unión con tres anticuerpos de hibridomas anti-VASA (2M1/1K3, 2M1/1K23 y 2M1/1L5) y dos controles negativos (2M1/1F5 y 2M1/1H5) que no son específicos de VASA; La Figura 7B muestra curvas de respuesta a la dosis de cuatro anticuerpos hibridomas específicos de VASA (2M1/1K3, 2M1/1K23 y 2M1/1L5) en comparación con 1E9-lambda; y la Figura 7C muestra curvas de respuesta a la dosis de anticuerpos de hibridomas específicos de VASA 2M1/2K4 comparado con 1E9-lambda.

La Figura 8 muestra el resultado del análisis de subtipo para anticuerpos anti-VASA para ocho hibridomas (2M1/1L20, 2M1/1J20, 1M1/1C9, 2M1/1N3, 2M1/1K23, 1M1/1L5 y 2M1/2K4).

Las Figuras 9A-9B muestran alineaciones de algunas de las secuencias de VL de la invención de anti-VASA. La figura indica la ubicación aproximada de las tres regiones CDR (negrita, subrayado) y la SEQ ID NO correspondiente a cada secuencia.

Las Figuras 10A-10B muestran alineaciones de algunas de las secuencias de VH de la invención de anti-VASA. La figura indica la ubicación aproximada de las tres regiones CDR (negrita, subrayado) y la SEQ ID NO correspondiente a cada secuencia.

La Figura 11 muestra alineaciones de las secuencias únicas de CDR de las regiones VL de la Figura 9.

La Figura 12 muestra alineaciones de las secuencias únicas de CDR de las regiones VH de la Figura 10.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente divulgación se refiere a anticuerpos aislados (Abs), particularmente Abs que se unen específicamente a VASA con alta afinidad. En algunas modalidades, los Abs anti-VASA se derivan de secuencias de cadena

pesada y ligera o particulares y/o comprenden características estructurales particulares, tales como regiones CDR que comprenden secuencias de aminoácidos particulares. Esta divulgación proporciona Abs anti-VASA aislados, métodos para hacer dichos Abs anti-VASA, immunoconjugados y moléculas biespecíficas que comprenden dichos Abs anti-VASA y métodos para expresar dichos Abs anti-VASA. Esta divulgación también se refiere a métodos para usar los Abs anti-VASA para aislar y/o purificar las células que expresan VASA, incluyendo células madre de líneas germinales de mamíferos hembra o células madre oogoniales (OSCs) o células precursoras de óvulos y sus células progenitoras.

A fin de que la presente invención pueda ser más fácilmente entendida, se definirán ciertos términos. Las definiciones adicionales se establecen a lo largo de la descripción detallada.

Definiciones

El término "anticuerpo" o la abreviatura "Ab", en este documento, incluye anticuerpos completos y cualquier fragmento de unión del antígeno (es decir, "porción de unión a antígeno") o cadenas individuales de los mismos, con o sin glicosilación nativa. Un "anticuerpo" completo se refiere a una glicoproteína que comprende por lo menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro o una porción de unión a antígeno del mismo. Cada cadena pesada incluye una región variable de cadena pesada (V_H) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada se compone de tres dominios, C_{H1} , C_{H2} , y C_{H3} . Cada cadena ligera incluye una región variable de cadena ligera (V_L) y una región constante de cadena ligera con un dominio, C_L . Las regiones V_H y V_L pueden subdividirse aún más en regiones determinantes de complementariedad (CDR) y regiones marco (FR). Las regiones V_H y V_L incluyen cada una tres CDRs, designados CDR1, CDR2 y CDR3, que interaccionan con un antígeno (*por ejemplo*, VASA).

El término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo, en este documento, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conserva la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (*por ejemplo*, VASA). Ejemplos de fragmentos de unión comprendidos dentro del término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen un fragmento Fab, fragmento $F(ab')_2$, fragmento Fab', fragmento Fd, fragmento Fv, fragmento scFv, fragmento dAb y un CDR aislado.

El término "anticuerpo monoclonal" o "preparación del anticuerpo monoclonal," en este documento, se refiere a una preparación de moléculas de anticuerpo que consiste esencialmente de anticuerpos que tienen una secuencia de aminoácidos de una cadena pesada y una secuencia de aminoácidos de una cadena ligera (pero que pueden tener glicosilación heterogénea).

El término "anticuerpo humanizado," en este documento, incluye los anticuerpos que tienen regiones de marco de región constante y de región variable (FRs) pero no CDRs derivados de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana.

El término "anticuerpo recombinante," en este documento, incluye todos los anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por medios recombinantes. En ciertas modalidades, los anticuerpos recombinantes son aislados de una célula huésped transformada para expresar el anticuerpo (*por ejemplo*, de un transfectoma). En otras modalidades, los anticuerpos recombinantes son aislados de una biblioteca de anticuerpos recombinantes, combinatoria, tal como una biblioteca de despliegue de fagos. Los anticuerpos recombinantes también pueden ser preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que involucre empalme de secuencias genéticas de inmunoglobulina humana a otras secuencias de ADN.

El término "isotipo", en este documento, se refiere a la clase de cadena pesada (*por ejemplo*, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM para anticuerpos humanos) o clase de cadena ligera (*por ejemplo*, kappa o lambda en seres humanos) codificadas por los genes de la región constante. El término "subtipo" se refiere a las subclases dentro del subtipo (*por ejemplo*, IgA₁, IgA₂, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄ en seres humanos).

La frase "un anticuerpo específico para" un antígeno específico se utiliza indistintamente en este documento con la frase "un anticuerpo que se une específicamente a" un antígeno específico. Como se utiliza en este documento, el término " K_a " se refiere a la tasa de asociación y el término " K_d " a la tasa de disociación de un complejo anticuerpo-antígeno determinado. El término " K_D " se refiere a la constante de disociación, que es obtenida de la relación de K_d a K_a y expresada como concentración molar (M). Según algunas modalidades, un anticuerpo que "se une específicamente a VASA humana" pretende referirse a un anticuerpo que se une a VASA humana con una K_D de 5×10^{-8} M o menos, más preferiblemente 1×10^{-8} M o menos.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y

científicos utilizados en el presente documento tienen los mismos significados como lo entendería comúnmente un experto en la materia a la que pertenece esta invención. Aunque se pueden utilizar métodos o materiales similares o equivalentes a aquellos descritos en el presente documento en la práctica o prueba de la presente invención, los métodos y materiales adecuados se describen más adelante. Todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes y otras referencias mencionadas en el presente documento se incorporan expresamente por referencia. En caso de conflicto, la presente descripción, incluyendo las definiciones, será la que rija. Además, los materiales, métodos y ejemplos descritos son solamente ilustrativos y no pretenden ser limitativos.

Anticuerpos Anti-VASA

La invención proporciona una variedad de nuevos anticuerpos con alta afinidad contra la proteína humana VASA, particularmente la región C-terminal. Los anticuerpos pueden comprender las regiones completas VH y VL aquí divulgadas, o pueden comprender solamente las secuencias de CDR aquí divulgadas. Además, con base en las secuencias CDR aquí divulgadas, se proporcionan motivos de secuencia para las secuencias CDR, y los anticuerpos pueden comprender secuencias CDR definidas por los motivos.

Las secuencias CDR de la invención (incluyendo los CDRs divulgados en las Figuras 11 y 12 y los CDRs definidos por los motivos de secuencia aquí divulgados) pueden combinarse con otras secuencias de inmunoglobulina según métodos bien conocidos en la materia para producir moléculas de inmunoglobulina con especificidad de unión a antígeno determinada por los CDRs de la invención.

En algunas modalidades, los CDRs de la invención se combinan con secuencias de región marco (FR) y secuencias de dominio constante (CH o CL) de otros anticuerpos. Por ejemplo, aunque algunos de los CDRs aquí divulgados se derivan de hibridomas murinos y tienen secuencias de FR murino y de dominio constante, pueden recombinarse con secuencias de FR humano u otro mamífero y de dominio constante para producir anticuerpos humanizados u otros anticuerpos recombinantes. La producción de estos anticuerpos recombinantes es bien conocida por los expertos en la materia y requiere sólo de experimentación de rutina.

El tipo de regiones constantes incluidas en tales anticuerpos recombinantes puede ser elegido según su uso previsto. Por ejemplo, si los

anticuerpos están destinados a uso terapéutico para células objetivo que expresan VASA para destrucción, pueden utilizarse dominios constantes de cadena pesada (*es decir*, regiones Fc) de subtipos de IgG. Si los anticuerpos están destinados solamente como reactivos para el marcado de células (*por ejemplo*, para la clasificación celular activada por fluorescencia (FACS)), un fragmento completo de anticuerpo, de unión a antígeno (Fab), fragmento variable de cadena única (Fsc), anticuerpo de dominio único (sdAb) o incluso molécula de inmunoglobulina no-anticuerpo (*por ejemplo*, un dominio extracelular del receptor de MHC) puede utilizarse con los CDRs de la invención.

Los CDRs de la invención pueden seleccionarse independientemente de tal manera que las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de una cadena ligera variable (VL) o una cadena pesada variable (VH) dada se puedan elegir de diferentes cadenas VL y VH originales, de diferentes motivos de CDR VL y VH o de una combinación de los CDRs y motivos divulgados. Sin embargo, las secuencias para CDRs de cadena ligera deben seleccionarse de los CDRs VL o los motivos de CDR VL divulgados, y las secuencias para CDRs de cadena pesada deben seleccionarse de CDRs VH o los motivos de CDR VH divulgados. Del mismo modo, las secuencias para las regiones CDR1 deben seleccionarse de las secuencias de motivo de CDR1 o CDR1 divulgadas, las secuencias para las regiones CDR2 deben seleccionarse de las secuencias de motivo de CDR2 o CDR2 divulgadas, y las secuencias para las regiones CDR3 deben seleccionarse de las secuencias de motivo de CDR3 o CDR3 divulgadas, para las cadenas de VL o VH según sea apropiado.

Métodos de Uso de Anticuerpos Anti-VASA para Detectar o Aislar Células

Los anticuerpos anti-VASA de la invención pueden utilizarse en métodos estándar de purificación por inmutafinidad, inmunohistoquímica e inmunoterapia, pero con aplicación específica a las células y tejidos que expresan la proteína VASA.

Por ejemplo, los anticuerpos anti-VASA de la invención pueden utilizarse para aislar las células que expresan VASA de una población mixta de células, incluyendo sólo una fracción de células que expresan VASA. Por ejemplo, las células madre de línea germinal femenina o células madre oogoniales o sus precursores han sido descubiertos para estar presentes en el tejido ovárico en muy bajas proporciones. El tejido ovárico (*p. ej.*, epitelio de superficie ovárica y/o corteza) puede ser extirpado, disociado en células

individuales sometido a técnicas tales como el FACs usando anticuerpos anti-VASA marcados con fluorescencia o purificación por inmutafinidad usando anticuerpos anti-VASA inmovilizados. Las células aisladas que expresan VASA tienen diversas utilidades en tecnologías de reproducción asistida, como se describe anteriormente.

Alternativamente, puede realizarse inmunohistoquímica usando los anticuerpos anti-VASA de la invención para identificar las células o tejidos que expresan VASA y/o para cuantificar la expresión de VASA en dichas células.

Además, los anticuerpos anti-VASA de la invención pueden utilizarse terapéuticamente para dirigirse a células que expresan VASA para destrucción ya sea por citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpo (ADCC) o inmunotoxinas que comprenden anticuerpos anti-VASA de la invención conjugados con fracciones radio o quimio-tóxicas. Los conjugados de anticuerpos-fármaco de los anticuerpos anti-VASA de la invención podrían utilizarse también para suministrar fármacos terapéuticos a células que expresan VASA.

Moléculas de Ácido Nucleico que Codifican Anticuerpos Anti-VASA

La invención también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos anti-VASA de la invención. Dichos ácidos nucleicos se pueden diseñar usando tablas estándar para el código genético universal para elegir codones que codificarán la secuencia de aminoácidos deseada, o pueden utilizarse tablas especializadas de codones que reflejan los sesgos de codones característicos de diversos organismos. Así, por ejemplo, para optimizar la expresión de los anticuerpos anti-VASA de la invención en células CHO, un ácido nucleico que codifica el anticuerpo deseado puede ser diseñado utilizando una tabla de codones optimizada para las células CHO.

Los ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos anti-VASA de la invención pueden incluirse en una gran variedad de vectores conocidos en la materia, incluyendo vectores de clonación (*por ejemplo*, vectores de clonación de mamíferos o bacterianos), vectores de transformación (*por ejemplo*, vectores de recombinación homóloga, integración viral o replicación autónoma) y vectores de expresión (*por ejemplo*, vectores de número de copia alta, de expresión mamífero inducible o constitutiva).

Células que Expresan Anticuerpos Anti-VASA

También se proporcionan células huésped que expresan secuencias heterólogas que codifican los anticuerpos anti-VASA de la invención. Tales células huésped pueden ser útiles para la producción comercial de los anticuerpos anti-VASA de la invención y pueden ser producidas mediante la transformación de las células huésped adecuadas con vectores de expresión descritos anteriormente.

En algunas modalidades, la invención proporciona células mamíferas, incluyendo células CHO, que expresan los anticuerpos anti-VASA de la invención. Sin embargo, los expertos en la materia pueden expresar los anticuerpos en una variedad de células huésped, incluyendo sistemas bacterianos, levaduras, insectos y mamíferos. Véase, por ejemplo, *Verma et al.* (1998), *J. Immunol. Methods* 216(1-2):165-81, incorporada por referencia en su totalidad en este documento.

EJEMPLOS

Péptidos Inmunogénicos

Los siguientes péptidos se utilizaron como inmunógenos para generar anticuerpos contra el dominio C-terminal de VASA humana y para proyectar anticuerpos con alta afinidad de unión a VASA:

VASA-1 (V1) inmunógeno: SQAPNPVDDE (SEQ ID NO: 1 residuos 712-721)

VASA-2 (V2) inmunógeno: GKSTLNTAGF (SEQ ID NO: 1 residuos 700-709)

Como se muestra en la Figura 3, estos inmunógenos comprenden secuencias de aminoácidos del dominio C-terminal de VASA que se conservan altamente entre la proteína humana VASA y el homólogo de ratón VASA.

Generación de Hibridomas

Los hibridomas se formaron en experimentos separados con los inmunógenos de péptido de VASA V1 y V2 (arriba). Los péptidos se conjugaron con proteínas portadoras mediante métodos estándar. Los péptidos conjugados se usaron para inmunizar ratones, y para aumentar la respuesta inmune mediante la potenciación con el péptido conjugado. Después de un periodo de titulación aumentada de anticuerpos en los sueros, los animales se sacrificaron y se les quitaron los bazo. Las células B del bazo se fusionaron con líneas celulares compañeras de fusión de ratón (SP2-0) para aislamiento y clonación. Los hibridomas se formaron mediante la excrecencia a dilución limitante, y los

clones se desarrollaron por experimentos de titulación de clonación. La presencia de anticuerpos reactivos a VASA fue examinada por ensayos ELISA. Los hibridomas se derivaron por excrecencia y estabilización de células emplacadas en clonación celular de dilución limitante.

La unión de los anticuerpos reactivos a VASA en la región de los dominios C-terminal del polipéptido VASA/DDX4 se comparó con los anticuerpos de control de unión (AB13840, Abcam plc, Cambridge, Reino Unido) para delinear la similitud de los epítomos de unión. Los resultados ejemplares se muestran en la Figura 4.

Análisis de Hibridomas

Los hibridomas se inyectaron por vía intraperitoneal en ratones y, después de permitir un periodo de crecimiento, el fluido de ascitis se recolectó y purificó, todo usando procedimientos estándar, y después se analizó por ELISA.

La unión de los anticuerpos derivados de ascitis a los polipéptidos VASA, VASA-1 y VASA-2 se utilizó para seleccionar anticuerpos para mayor análisis. Por ejemplo, como se muestra en la Figura 7, la unión de cuatro anticuerpos de hibridoma anti-VASA (2M1/1K3, 2M1/1K23, 2M1/1L5 y 2M1/2K4) se comparó con dos controles negativos (2M1/1F5 y 2M1/1H5) que no son específicos de VASA y/o al anticuerpo 1E9-lambda (descrito más adelante).

Panoramización de Biblioteca Recombinante

Como una alternativa a la tecnología de hibridomas, la generación de anticuerpos contra los residuos de aminoácidos 700-724 de VASA/DDX4 humano se realizó usando tecnología de despliegue de fagos. La biblioteca de despliegue de fagos se formó a partir de un grupo de células B normales de ~40 donantes de sangre. Los fagos se utilizaron para desplegar la cadena scFv de un anticuerpo.

Los resultados de la panoramización de la biblioteca de scFv humano sin tratamiento contra el péptido VASA/DDX4 700-724 fueron como se muestra en la Tabla 1 siguiente:

TABLA 1

Péptido	Ronda	Titulación de Fago de Salida (cfu/ml)	Titulación de Fago rescatado (cfu/ml)	Resultados de ELISA
VASA	1 ^a	10 ⁷	10 ¹³	/
	2 ^a	10 ⁷	10 ¹³	/
	3 ^a	10 ⁷	10 ¹²	Sin clones positivos
	4 ^a	10 ⁷	10 ¹³	Dos clones positivos
	5 ^a	10 ⁷	10 ¹³	Varios clones positivos
	6 ^a	10 ⁷	/	/

Los resultados de ELISA de colonias simples identificadas después de las rondas 3 y 4 de selección se muestran en las Tablas 2-4 siguientes. Dos clones fueron notables: “1A12” (placa 1, fila A, columna 12) y “1E9” (placa 1, fila E, columna 9).

TABLA 2

placa 1												
	3 rondas						4 rondas					
	Péptido de VASA											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A.	0.062	0.061	0.057	0.063	0.065	0.092	0.059	0.059	0.059	0.060	0.059	0.550
B.	0.055	0.058	0.056	0.056	0.064	0.073	0.060	0.057	0.060	0.58	0.063	0.059
C.	0.065	0.058	0.060	0.063	0.069	0.072	0.069	0.063	0.066	0.061	0.070	0.063
D.	0.072	0.064	0.067	0.066	0.061	0.062	0.069	0.069	0.070	0.070	0.117	0.071
E.	0.778	0.058	0.055	0.071	0.056	0.059	0.057	0.056	0.458	0.064	0.060	0.059
F.	0.057	0.059	0.059	0.060	0.059	0.062	0.063	0.057	0.059	0.057	0.059	0.056
G.	0.058	0.055	0.056	0.082	0.061	0.066	0.061	0.057	0.056	0.058	0.068	0.055
H.	0.044	0.058	0.058	0.056	0.053	0.096	0.056	0.052	0.056	0.054	0.054	0.056
	péptido no relevante											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A.	0.085	0.063	0.062	0.069	0.056	0.089	0.054	0.059	0.056	0.057	0.057	0.061
B.	0.062	0.053	0.054	0.06	0.09	0.066	0.063	0.054	0.054	0.058	0.058	0.062
C.	0.064	0.063	0.071	0.069	0.069	0.067	0.062	0.06	0.057	0.062	0.064	0.057
D.	0.094	0.063	0.067	0.069	0.069	0.067	0.071	0.067	0.067	0.066	0.135	0.061
E.	0.078	0.058	0.059	0.116	0.055	0.057	0.054	0.064	0.061	0.054	0.056	0.059
F.	0.062	0.056	0.056	0.056	0.055	0.064	0.063	0.057	0.062	0.056	0.054	0.058
G.	0.057	0.06	0.059	0.066	0.056	0.064	0.057	0.057	0.057	0.055	0.077	0.055
H.	0.061	0.066	0.061	0.054	0.058	0.111	0.057	0.054	0.057	0.058	0.052	0.054

TABLA 3

placa 2-después de 4 rondas de selección												
	Péptido de VASA											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A.	0.052	0.045	0.053	0.045	0.051	0.045	0.046	0.044	0.049	0.044	0.045	0.050
B.	0.049	0.051	0.051	0.045	0.042	0.054	0.046	0.045	0.055	0.045	0.048	0.053
C.	0.048	0.047	0.048	0.054	0.051	0.047	0.047	0.045	0.047	0.052	0.051	0.055
D.	0.062	0.050	0.048	0.047	0.059	0.056	0.059	0.063	0.048	0.057	0.052	0.061
E.	0.047	0.042	0.042	0.045	0.051	0.041	0.047	0.042	0.044	0.052	0.050	0.054
F.	0.047	0.049	0.040	0.042	0.046	0.043	0.046	0.042	0.052	0.045	0.051	0.054
G.	0.047	0.052	0.045	0.041	0.039	0.051	0.048	0.049	0.052	0.043	0.054	0.050
H.	0.055	0.048	0.054	0.042	0.043	0.048	0.048	0.049	0.051	0.051	0.048	0.054
	péptido no relevante											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A.	0.047	0.053	0.050	0.042	0.053	0.053	0.041	0.043	0.042	0.053	0.053	0.054
B.	0.052	0.053	0.054	0.054	0.053	0.043	0.043	0.045	0.053	0.045	0.055	0.054
C.	0.052	0.047	0.054	0.053	0.055	0.045	0.045	0.043	0.053	0.055	0.057	0.053
D.	0.047	0.049	0.054	0.056	0.047	0.049	0.054	0.051	0.056	0.062	0.065	0.062
E.	0.052	0.045	0.042	0.045	0.041	0.051	0.040	0.047	0.041	0.056	0.053	0.054
F.	0.052	0.053	0.041	0.045	0.052	0.053	0.054	0.052	0.533	0.049	0.045	0.053
G.	0.051	0.053	0.049	0.050	0.051	0.043	0.049	0.052	0.053	0.053	0.054	0.051
H.	0.055	0.052	0.054	0.053	0.045	0.051	0.051	0.051	0.052	0.062	0.054	0.053

TABLA 4

placa 3-después de 4 rondas de selección												
	Péptido de VASA											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A.	0.074	0.052	0.058	0.076	0.052	0.063	0.052	0.055	0.040	0.052	0.054	0.072
B.	0.047	0.041	0.052	0.064	0.072	0.051	0.059	0.048	0.053	0.048	0.054	0.053
C.	0.051	0.042	0.042	0.044	0.053	0.056	0.052	0.048	0.044	0.048	0.060	0.056
D.	0.057	0.049	0.045	0.051	0.053	0.046	0.067	0.047	0.046	0.046	0.059	0.058
E.	0.054	0.046	0.042	0.126	0.041	0.047	0.051	0.040	0.042	0.043	0.048	0.073
F.	0.077	0.045	0.040	0.047	0.042	0.040	0.042	0.039	0.041	0.053	0.051	0.051
G.	0.178	0.056	0.044	0.041	0.051	0.050	0.055	0.042	0.042	0.051	0.044	0.052
H.	0.054	0.042	0.045	0.041	0.049	0.039	0.045	0.089	0.050	0.051	0.061	0.055
	péptido no relevante											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A.	0.050	0.056	0.055	0.049	0.053	0.055	0.051	0.059	0.051	0.044	0.047	0.054
B.	0.058	0.075	0.061	0.064	0.073	0.061	0.053	0.054	0.059	0.056	0.059	0.063
C.	0.076	0.056	0.053	0.054	0.056	0.053	0.053	0.053	0.057	0.063	0.049	0.061
D.	0.069	0.052	0.052	0.058	0.056	0.048	0.059	0.059	0.056	0.052	0.051	0.056
E.	0.047	0.056	0.050	0.118	0.063	0.067	0.052	0.053	0.054	0.053	0.056	0.054
F.	0.053	0.054	0.054	0.052	0.054	0.054	0.053	0.053	0.043	0.056	0.046	0.056
G.	0.063	0.056	0.054	0.045	0.045	0.049	0.050	0.053	0.053	0.052	0.055	0.053
H.	0.058	0.055	0.054	0.047	0.053	0.048	0.050	0.051	0.054	0.053	0.053	0.058

Los resultados de ELISA de colonias simples identificadas después de 5 rondas de selección se muestran en las Tablas 5-7 siguientes. Los clones notables incluyeron 1A11, 1B4, 1B7, 1D4, 1D5, 1E2, 1E3, 1F7, 1G3, 1G12, 2B8, 2C7, 2E11, 2F1, 2G8, 2G10, 2H9, 3B2, 3B5, 3B7, 3D11, 3E5, 3E12, 3F6 y 3H11.

TABLA 5

placa 1-después de 5 rondas de selección												
	Péptido de VASA											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A.	0.049	0.049	0.122	0.135	0.050	0.129	0.051	0.089	0.077	0.084	0.227	0.077
B.	0.051	0.197	0.056	0.212	0.067	0.099	0.280	0.109	0.122	0.094	0.049	0.053
C.	0.181	0.168	0.062	0.059	0.105	0.051	0.127	0.098	0.101	0.093	0.061	0.080
D.	0.057	0.186	0.143	0.408	0.527	0.057	0.178	0.061	0.124	0.060	0.061	0.077
E.	0.159	0.342	0.230	0.046	0.047	0.042	0.120	0.119	0.053	0.119	0.126	0.064
F.	0.160	0.177	0.160	0.086	0.048	0.134	0.248	0.053	0.079	0.054	0.159	0.052
G.	0.167	0.119	0.246	0.085	0.049	0.050	0.050	0.052	0.050	0.102	0.053	0.458
H.	0.126	0.136	0.096	0.050	0.048	0.049	0.060	0.049	0.058	0.104	0.066	0.052
	péptido no relevante											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A.	0.053	0.054	0.051	0.052	0.053	0.054	0.054	0.050	0.051	0.044	0.050	0.052
B.	0.056	0.054	0.053	0.053	0.052	0.052	0.062	0.053	0.052	0.053	0.054	0.053
C.	0.056	0.055	0.056	0.056	0.056	0.053	0.053	0.052	0.052	0.051	0.054	0.053
D.	0.060	0.060	0.060	0.057	0.065	0.059	0.058	0.061	0.052	0.056	0.057	0.055
E.	0.052	0.083	0.051	0.053	0.043	0.043	0.042	0.039	0.043	0.050	0.053	0.057
F.	0.052	0.052	0.050	0.050	0.041	0.040	0.048	0.043	0.050	0.053	0.052	0.052
G.	0.051	0.051	0.048	0.049	0.052	0.043	0.054	0.046	0.052	0.051	0.053	0.061
H.	0.052	0.048	0.046	0.049	0.044	0.050	0.050	0.049	0.049	0.051	0.051	0.052

TABLA 6

placa 2-después de 5 rondas de selección												
	Péptido de VASA											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A.	0.075	0.051	0.067	0.050	0.049	0.069	0.150	0.094	0.081	0.050	0.043	0.103
B.	0.136	0.054	0.107	0.075	0.059	0.052	0.120	0.318	0.159	0.095	0.152	0.052
C.	0.103	0.056	0.055	0.052	0.140	0.053	0.210	0.056	0.116	0.054	0.140	0.114
D.	0.098	0.141	0.058	0.114	0.104	0.057	0.070	0.077	0.079	0.049	0.138	0.054
E.	0.071	0.065	0.058	0.077	0.044	0.050	0.121	0.051	0.050	0.049	0.212	0.083
F.	0.210	0.051	0.046	0.110	0.043	0.063	0.043	0.056	0.052	0.057	0.051	0.062
G.	0.054	0.078	0.064	0.060	0.053	0.051	0.054	0.475	0.055	0.272	0.076	0.061
H.	0.050	0.050	0.050	0.054	0.050	0.054	0.051	0.050	0.290	0.055	0.061	0.056
	péptido no relevante											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A.	0.040	0.041	0.044	0.041	0.040	0.048	0.046	0.047	0.040	0.045	0.044	0.045
B.	0.039	0.052	0.039	0.047	0.042	0.050	0.052	0.060	0.053	0.042	0.045	0.043
C.	0.036	0.043	0.051	0.041	0.042	0.051	0.053	0.062	0.052	0.053	0.050	0.040
D.	0.047	0.055	0.048	0.046	0.047	0.051	0.049	0.058	0.048	0.052	0.054	0.052
E.	0.051	0.051	0.040	0.039	0.043	0.041	0.040	0.040	0.040	0.043	0.067	0.046
F.	0.054	0.051	0.046	0.045	0.47	0.040	0.043	0.050	0.043	0.049	0.048	0.040
G.	0.038	0.050	0.047	0.040	0.039	0.039	0.045	0.060	0.041	0.048	0.050	0.044
H.	0.039	0.058	0.039	0.040	0.049	0.048	0.050	0.049	0.058	0.048	0.044	0.049

TABLA 7

placa 3-después de 5 rondas de selección												
	Péptido de VASA											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A.	0.047	0.122	0.105	0.176	0.177	0.102	0.040	0.164	0.104	0.109	0.169	0.081
B.	0.048	0.218	0.094	0.054	0.314	0.155	0.287	0.146	0.052	0.166	0.054	0.054
C.	0.199	0.059	0.052	0.105	0.060	0.054	0.118	0.152	0.054	0.145	0.055	0.053
D.	0.053	0.096	0.066	0.056	0.058	0.077	0.055	0.048	0.196	0.155	0.259	0.133
E.	0.139	0.052	0.052	0.046	0.471	0.089	0.199	0.052	0.049	0.042	0.173	0.244
F.	0.055	0.051	0.068	0.046	0.093	0.412	0.083	0.041	0.129	0.052	0.053	0.053
G.	0.101	0.056	0.058	0.039	0.051	0.050	0.075	0.046	0.042	0.044	0.070	0.052
H.	0.135	0.083	0.062	0.052	0.052	0.050	0.056	0.071	0.073	0.094	0.200	0.050
	péptido no relevante											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A.	0.055	0.056	0.053	0.051	0.054	0.056	0.054	0.45	0.049	0.053	0.055	0.053
B.	0.057	0.057	0.054	0.055	0.059	0.056	0.056	0.044	0.058	0.052	0.054	0.055
C.	0.057	0.055	0.056	0.054	0.049	0.052	0.043	0.052	0.055	0.055	0.050	0.055
D.	0.060	0.062	0.059	0.058	0.061	0.058	0.057	0.047	0.059	0.058	0.061	0.059
E.	0.056	0.045	0.048	0.055	0.071	0.048	0.046	0.043	0.048	0.056	0.056	0.059
F.	0.054	0.045	0.055	0.047	0.053	0.070	0.044	0.052	0.053	0.053	0.054	0.055
G.	0.052	0.055	0.049	0.049	0.041	0.047	0.044	0.046	0.054	0.053	0.053	0.051
H.	0.053	0.052	0.057	0.041	0.046	0.044	0.051	0.051	0.052	0.052	0.048	0.050

Los clones que se muestran en negritas fueron amplificados por PCR.

Conversión a fusión de scFv-Fc y expresión en células mamíferas

Después de 5 rondas de panoramización, los patrones de digestión del ADN mostraron que muchos clones de la 5a ronda de panoramización fueron los mismos, lo que indica que no eran necesarias rondas adicionales de selección y análisis de ELISA.

Se seleccionaron dos clones únicos (1A12, 1E9) para conversión a fusiones de scFv-Fc para expresión en células mamíferas y para análisis de ELISA y FACS. La Figura 5A muestra curvas de unión de respuesta a la dosis que indicaron que 1E9 tuvo una EC50 de 0.02779 nM y 1A12 tuvo una EC50 de 0.2156 nM. Además, la Figura 5B muestra los resultados de los ensayos de ELISA con los péptidos VASA V1 y V2 que sugieren que 1E9 se une al mismo epítipo que el anticuerpo policlonal de conejo comercialmente disponible (AB13840, Abcam plc, Cambridge, Reino Unido).

Se compararon dos formas diferentes del anticuerpo 1E9: IgG y scFv-Fc. Como se muestra en la Figura 6A, 1E9 IgG tuvo una EC50 de 0.08919 nM y el 1E9 scFv-Fc tuvo una EC50 de 0.3072 nM. Además, como se muestra en la Figura 6B, ambas formas fueron específicas hacia el epítipo VASA-1.

Producción de Anticuerpos Genéticos Sintéticos

Se emplearon los siguientes pasos para producir genes sintéticos de anticuerpos:

(1) Determinación del subtipo de anticuerpos de hibridoma. Los subtipos de IgG de los anticuerpos de hibridoma se determinaron usando kits comercialmente disponibles según los protocolos del fabricante (por ejemplo, Kit de Isotipo de Anticuerpo Monoclonal de Ratón, No. de Catálogo MMT1, AbDSerotech, Kidlington, Reino Unido). La Figura 8 muestra el resultado del análisis de subtipo para anticuerpos anti-VASA para ocho hibridomas (2M1/1L20, 2M1/1J20, 1M1/1C9, 2M1/1N3, 2M1/1K23, 1M1/1L5 y 2M1/2K4). Todos los anticuerpos fueron IgG1, IgG2a o IgG2b.

(2) Síntesis de cebador de degeneración Con base en la información del subtipo de los ocho anticuerpos de hibridoma probados, los cebadores de degeneración para IgG VH y VL de ratón fueron designados usando información de secuencia de una base de datos de IgG de ratón (es decir, la base de datos de *International Immunogenetics Information System*® o IMGT; ver Lefranc *et al.* (2003), *Leukemia* 17:260-266, y Alamyar *et al.* (2012), *Methods Mol. Biol.* 2012;882:569-604). Diez cebadores delanteros de degeneración se diseñaron y sintetizaron para la cadena VH y diez para la cadena VL (9 para la cadena kappa y uno para la cadena lambda). Además, dos cebadores inversos de degeneración para la cadena VH (uno para los subtipos IgG1 e IgG2b, y uno para el subtipo IgG2a) y cinco para la cadena VL (cuatro para la cadena kappa y uno para la cadena lambda) se diseñaron y sintetizaron.

(3) Extracción, amplificación, clonación y secuenciación de ARN. El ARN se extrajo de las células de hibridoma mediante técnicas estándar, la síntesis de ADNc de primera hebra se realizó mediante técnicas estándar usando cebadores específicos de genes y oligo(dT), y el ADNc se amplificó usando cebadores específicos de genes. El ADN amplificado fue después ligado a un vector de clonación bacteriano comercialmente disponible (pMD18-T, Sino Biological, Inc., Beijing, China). Se realizaron metodologías estándar para transformar los productos de la ligada en *E. coli* DH5a, y para secuenciar clones positivos.

Análisis de Secuencia de Anticuerpos

Los clones que produjeron anticuerpos anti-Vasa potencialmente útiles fueron secuenciados con ADN y se dedujeron las secuencias de aminoácidos correspondientes. Las secuencias se divulgan para ocho anticuerpos derivados de los hibridomas descritos anteriormente (es decir, 1N23, 1K23, 2K4, 1C9, 1J20, 1L20, 1K3, 1L5), cuatro anticuerpos adicionales derivados de hibridomas producidos bajo contrato (es decir, CTA4/5, CTB4/11, CTC2/6, CTD2/6) y dos anticuerpos derivados del despliegue de fagos (es decir, 1A12 y 1E9).

Secuencias Variables de Cadena Ligera

VL de 1N23. Los clones VL positivos del hibridoma 1N23 se secuenciaron y seis resultaron codificar cadenas funcionales VL. Estos seis clones fueron designados 1N23VL5-5, 1N23VL5-8_0816, 1N23VL1-8, 1N23VL1-2_0820, 1N23VL1-4_0820 y 1N23VL1-2.

VL de 1K23. Los clones VL positivos del hibridoma 1K23 se secuenciaron y cuatro resultaron codificar cadenas funcionales VL. Estos cuatro clones se designaron 1K23VL2-5, 1K23VL2-6, 1K23VL2-8_0822 y 1K23VL2-3_0829.

VL de 2K4. Los clones VL positivos del hibridoma 2K4 se secuenciaron y ocho resultaron codificar cadenas funcionales VL. Estos ocho clones se designaron 2K4VL1-3_0820, 2K4VL1-4, 2K4VL1-1, 2K4VL1-6_0820, 2K4VL2-5_0816, 2K4VL2-4, 2K4VL2-6_0816 y 2K4VL2-5.

VL de 1C9. Los clones VL positivos del hibridoma 1C9 se secuenciaron y tres resultaron codificar cadenas funcionales VL. Estos tres clones se designaron 1C9VL2-4, 1C9VL2-6 y 1C9VL2-3_0816.

VL de 1J20. Los clones VL positivos del hibridoma 1J20 se secuenciaron y tres resultaron codificar cadenas funcionales VL. Estos tres clones se designaron 1J20VL5-2_0907, 1J20VL5-6_0907 y 1J20VL4-3_0907.

VL de 1L20. Los clones VL positivos del hibridoma 1L20 se secuenciaron y uno resultó codificar una cadena funcional VL. Ese clon se designó 1L20VL5-0912_091.

VL de 1K3. Los clones VL positivos del hibridoma 1K3 se secuenciaron y cuatro resultaron codificar cadenas funcionales VL. Estos cuatro clones se designaron 1K3VL2-5, 1K3VL2-5, 1K3VL2-3 y 1K3VL2-4.

VL de 1L5. Los clones VL positivos del hibridoma 1L5 se secuenciaron y dos resultaron codificar cadenas funcionales VL. Estos dos

clones se designaron 1L5VL2-4 y 1L5VL3-1.

VLs adicionales. Las secuencias VL se obtuvieron para cuatro anticuerpos de hibridoma adicionales designados CTA4_VL, CTB4_VL, CTC6_VL, CTD6_VL.

Alineaciones de Secuencia VL Las alineaciones de todas las secuencias VL descritas arriba se muestran en la Figura 9. La figura indica la ubicación aproximada de las tres regiones CDR (**negrita, subrayado**) y la SEQ ID NO correspondiente a cada secuencia.

Secuencias CDR de VL Únicas. Las alineaciones de las secuencias CDR únicas de los VLs de la Figura 9 se muestran en la Figura 11. De las 34 secuencias VL, hay sólo 5 secuencias CDR1 únicas, 6 secuencias CDR2 únicas, y 8 secuencias CDR3 únicas, como se muestra en la Figura 11.

Secuencias CDR de VL de Consenso. Con base en las secuencias divulgadas en la Figura 11, así como en las características de estructura/función de los aminoácidos de ocurrencia natural, se pueden determinar las secuencias de consenso para los CDRs de VL.

Una secuencia de consenso es el Motivo 1 de CDR1 de VL:

$X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 X_8 X_9 X_{10} X_{11}$ (SEQ ID NO:132)

en donde X_1 es Q, N, K, R, S o T; X_2 es S, T, C, N o Q; X_3 es I, L, V, M o A; X_4 es V, L, I, M, A o ausente; X_5 es H, K, R o ausente; X_6 es S, T, C o ausente; X_7 es N, Q o ausente; X_8 es G, A o ausente; X_9 es N o Q; X_{10} es T, S, C, N o Q; y X_{11} es Y, F o W. En algunas modalidades, X_1 está limitado a Q, K o S; y/o X_2 está limitado a S o N; y/o X_3 está limitado a I o L; y/o X_4 está limitado a V, L o ausente; y/o X_5 está limitado a H o ausente; y/o X_6 está limitado a S o ausente; y/o X_7 está limitado a N o ausente; y/o X_8 está limitado a G o ausente; y/o X_9 está limitado a N; y/o X_{10} está limitado a T, S o N; y/o X_{11} está limitado a Y o F. En algunas modalidades, la subsecuencia $X_1 X_2 X_3$ está limitada a Q N I; en algunas modalidades, la subsecuencia $X_1 X_2 X_3$ está limitada a Q S L; y en algunas modalidades, la subsecuencia $X_1 X_2 X_3$ está limitada a K S L. Además, en algunas modalidades, cuando $X_1 X_2 X_3$ es Q S L o Q N I, entonces X_4 es V; mientras que en otras modalidades, cuando $X_1 X_2 X_3$ es K S L, entonces X_4 es L. En algunas modalidades, cuando $X_9 X_{10}$ es N T, entonces X_{11} es Y.

Señalando en particular que las Secuencias CDR1 VL de SEQ ID NOs: 86-88 son algo distintas de las demás en la Figura 11, una secuencia de consenso alternativa es VL CDR1 Motivo 2:

$X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 X_8 X_9 X_{10} X_{11}$ (SEQ ID NO:133)

donde X_1 es Q, N, K o R; X_2 es S, T, C, N o Q; X_3 es I, L, V, M o A; X_4 es V, L, I,

M o A; X₅ es H, K o R; X₆ es S, T o C; X₇ es N o Q; X₈ es G o A; X₉ es N o Q; X₁₀ es T, S o C; y X₁₁ es Y, F o W. En algunas modalidades, X₁ está limitado a Q o K; y/o X₂ está limitado a S o N; y/o X₃ está limitado a I o L; y/o X₄ está limitado a V o L; y/o X₅ está limitado a H; y/o X₆ está limitado a S; y/o X₇ está limitado a N; y/o X₈ está limitado a G; y/o X₉ está limitado a N; y/o X₁₀ está limitado a T; y/o X₁₁ está limitado a Y. En algunas modalidades, la subsecuencia X₁ X₂ X₃ está limitado a Q N I; en algunas modalidades, la subsecuencia X₁ X₂ X₃ está limitado a Q S L; y en algunas modalidades, la subsecuencia X₁ X₂ X₃ está limitado a K S L. Además, en algunas modalidades, cuando X₁ X₂ X₃ es Q S L o Q N I, entonces X₄ es V; mientras que en otras modalidades, cuando X₁ X₂ X₃ es K S L, entonces X₄ es L. En algunas modalidades, cuando X₉ X₁₀ es N T, entonces X₁₁ es Y.

Para la CDR2 VL, una secuencia de consenso es el Motivo 1 de CDR2 VL:

Y₁ Y₂ Y₃ (SEQ ID NO: 134)

donde Y₁ es K, R o H; Y₂ es V, I, L, M, A, T, S o C; y Y₃ es S, T, C, N o Q. En algunas modalidades, Y₂ está limitado a V, I, M o T; y/o Y₃ está limitado a S o N.

Señalando en particular que las Secuencias CDR2 VL de SEQ ID NOs: 94 son algo distintas de las demás en la Figura 11, una secuencia de consenso alternativa es el Motivo 2 de CDR2 VL:

Y₁ Y₂ Y₃ (SEQ ID NO: 135)

donde Y₁ es D o E; Y₂ es N o Q; y Y₃ es N o Q. En algunas modalidades, Y₁ está limitado a D; y/o Y₂ está limitado a N; y/o Y₃ está limitado a N.

De manera similar, señalando en particular que las Secuencias CDR2 VL de SEQ ID NOs: 95 son algo distintas de las demás en la Figura 11, una secuencia de consenso alternativa es el Motivo 3 de CDR2 VL:

Y₁ Y₂ Y₃ (SEQ ID NO: 136)

donde Y₁ es Q o N; Y₂ es D o E; y Y₃ es K, R o H. En algunas modalidades, Y₁ está limitado a Q; y/o Y₂ está limitado a D; y/o Y₃ está limitado a K.

Para la CDR3 VL, una secuencia de consenso es el Motivo 1 de CDR3 VL:

Z₁ Z₂ Z₃ Z₄ Z₅ Z₆ Z₇ Z₈ Z₉ Z₁₀ (SEQ ID NO: 137)

donde Z₁ es S, T, C, F, Y, M, L, V, I o A; Z₂ es Q, N, S, T o C; Z₃ es S, T, C, G, A, H, K, R, Q, N, Y, F o W; Z₄ es A, G, S, T, C, L, I, V, M, D o E; Z₅ es H, K, R, E, D, S, T o C; Z₆ es V, L, I, M, A, Y, F, W, S, T o C; Z₇ es P, S, T, C o ausente; Z₈ es S, T, C o ausente; Z₉ es W, P, L, I, V, M, A, F, o Y; y Z₁₀ es T, S, C, V, L, I, M, A. En algunas modalidades, Z₁ está limitado a S, F, M o L; y/o Z₂ está

limitado a Q o S; y/o Z₃ está limitado a S, G, H, Q o Y; y/o Z₄ está limitado a A, S, T, L, o D; y/o Z₅ está limitado a H, E, D o S; y/o Z₆ está limitado a V, Y, F, o S; y/o Z₇ está limitado a P, S o ausente; y/o Z₈ está limitado a S o ausente; y/o Z₉ está limitado a W, P, L o F; y/o Z₁₀ está limitado a T o V.

Señalando en particular que las Secuencias CDR3 VL de SEQ ID NOs: 96-98 tienen una carga positiva en la posición Z₅ mientras que las otras en la Figura 11 no, una secuencia de consenso alternativa es el Motivo 2 de CDR3 VL:

Z₁ Z₂ Z₃ Z₄ Z₅ Z₆ Z₇ Z₈ Z₉ Z₁₀ (SEQ ID NO:138)

donde Z₁ es S, T, C, F o Y; Z₂ es Q o N; Z₃ es S, T, C, G o A; Z₄ es A, G, S, T o C; Z₅ es H, K o R; Z₆ es V, L, I, M o A; Z₇ es P o ausente; Z₈ está ausente; Z₉ es W, P, L, I, V, M, A, F o Y; y Z₁₀ es T, S, o C. En algunas modalidades, Z₁ está limitado a S o F; y/o Z₂ está limitado a Q; y/o Z₃ está limitado a S o G; y/o Z₄ está limitado a A, S o T; y/o Z₅ está limitado a H; y/o Z₆ está limitado a V; y/o Z₇ está limitado a P o ausente; y/o Z₈ está limitado a ausente; y/o Z₉ está limitado a W, P, L o F; y/o Z₁₀ está limitado a T.

Señalando en particular que las Secuencias CDR3 VL de SEQ ID NOs: 99-102 tienen una carga negativa en la posición Z₅ mientras que las otras en la Figura 11 no, una secuencia de consenso alternativa es el Motivo 3 de CDR3 VL:

Z₁ Z₂ Z₃ Z₄ Z₅ Z₆ Z₇ Z₈ Z₉ Z₁₀ (SEQ ID NO:139)

donde Z₁ es M, C, L, I, V, A; Z₂ es Q o N; Z₃ es H, K, R, Q, N, G, A, Y o F; Z₄ es L, I, V, M, A, D o E; Z₅ es E o D; Z₆ es Y o F; Z₇ es P; Z₈ está ausente; Z₉ es W, P, L, I, V, M, A, F o Y; y Z₁₀ es T, S, o C. En algunas modalidades, Z₁ está limitado a M o L; y/o Z₂ está limitado a Q; y/o Z₃ está limitado a H, Q, G o Y; y/o Z₄ está limitado a L o D; y/o Z₅ está limitado a E o D; y/o Z₆ está limitado a Y o F; y/o Z₇ está limitado a P; y/o Z₈ está limitado a ausente; y/o Z₉ está limitado a W, P, L o F; y/o Z₁₀ está limitado a T.

Señalando en particular que la Secuencia CDR3 VL de SEQ ID NO: 103 es algo distinta de las demás en la Figura 11, una secuencia de consenso alternativa es el Motivo 4 de CDR3 VL:

Z₁ Z₂ Z₃ Z₄ Z₅ Z₆ Z₇ Z₈ Z₉ Z₁₀ (SEQ ID NO:140)

donde Z₁ es S, T o C; Z₂ es S, T o C; Z₃ es Y o F; Z₄ es T, S, o C; Z₅ es S, T o C; Z₆ es S, T o C; Z₇ es S, T o C; Z₈ es S, T o C; Z₉ es W, P, F o Y; y Z₁₀ es V, L, I, M, A, T, S o C. En algunas modalidades, Z₁ está limitado a S o T; y/o Z₂ está limitado a S o T; y/o Z₃ está limitado a Y; y/o Z₄ está limitado a T o S; y/o Z₅ está limitado a S o T; y/o Z₆ está limitado a S o T; y/o Z₇ está limitado a S o T;

y/o Z₈ está limitado a S o T; y/o Z₉ está limitado a W, P o F; y/o Z₁₀ está limitado a V, L, I, T o S. En algunas modalidades, Z₁ está limitado a S; y/o Z₂ está limitado a S; y/o Z₃ está limitado a Y; y/o Z₄ está limitado a T; y/o Z₅ está limitado a S; y/o Z₆ está limitado a S; y/o Z₇ está limitado a S; y/o Z₈ está limitado a S; y/o Z₉ está limitado a W; y/o Z₁₀ está limitado a V.

Finalmente, señalando en particular que la Secuencia CDR3 VL de SEQ ID NO: 104 es algo distinta de las demás en la Figura 11, una secuencia de consenso alternativa es el Motivo 5 de CDR3 VL:

Z₁ Z₂ Z₃ Z₄ Z₅ Z₆ Z₇ Z₈ Z₉ Z₁₀ (SEQ ID NO:141)

donde Z₁ es Q o N; Z₂ es A o G; Z₃ es W, Y o F; Z₄ es D o E; Z₅ es S, T o C; Z₆ es R, K o H; Z₇ es T, S o C; Z₈ es V, I, L, M o A; Z₉ es V, I, L, M o A; y Z₁₀ es I, L, V, M o A. En algunas modalidades, Z₁ está limitado a Q; y/o Z₂ está limitado a A; y/o Z₃ está limitado a W; y/o Z₄ está limitado a D; Z₅ está limitado a S; y/o Z₆ está limitado a R; y/o Z₇ está limitado a T; y/o Z₈ está limitado a V; y/o Z₉ está limitado a V; y/o Z₁₀ está limitado a I.

Secuencias Variables de Cadena Pesada

VH de 1N23. Los clones VH positivos del hibridoma 1N23 se secuenciaron y cuatro resultaron codificar cadenas funcionales VH. Estos cuatro clones se designaron 1N23VH3-5, 1N23VH3-7, 1N23VH2-1 y 1N23VH1-5.

VH de 1K23. Los clones VH positivos del hibridoma 1K23 se secuenciaron y seis resultaron codificar cadenas funcionales VH. Estos seis clones fueron designados 1K23VH2-1_0910, 1K23VH1-4_0907, 1K23VH1-10_0907, 1K23VH8-4_0907, 1K23VH8-5_0907 y 1K23VH8-9_0907.

VH de 2K4. Los clones VH positivos del hibridoma 2K4 se secuenciaron y cuatro resultaron codificar cadenas funcionales VH. Estos cuatro clones se designaron 2K4VH3-8, 2K4VH2-8, 2K4VH1-1 y 2K4VH1-4.

VH de 1C9. Los clones VH positivos del hibridoma 1C9 se secuenciaron y ocho resultaron codificar cadenas funcionales VL. Estos ocho clones incluyen cuatro secuencias únicas que se designan como 1C9VH2-404-8_1024, 1C9VH2-405-12_1024, 1C9VH2-411-1_1024 y 1C9VH2-406-4_1024.

VH de 1J20. Los clones VH positivos del hibridoma 1J20 se secuenciaron y dos resultaron codificar cadenas funcionales VH. Estos dos clones se designaron 1J20VH1-7_0910 y 1J20VH1-1-6_0829.

VH de 1L20. Los clones VH positivos del hibridoma 1L20 se secuenciaron y tres resultaron codificar cadenas funcionales VH. Estos tres clones se designaron 1L20VH2-3_0903, 1L20VH2-1_0907 y 1L20VH2-3_0910.

VH de 1K3. Los clones VH positivos del hibridoma 1K3 se secuenciaron y cinco resultaron codificar cadenas funcionales VH. Estos cinco clones fueron designados 1K3VH6-7, 1K3VH6-8_0816, 1K3VH3-4, 1K3VH3-4 y 1K3VH3-3_0816.

VH de 1L5. Los clones VH positivos del hibridoma 1L5 se secuenciaron y nueve resultaron codificar cadenas funcionales VH. Estos nueve clones fueron designados 1L5VH003-5-8_0907, 1L5VH003-6-3_0907, 1L5VH001-7-6_0907, 1L5VH001-6-5_0907, 1L5VH001-6-11_0907, 1L5VH003-6-2_0910, 1L5VH001-6-12_0907, 1L5VH003-3-4_0907 y 1L5VH003-3-8_0907.

VHs adicionales. Las secuencias VH se obtuvieron para cuatro anticuerpos de hibridoma adicionales designados CTA5_VH, CTB11_VH, CTC2_VH, CTD2_VH.

Alineaciones de Secuencia VH Las alineaciones de todas las secuencias VH descritas arriba se muestran en la Figura 10. La figura indica la ubicación aproximada de las tres regiones CDR (negrita, subrayado) y la SEQ ID NO correspondiente a cada secuencia.

Secuencias CDR de VH Únicas. Las alineaciones de las secuencias CDR únicas de los VHs de la Figura 10 se muestran en la Figura 12. De las 43 secuencias VH, hay sólo 8 secuencias CDR1 únicas, 9 secuencias CDR2 únicas, y 10 secuencias CDR3 únicas, como se muestra en la Figura 12.

Secuencias CDR de VH de Consenso. Con base en las secuencias divulgadas en la Figura 12, así como en las características de estructura/función de los aminoácidos de ocurrencia natural, se pueden determinar las secuencias de consenso para los CDRs de VH.

Para la CDR1 VH, una secuencia de consenso es el Motivo 1 de CDR1 VH:

$X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 X_8$ (SEQ ID NO:142)

donde X_1 es G o A; X_2 es Y, F, W, D o E; X_3 es T, S, C o M; X_4 es F, Y, W, V, L, I, M o A; X_5 es T, S, C, N, o Q; X_6 es S, T, C, A o G; X_7 es Y, F, W, N, Q, G o A; y X_8 es W, A, G, Y o F. En algunas modalidades, X_1 está limitado a G; y/o X_2 está limitado a Y, F o D; y/o X_3 está limitado a T o S; y/o X_4 está limitado a F o V; y/o X_5 está limitado a T, S o N; y/o X_6 está limitado a S, T o A; y/o X_7 está limitado a Y, F, N o G; y/o X_8 está limitado a W, A o Y. En algunas modalidades, la subsecuencia $X_1 X_2 X_3$ está limitado a G Y T; y en algunas modalidades, la subsecuencia $X_1 X_2 X_3$ está limitado a G F T. Además, en algunas modalidades, la subsecuencia $X_1 X_7 X_8$ está limitado a S Y W.

Señalando en particular que la Secuencia CDR1 VH de SEQ ID NOs: 109-110 y 112 son algo distintas de las demás en la Figura 12, una secuencia de consenso alternativa es VH CDR1 Motivo 2:

$X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 X_8$ (SEQ ID NO: 143)

donde X_1 es G o A; X_2 es Y, F o W; X_3 es T, S, C o M; X_4 es F, Y o W; X_5 es T, S o C; X_6 es S, T o C; X_7 es Y, F o W; y X_8 es W. En algunas modalidades, X_1 está limitado a G; y/o X_2 está limitado a Y o F; y/o X_3 está limitado a T o S; y/o X_4 está limitado a F; y/o X_5 está limitado a T o S; y/o X_6 está limitado a S o T; y/o X_7 está limitado a Y o F; y/o X_8 está limitado a W. En algunas modalidades, la subsecuencia $X_1 X_2 X_3$ está limitado a G Y T; y en algunas modalidades, la subsecuencia $X_1 X_2 X_3$ está limitado a G F T. Además, en algunas modalidades, la subsecuencia $X_1 X_7 X_8$ está limitado a S Y W.

Para la CDR2 VH, una secuencia de consenso es el Motivo 1 de CDR2 VH:

$Y_1 Y_2 Y_3 Y_4 Y_5 Y_6 Y_7 Y_8 Y_9 Y_{10}$ (SEQ ID NO: 144)

donde Y_1 es I, L, V, M o A; Y_2 es Y, F, H, R, K, S o T; Y_3 es P, S, T, Y, F, R, K o H; Y_4 es G, A, S, T, K, R, H, D o E; Y_5 es T, S o ausente; Y_6 es R, K, H o ausente; Y_7 es N, Q, D, E, G, A o ausente; Y_8 es G, A, S, T, Y o F; Y_9 es D, E, A, G, N o Q; y Y_{10} es T, S, I, L, V, M, A, K, R o H. En algunas modalidades, Y_1 está limitado a I; y/o Y_2 está limitado a Y, H, R, K o S; y/o Y_3 está limitado a P, S, Y o R; y/o Y_4 está limitado a G, S, K o D; y/o Y_5 está limitado a T o ausente; y/o Y_6 está limitado a R o ausente; y/o Y_7 está limitado a N, D, G o ausente; y/o Y_8 está limitado a G, A, S o Y; y/o Y_9 está limitado a D, E, A o N; y/o Y_{10} está limitado a T, I o K.

Señalando en particular que la Secuencia CDR2 VH de SEQ ID NOs: 120-121 son algo distintas de las demás en la Figura 12, una secuencia de consenso alternativa es VH CDR2 Motivo 2:

$Y_1 Y_2 Y_3 Y_4 Y_5 Y_6 Y_7 Y_8 Y_9 Y_{10}$ (SEQ ID NO:145)

donde Y_1 es I, L, V, M o A; Y_2 es Y, F, H, R, K, S o T; Y_3 es P, S, T, Y o F; Y_4 es G, A, S, T, K, R o H; Y_5 es T, S o ausente; Y_6 es R, K, H o ausente; Y_7 es N, Q, D, E o ausente; Y_8 es G, A, S, T, Y o F; Y_9 es D, E, A, G, N o Q; y Y_{10} es T, S, I, L, V, M o A. En algunas modalidades, Y_1 está limitado a I; y/o Y_2 está limitado a Y, H, R o S; y/o Y_3 está limitado a P, S o Y; y/o Y_4 está limitado a G, S o K; y/o Y_5 está limitado a T o ausente; y/o Y_6 está limitado a R o ausente; y/o Y_7 está limitado a N, D o ausente; y/o Y_8 está limitado a G, A, S o Y; y/o Y_9 está limitado a D, E, A o N; y/o Y_{10} está limitado a T o I.

Para la CDR3 VH, una secuencia de consenso es el Motivo 1 de

CDR3 VH:

$Z_1 Z_2 Z_3 Z_4 Z_5 Z_6 Z_7 Z_8 Z_9 Z_{10} Z_{11} Z_{12} Z_{13} Z_{14} Z_{15}$ (SEQ ID NO:146)

donde Z_1 es A, G, V, L, I o M; Z_2 es R, K, H, C o M; Z_3 es G, A, R, K, H, S, T, Y, F, W, D, E o ausente; Z_4 es Y, F, W, N, Q, G, A, R, K, H o ausente; Z_5 es S, T, N, Q, E, D o ausente; Z_6 es D, E o ausente; Z_7 es L, I, V, M, A, S, T o ausente; Z_8 es L, I, V, M, A o ausente; Z_9 es G, A, R, K, H o ausente; Z_{10} es I, L, V, M, A, N, Q, R, K, H o ausente; Z_{11} es A, M, F, Y, W, S, T, G o ausente; Z_{12} es W, Y, F, A, G o ausente; Z_{13} es F, Y, W, G, A, M o C; Z_{14} es A, G, M, D, E, W, Y o F; y Z_{15} es Y, F, W, G, A o V. En algunas modalidades, Z_1 está limitado a A o V; y/o Z_2 está limitado a R, K o C; y/o Z_3 está limitado a G, R, S, Y, D o ausente; y/o Z_4 está limitado a Y, N, G, R o ausente; y/o Z_5 está limitado a S, N, E o ausente; y/o Z_6 está limitado a D o ausente; y/o Z_7 está limitado a L, S o ausente; y/o Z_8 está limitado a L o ausente; y/o Z_9 está limitado a G, R o ausente; y/o Z_{10} está limitado a I, N, R, L o ausente; y/o Z_{11} está limitado a A, F, S, G o ausente; y/o Z_{12} está limitado a W, Y, A o ausente; y/o Z_{13} está limitado a F, Y, G o M; y/o Z_{14} está limitado a A, D, W o Y; y/o Z_{15} está limitado a Y, F, W o G.

Aunque la materia divulgada ha sido descrita e ilustrada en las anteriores modalidades ejemplares, se entiende que la presente divulgación se ha realizado sólo a modo de ejemplo, y que numerosos cambios en los detalles de implementación de la materia divulgada pueden hacerse sin apartarse del espíritu y alcance de la materia divulgada, que sólo está limitada por las siguientes reivindicaciones.