ANTICUERPOS ANTI-PROTEÍNA DE UNIÓN AL LÍPIDO DE ADIPOCITO HUMANA (AP2) Y AGENTES DE UNIÓN AL ANTÍGENO PARA TRATAR TRASTORNOS METABÓLICOS

Campo de la Invención

Esta invención está en el área de anticuerpos anti-aP2 mejorados y agentes de unión al antígeno, y composiciones de los mismos, los cuales dirigen la chaperona lípida aP2/FABP4 (referida como "aP2") para uso en el tratamiento de trastornos tales como diabetes, obesidad, enfermedad cardiovascular, enfermedad de hígado graso, y/o cáncer, entre otros. En un aspecto, se describen tratamientos mejorados para trastornos mediados por aP2 en los cuales el suero aP2 es dirigido y la actividad biológica de aP2 es neutralizada o modulada usando anticuerpos monoclonales aP2 de baja afinidad de unión, proporcionando niveles de glucosa en suero en ayunas inferior, metabolismo de glucosa sistémica mejorado, sensibilidad a la insulina sistémica incrementada, masa grasa reducida, esteatosis hepática reducida, enfermedad cardiovascular reducida y/o un riesgo reducido de desarrollar enfermedad cardiovascular.

Antecedentes de la Invención

La proteína que se une al lípido de adipocito humana (aP2) pertenece a una familia de proteínas que se unen al lípido intracelular involucradas en el transporte y

almacenaje de lípidos (Banzszak et al., (1994) Adv. Protein Chem. 45, 89-151). La proteína aP2 está involucrada en la lipólisis y lipogénesis y ha sido indicada en enfermedades del metabolismo de energía y lípido tales como diabetes, aterosclerosis, y síndromes metabólicos. La aP2 también ha sido indicada en la integración de sistemas de respuesta metabólica e inflamatoria. (Ozcan et al., (2006) Science 313(5790):1137-40; Makowski et al., (2005) J Biol Chem. 280(13):12888-95; y Erbay et al., (2009) Nat Med. 15(12):1383-91). más recientemente, la aP2 ha sido mostrada por estar diferencialmente expresada en ciertos tumores del tejido blando tales como ciertos liposarcomas (Kashima et al., (2013) Virchows Arch. 462, 465-472).

La aP2 es altamente expresada en adipocitos y regulada por el receptor-γ activado por agonistas proliferadores de peroxisoma (PPARγ, por sus siglas en inglés), insulina, y ácidos grasos (Hertzel et al., (2000) Trends Endocrinol. Metab. 11, 175-180; Hunt et al., (1986) PNAS USA 83, 3786-3790; Melki et al., (1993) J. Lipid Res. 34, 1527-1534; Distel et al., (1992) J. Biol. Chem. 267, 5937-5941). Estudios en ratones deficientes aP2 (aP2-/-) indican la protección contra el desarrollo de resistencia a la insulina relacionada con obesidad inducida por dieta o genética y perfil lípido mejorado en tejido adiposo con niveles incrementados de C16:1n7-palmitoleato,

hepatosteatosis reducida, y control mejorado de producción de glucosa hepática y disposición de glucosa periférica (Hotamisligil et al., (1996) Science 274, 1377-1379; Uysal et al., (2000) Endocrinol. 141, 3388-3396; Cao et al., (2008) Cell 134, 933-944).

En adición, el bloqueo farmacológico o deficiencia genética de aP2 reduce tanto las lesiones ateroscleróticas tempranas como avanzadas en el modelo de ratón deficiente de apolipoproteína E (ApoE-/-) (Furuhashi et al., (2007) Nature, Jun 21;447(7147):959-65; Makowski et al., (2001) Nature Med. 7, 699-705; Layne et al., (2001) FASEB 15, 2733-2735; Boord et al., (2002) Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vas. Bio. 22, 1686-1691). Además, la deficiencia de aP2 conduce a una protección marcada contra la aterosclerosis temprana y avanzada en ratones deficientes de apolipoproteína E (ApoE -/-) (Makowski et al., (2001) Nature Med. 7, 699-705; Fu et al., (2000) J. Lipid Res. 41, 2017-2023). Por lo tanto, la aP2 juega un papel crítico en muchos aspectos del desarrollo de enfermedad metabólica en modelos preclínicos.

En las pasadas dos décadas, las funciones biológicas de FABPs en general y aP2 en particular han sido principalmente atribuidas a su acción como proteínas intracelulares. Puesto que la abundancia de la proteína aP2 en los adipocitos es extremadamente alta, representando por hasta poco porciento de la proteína celular total (Cao et

al., (2013) Cell Metab. 17(5):768-78), dirigir terapéuticamente la aP2 con procedimientos traducionales ha sido desafiante, y el éxito prometedor obtenido en modelos clínicos (Furuhashi et al., (2007) Nature 447, 959-965; Won et al., (2014) Nature Mat. 13, 1157-1164; Cai et al., (2013) Acta Pharm. Sinica 34, 1397-1402; Hoo et al., (2013) J. of Hepat. 58, 358-364) ha sido lento al progreso hacia la traducción clínica.

En adición a su presencia en el citoplasma, se ha mostrado recientemente que la aP2 es activamente secretada a partir de tejido adiposo a través de una trayectoria regulada no clásica (Cao et al., (2013) Cell Metab. 17(5), 768-778; Ertunc et al., (2015) J. Lipid Res. 56, 423-424). La forma secretada de aP2 actúa como una adipocina novedosa y regula la producción de glucosa hepática y homeostasis de glucosa sistémica en ratones en respuesta al ayuno y señales relacionadas con el ayuno. Niveles de aP2 en suero son significantemente elevados en ratones obesos, y el bloqueo de la circulación de aP2 mejora la homeostasis de glucosa en ratones con obesidad inducida por dieta (Cao et al., (2013) Cell Metab. 17(5):768-78). De manera importante, los mismos patrones también se observaron en poblaciones humanas donde los niveles de aP2 secretada son incrementados en la obesidad y fuertemente correlacionados con enfermedades metabólicas y cardiovasculares en estudios humanos independientes múltiples

(Xu et al., (2006) Clin. Chem. 53, 405-413; Yoo et al., (2011) J. Clin. Endocrin. & Metab. 96, E488-492; von Eynatten et al., (2012) Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vas. Bio. 32, 2327-2335; Suh et al., (2014) Scandinavian J. Gastro. 49, 979-985; Furuhashi et al., (2011) PloS One 6, e27356; Ishimura et al., (2013) PloS One 8, e81318; Karakas et al., (2009) Metabolism: Clinical and Experimental 58, 1002-1007; Kaess et al., (2012) J. Endocrin. & Metab. 97, E1943-1947; Cabre et al., (2007) Atherosclerosis 195, e150-158). Finalmente, los humanos que portan un alelo de haploinsuficiencia el cual resulta en la expresión reducida de aP2 son protegidos contra la diabetes y enfermedad cardiovascular (Tuncman et al., (2006) PNAS USA 103, 6970-6975; Saksi et al., (2014) Circulation, Cardiovascular Genetics 7, 588-598).

Cao et al. usa un anticuerpo policlonal de aP2 anti-conejo de ratón para mostrar una reducción en los niveles de aP2 en plasma en ratones obesos tratados con anticuerpo, lo cual ocurre sin alguna alteración en los niveles de proteína en aP2 en tejido adiposo (Cao et al., (2013) Cell Metab. 17(5): 768–778; Publicación PCT WO 2010/102171). La administración del anticuerpo en ratones obesos no altera el peso corporal, pero causa una reducción significante en los niveles de glucosa en sangre en ayunas dentro de dos semanas de tratamiento comparado con controles

tratados con un IgG pre-inmune. En una prueba de tolerancia a la glucosa, ratones que reciben el anticuerpo policlonal aP2 presentaron curvas de disposición de glucosa significantemente mejorados comparado con los animales de control.

Miao et al. reportó el uso de un anticuerpo monoclonal humano anti-aP2 de ratón de alta afinidad (identificado como mAb 2E4) para lograr la inflamación inducida por dieta alta en grasa mejorada (HFD, por sus siglas en inglés) en ratones tratados con anticuerpo que reciben una dieta alta en grasa (Miao et al., (2015) Molecular and Cellular Endocrinology 403, 1-9). El tratamiento con el mAb 2E4 de alta afinidad, sin embargo, resultó en pesos corporales drásticamente incrementados comparado con animales de control, y no se observó cambio notable en niveles de glucosa basal después de seis semanas de tratamiento. Además, el tratamiento con mAb 2E4 falló por afectar la tolerancia a la insulina inducida por HFD.

Es un un objetivo de la invención identificar nuevos compuestos, métodos, y composiciones para el tratamiento de trastornos metabólicos.

Es en particular un objetivo de la invención identificar compuestos, métodos y composiciones novedosos para la reducción de niveles de glucosa en sangre en ayunas, al mejoramiento del metabolismo de glucosa sistémica, el

mejoramiento de tolerancia a la glucosa, el incremento en sensibilidad a la insulina sistémica, la reducción en masa grasa, la reducción en lipólisis de células grasas, la reducción en la producción de glucosa hepática, la reducción en hiperinsulinemia, y/o la reducción en esteatosis hepática.

Es también un objetivo de la invención identificar nuevos compuestos, métodos, y composiciones para el tratamiento de diabetes, obesidad, y dislipidemia.

Es además un objetivo de la invención identificar nuevos compuestos, métodos, y composiciones para el tratamiento de trastornos inducidos inflamatorios, por ejemplo aterosclerosis.

Es otro objetivo de la invención identificar nuevos compuestos, métodos, y composiciones para el tratamiento de un tumor, cáncer u otros neoplasmas.

Breve Descripción de la Invención

Los anticuerpos monoclonales anti-aP2 y agentes de unión al antígeno son proporcionados que tienen actividad inesperada y superior para el tratamiento de trastornos mediados por aP2. En una modalidad, se proporcionan agentes de unión al antígeno y anticuerpos monoclonales anti-aP2 que contienen una cadena ligera o fragmento de cadena ligera que tiene una región variable, en donde tal región variable comprende una, dos, o tres regiones determinantes de complementariedad (CDRs, por sus siglas en inglés)

seleccionadas independientemente a partir de la Seq. ID No. 7, Seq. ID No. 8, y Seq. ID No. 9. En otra modalidad, se proporcionan agentes de unión al antígeno y anticuerpos monoclonales anti-aP2 que comprenden una cadena ligera o fragmento de cadena ligera que tiene una región variable, en donde tal región variable comprende una, dos, o tres CDRs seleccionadas independientemente a partir de la Seq. ID No. 10, Seq. ID No. 11, Seq. ID No. 12, Seq. ID No. 13, Seq. ID No. 597, Seq. ID No. 598, o Seq. ID No. 599. En todavía otra modalidad, se proporcionan agentes de unión al antígeno y anticuerpos monoclonales anti-aP2 que comprenden una cadena ligera o fragmento de cadena ligera que tiene una región variable, en donde tal región variable comprende una, dos, o tres CDRs seleccionadas independientemente a partir de la Seq. ID No. 7, Seq. ID No. 8 y Seq. ID No. 9, Seq. ID No. 10, Seq. ID No. 11, Seq. ID No. 12, Seq. ID No. 13, Seq. ID No. 597, Seq. ID No. 598, o Seq. ID No. 599. En una modalidad, se proporcionan agentes de unión al antígeno y anticuerpos monoclonales anti-aP2 que comprenden una cadena ligera o fragmento de cadena ligera que tiene una región variable, en donde tal región variable comprende la Seq. ID No. 7, Seq. ID. No. 8, y al menos una CDR seleccionada a partir de la Seq. ID. No. 9, Seq. ID No. 10, Seq. ID No. 11, Seq. ID No. 12, Seq. ID No. 13, Seq. ID No. 597, Seq. ID No. 598, o Seq. ID No. 599. Alternativamente, uno o más de las CDRs

seleccionadas y descritas puede ser alterada por sustitución de uno o más aminoácidos que no afectan adversamente o que mejoran las propiedades del anticuerpo o agente de unión al antígeno, como se describe además en la presente. En una modalidad, la(s) CDR(s) seleccionada(s) es/son colocadas en un armazón de inmunoglobulina humana. En una modalidad, el armazón de inmunoglobulina humana es además modificado o alterado para mantener la especificidad de afinidad de unión de la región CDR injertada.

Uno de los descubrimiento inesperado descritos en la presente es que los anticuerpos y agentes de unión al antígeno descritos no se unen fuertemente a la proteína aP2. Típicamente, anticuerpos y agentes de unión al antígeno se buscan por tener fuerte afinidad de unión (KD muy baja), como se reportó por Miao, et al. (Véase antecedente de la invención). Se ha descubierto que un anticuerpo o agente de unión al antígeno que se une a la proteína aP2 en su estado secretado (no citosólico) con una afinidad de unión más débil que tiene una KD de aproximadamente $\geq 10^{-7}$ M, tiene una capacidad mejorada para neutralizar la aP2 secretada y causar un efecto inhibidor significante en trastornos mediados por aP2. En ciertas modalidades, el anticuerpo monoclonal anti-aP2 o agente de unión al antígeno tiene una KD para aP2 humana de entre aproximadamente 10^{-4} hasta 10^{-6} M. En otros ejemplos, el anticuerpo monoclonal anti-aP2 o agente de unión

al antígeno tiene una KD para aP2 humana de aproximadamente > 500nM, por ejemplo, aproximadamente 500nM hasta aproximadamente 10µM. En otra modalidad, el anticuerpo monoclonal anti-aP2 o agente de unión al antígeno tiene una KD para aP2 humana de aproximadamente 1µM hasta aproximadamente 7µM, o 2µM hasta aproximadamente 5µM. En una modalidad alternativa, el anticuerpo monoclonal anti-aP2 tiene una baja afinidad de unión para aP2 de ratón en su forma conformacional, nativa, por ejemplo, en los intervalos especificados anteriormente.

Los inventores también han encontrado de manera sorprendente que ratones tratados con los anticuerpos descritos en la presente mantienen los niveles de aP2 de circulación total a un nivel similar a o ligeramente inferior que aquel visto en animales tratados con control. Estos hallazgos son contrario a aquellos observados, con anticuerpos de afinidad superior, que incluyen H3, donde el tratamiento de ratones con este anticuerpo de alta afinidad conduce a un incremento dramático de 10 veces en los niveles de circulación total de aP2. El incremento dramático en niveles de aP2 visto en ratones tratados con anticuerpos de alta afinidad puede ser debido a la vida útil incrementada de la proteína aP2, la cual en general tiene una vida útil corta, cuando se forma en complejo con un anticuerpo aP2 de alta afinidad.

Cuando se administra a un hospedero en necesidad del mismo, estos los anticuerpos y agentes de unión al antígeno anti-aP2 neutralizan la actividad de aP2 secretada y proporcionan niveles de glucosa en sangre en ayunas inferior, metabolismo de glucosa sistémica mejorado, sensibilidad a la insulina sistémica incrementada, masa grasa reducida, esteatosis hepática, perfiles lípidos en suero mejorados, y formación de placa aterogénica reducida en un hospedero cuando se compara con anticuerpos monoclonales anti-aP2 que tienen afinidades de unión superiores. Por lo tanto, los anticuerpos y agentes de unión al antígeno anti-aP2 descritos en la presente son particularmente útiles para tratar trastornos metabólicos que incluyen, pero no se limitan a, diabetes (tanto tipo 1 como tipo 2), hiperglicemia, obesidad, enfermedad de hígado graso, dislipidemia, síndrome de ovario poliquístico (POS, por sus siglas en inglés), un trastorno proliferativo tal como un tumor o neoplasma, (que incluye, pero no se limita a, por ejemplo, cáncer de vejiga transicional, cáncer de ovario, y liposarcoma), aterosclerosis, y otros trastornos cardiovasculares administrando una cantidad efectiva a un hospedero, típicamente un humano, en necesidad de la misma.

Sin desear ser ligado por alguna teoría, se cree que varios tejidos contribuyen a los niveles de aP2 de circulación. Por ejemplo, se cree que el tejido adiposo

contribuye a niveles de aP2 de circulación. En adición, se cree que otros tejidos, por ejemplo macrófagos, contribuyen a los niveles de circulación de aP2. En una modalidad, un hospedero es administrado con un anticuerpo anti-aP2 o agente de unión al antígeno descrito en la presente para tratar un trastorno mediado por aP2. En una modalidad, un hospedero es administrado con un anticuerpo anti-aP2 o agente de unión al antígeno descrito en la presente para tratar un trastorno mediado por aP2 en donde el trastorno es mediado por aP2 de circulación contribuido al tejido adiposo. En una modalidad, un hospedero es administrado con un anticuerpo anti-aP2 o agente de unión al antígeno descrito en la presente para tratar un trastorno mediado por aP2 en donde el trastorno es mediado por por aP2 de circulación contribuido por macrófago.

En una modalidad, el agente de unión al antígeno o anticuerpo anti-aP2 incluye al menos una CDR seleccionada a partir de las Seq. ID Nos. 7-13 o Seq. ID Nos. 597-599, y al menos una CDR seleccionada a partir de CDRH1 (Seq. ID NO. 14), CDRH1 variante 1 (Seq. ID No. 15), CDRH1 variante 2 (Seq. ID No. 600), CDRH2 (Seq. ID No. 16), CDRH2 variante 1 (Seq. ID No. 17), CDRH2 variante 2 (Seq. ID No. 18), CDRH2 variante 3 (Seq. ID No. 601), CDHR3 (Seq. ID No. 19), CDHR3 variante 1 (Seq. ID No. 20), CDRH3 variante 2 (Seq. ID No. 21), o CDRH3 variante 3 (Seq. ID No. 602), en donde las secuencias CDR son injertadas en un armazón de

inmunoglobulina humana. En una modalidad, el armazón de inmunoglobulina humana es además modificado o alterado para mantener la especificidad de afinidad de unión de la región CDR injertada.

En ciertas modalidades, el agente de unión al antígeno o anticuerpo anti-aP2 incluye al menos la secuencia variable de cadena ligera 909 gL1 (SEQ. ID No. 446), la secuencia de cadena ligera 909 gL1 VL + CL (SEQ. ID No. 447), la secuencia variable de cadena ligera 909 gL10 (Seq. ID No. 448), la secuencia de cadena ligera 909 gL10 VL + CL (SEQ. ID No. 449), la secuencia variable de cadena ligera 909 gL13 (SEQ. ID No. 487), la secuencia de cadena ligera 909 gL13 VL + CL (SEQ. ID No. 489), la secuencia variable de cadena ligera 909 gL50 (SEQ. ID No. 488), la secuencia de cadena ligera 909 gL50 VL + CL (Seq. ID No. 490), la secuencia variable de cadena ligera 909 gL54 (SEQ. ID No. 450), la secuencia de cadena ligera 909 gL54 VL + CL (SEQ. ID No. 451), la secuencia variable de cadena ligera 909 gL55 (SEQ. ID No. 452) o la secuencia de cadena ligera 909 gL55 VL + CL (SEQ. ID No. 453).

En otras modalidades, el agente de unión al antígeno o anticuerpo anti-aP2 incluye una secuencia variable de cadena ligera seleccionada a partir de 909 gL1 (SEQ. ID No. 446), 909 gL10 (SEQ. ID No. 448), 909 gL13 (SEQ. ID No. 487), 909 gL50 (SEQ. ID No. 488), 909 gL54 (SEQ. ID No. 450),

o 909 gL55 (SEQ. ID No. 452), y una secuencia variable de cadena pesada seleccionada a partir de 909 gH1 (SEQ. ID No. 455), 909 gH14 (SEQ. ID No. 457), 909 gH15 (SEQ. ID No. 459), 909 gH61 (SEQ. ID No. 461), y 909 gH62 (SEQ. ID No. 463). Por ejemplo, el anticuerpo o agente de unión al antígeno puede incluir al menos la secuencia variable de cadena ligera 909 gL1 (SEQ. ID No. 446) y la secuencia variable de cadena pesada 909 gH1 (SEQ. ID. No. 455). En una modalidad, el agente de unión al antígeno o anticuerpo anti-aP2 incluye al menos la secuencia variable de cadena ligera 909 gL10 (SEQ. ID No. 448) y la secuencia variable de cadena pesada 909 gH1 (SEQ. ID No. 455). En una modalidad, el agente de unión al antígeno o anticuerpo anti-aP2 incluye al menos la secuencia variable de cadena ligera 909 gL10 (SEQ. ID No. 448) y la secuencia variable de cadena pesada 909 gH15 (SEQ. ID No. 459). En una modalidad, el agente de unión al antígeno o anticuerpo anti-aP2 incluye al menos la secuencia variable de cadena ligera 909 gL1 (SEQ. ID No. 446) y la secuencia variable de cadena pesada 909 gH15 (SEQ. ID No. 459). En una modalidad, el agente de unión al antígeno o anticuerpo anti-aP2 incluye al menos la secuencia variable de cadena ligera 909 gL13 (SEQ. ID No. 487) y la secuencia variable de cadena pesada 909 gH1 (SEQ. ID No. 455). En una modalidad, el agente de unión al antígeno o anticuerpo anti-aP2 incluye al menos la secuencia variable de cadena ligera 909 gL13 (SEQ. ID No.

487) y la secuencia variable de cadena pesada 909 gH15 (Seq. ID No. 459). En una modalidad, el agente de unión al antígeno o anticuerpo anti-aP2 incluye al menos la secuencia variable de cadena ligera 909 gL50 (SEQ. ID No. 488) y la secuencia variable de cadena pesada 909 gH1 (SEQ. ID No. 455). En una modalidad, el agente de unión al antígeno o anticuerpo anti-aP2 incluye al menos la secuencia variable de cadena ligera 909 gL50 (SEQ. ID No. 488) y la secuencia variable de cadena pesada 909 gH15 (SEQ. ID No. 459). En una modalidad, el agente de unión al antígeno o anticuerpo anti-aP2 incluye al menos la secuencia variable de cadena ligera 909 gL54 (SEQ. ID No. 450) y la secuencia variable de cadena pesada 909 gH1 (SEQ. ID No. 455). En una modalidad, el agente de unión al antígeno o anticuerpo anti-aP2 incluye al menos la secuencia variable de cadena ligera 909 gL54 (SEQ. ID No. 450) y la secuencia variable de cadena pesada 909 gH15 (SEQ. ID No. 459). En una modalidad, el agente de unión al antígeno o anticuerpo anti-aP2 incluye al menos la secuencia variable de cadena ligera 909 gL55 (SEQ. ID No. 452) y la secuencia variable de cadena pesada 909 gH1 (SEQ. ID No. 455). En una modalidad, el agente de unión al antígeno o anticuerpo anti-aP2 incluye al menos la secuencia variable de cadena ligera 909 gL55 (SEQ. ID No. 452) y la secuencia variable de cadena pesada 909 gH15 (SEQ. ID No. 459). En una modalidad, el agente de unión al antígeno o anticuerpo anti-aP2 puede

incluir al menos la secuencia variable de cadena ligera 909 gL1 (Seq. ID No. 446) y la secuencia variable de cadena pesada 909 gH14 (Seq. ID. No. 457). En una modalidad, el agente de unión al antígeno o anticuerpo anti-aP2 incluye al menos la secuencia variable de cadena ligera 909 gL10 (Seq. ID No. 448) y la secuencia variable de cadena pesada 909 gH14 (Seq. ID No. 457). En una modalidad, el agente de unión al antígeno o anticuerpo anti-aP2 incluye al menos la secuencia variable de cadena ligera 909 gL13 (Seq. ID No. 487) y la secuencia variable de cadena pesada 909 gH14 (Seq. ID No. 457). En una modalidad, el agente de unión al antígeno o anticuerpo anti-aP2 incluye al menos la secuencia variable de cadena ligera 909 gL50 (Seq. ID No. 488) y la secuencia variable de cadena pesada 909 gH14 (Seq. ID No. 457). En una modalidad, el agente de unión al antígeno o anticuerpo anti-aP2 incluye al menos la secuencia variable de cadena ligera 909 gL54 (Seq. ID No. 450) y la secuencia variable de cadena pesada 909 gH14 (Seq. ID No. 457). En una modalidad, el agente de unión al antígeno o anticuerpo anti-aP2 incluye al menos la secuencia variable de cadena ligera 909 gL55 (Seq. ID No. 452) y la secuencia variable de cadena pesada 909 gH14 (Seq. ID No. 457). En una modalidad, el agente de unión al antígeno o anticuerpo anti-aP2 puede incluir al menos la secuencia variable de cadena ligera 909 gL1 (Seq. ID No. 446) y la secuencia variable de cadena pesada 909 gH61 (Seq. ID.

No. 461). En una modalidad, el agente de unión al antígeno o anticuerpo anti-aP2 incluye al menos la secuencia variable de cadena ligera 909 gL10 (Seq. ID No. 448) y la secuencia variable de cadena pesada 909 gH61 (Seq. ID No. 461). En una modalidad, el agente de unión al antígeno o anticuerpo anti-aP2 incluye al menos la secuencia variable de cadena ligera 909 gL13 (Seq. ID No. 487) y la secuencia variable de cadena pesada 909 gH61 (Seq. ID No. 461). En una modalidad, el agente de unión al antígeno o anticuerpo anti-aP2 incluye al menos la secuencia variable de cadena ligera 909 gL50 (Seq. ID No. 488) y la secuencia variable de cadena pesada 909 gH61 (Seq. ID No. 461). En una modalidad, el agente de unión al antígeno o anticuerpo anti-aP2 incluye al menos la secuencia variable de cadena ligera 909 gL54 (Seq. ID No. 450) y la secuencia variable de cadena pesada 909 gH61 (Seq. ID No. 461). En una modalidad, el agente de unión al antígeno o anticuerpo anti-aP2 incluye al menos la secuencia variable de cadena ligera 909 gL55 (Seq. ID No. 452) y la secuencia variable de cadena pesada 909 gH61 (Seq. ID No. 461). En una modalidad, el agente de unión al antígeno o anticuerpo anti-aP2 puede incluir al menos la secuencia variable de cadena ligera 909 gL1 (Seq. ID No. 446) y la secuencia variable de cadena pesada 909 gH62 (Seq. ID. No. 463). En una modalidad, el agente de unión al antígeno o anticuerpo anti-aP2 incluye al menos la secuencia variable de cadena ligera 909 gL10

(Seq. ID No. 448) y la secuencia variable de cadena pesada 909 gH62 (Seq. ID No. 463). En una modalidad, el agente de unión al antígeno o anticuerpo anti-aP2 incluye al menos la secuencia variable de cadena ligera 909 gL13 (Seq. ID No. 487) y la secuencia variable de cadena pesada 909 gH62 (Seq. ID No. 463). En una modalidad, el agente de unión al antígeno o anticuerpo anti-aP2 incluye al menos la secuencia variable de cadena ligera 909 gL50 (Seq. ID No. 488) y la secuencia variable de cadena pesada 909 gH62 (Seq. ID No. 463). En una modalidad, el agente de unión al antígeno o anticuerpo anti-aP2 incluye al menos la secuencia variable de cadena ligera 909 gL54 (Seq. ID No. 450) y la secuencia variable de cadena pesada 909 gH62 (Seq. ID No. 463). En una modalidad, el agente de unión al antígeno o anticuerpo anti-aP2 incluye al menos la secuencia variable de cadena ligera 909 gL55 (Seq. ID No. 452) y la secuencia variable de cadena pesada 909 gH62 (Seq. ID No. 463). Los anticuerpos monoclonales anti-aP2, y donde sea relevante los agentes de unión al antígeno, descritos en la presente que contienen las secuencias de cadena ligera variable y/o cadena pesada variable que contienen las CDRs descritas en la presente pueden comprender además dominios de región constante seleccionados habiendo considerado la función propuesta de la molécula de anticuerpo, y en particular las funciones efectoras las cuales pueden ser requeridas. Por ejemplo, los dominios de

región constante pueden ser dominios humanos IgA, IgD, IgE, IgG, o IgM. En particular, los dominios de región constante IgG humana pueden ser usados, especialmente, por ejemplo, los isotipos IgG1 e IgG3 cuando la molécula de anticuerpo está propuesta para usos terapéuticos y las funciones efectoras del anticuerpo son requeridas. Alternativamente, los isotipos IgG2 e IgG4 pueden ser usados cuando la molécula de anticuerpo está propuesta para propósitos terapéuticos y las funciones efectoras del anticuerpo no son requeridas. Se apreciará que las variantes de secuencia de estos dominios de región constante también pueden ser usadas. Por ejemplo las moléculas IgG4 en las cuales la serina en la posición 241 (IgG4P) ha sido cambiada a prolina como se describe en Angal et al., Molecular Immunology, 1993, 30 (1), 105-108, pueden ser usadas, y están contempladas en la presente.

En una modalidad, el anticuerpo ani-aP2 comprende una región VL de Conejo Ab 909 de secuencia variable de cadena ligera (Seq. ID No. 445), y además comprende opcionalmente una región VH de Conejo Ab 909 de secuencia variable de cadena pesada (Seq. ID No. 454).

En una modalidad, se describe un anticuerpo anti-aP2 monoclonal de baja afinidad de unión a CA33, un anticuerpo monoclonal anti-aP2 híbrido de conejo-ratón, el cual incluye VH (Seq. ID No. 454) y 909 VL (Seq. ID No. 445) de Conejo 909, que disminuye los niveles de glucosa en sangre

en ayunas, mejora el metabolismo de glucosa sistémica, incrementa la sensibilidad de insulina sistémica, y reduce la masa grasa y esteatosis hepática en ratones obesos.

Se ha encontrado que el CA33 se une a tanto aP2 libre de lípido y unido al lípido a afinidades similares (véase Figuras 2H y 2I, respectivamente). Estos datos sugieren que la eficacia de CA33 no es mediada por su unión solamente a apo-aP2 o solamente a moléculas aP2 que llevan un lípido específico. También se ha encontrado que el epítopo de CA33 no se traslapa con la región bisagra (la cual contiene E15, N16, y F17) y no parece que la unión a CA33 altera el acceso del ligando al paquete hidrofóbico de aP2. En efecto, a pH neutral, la unión de ácido paranárico a aP2 es similar en la presencia o ausencia de CA33, apoyando la conclusión de que la unión del anticuerpo a aP2 no bloquea la unión del lípido total (Véase Figura 2G).

Además, se ha descubierto que el tratamiento de aP2 exógeno conduce a la disociación de un holocomplejo transcripcional novedoso compuesto de la proteína O1 de la caja Forkhead (cabeza de tenedor) (FoxO1) y la proteína 2 de unión terminal C corepresora transcripcional (CtBP2) en hepatocitos, conduciendo a la expresión de genes gluconeogénicos. *In vivo*, la interacción FoxO1/CtBP2 es fácilmente detectable en el hígado de ratones flacos, pero reduce marcadamente en el contexto de obesidad, un ajuste en

el cual el nivel de aP2 de circulación es marcadamente incrementado. Se mostró aquí que la administración de aP2 recombinante reduce la interacción FoxO1/CtBP2 mientras la interacción incrementa en el ajuste de deficiencia genética aP2 y neutralización mediada por el anticuerpo. Se ha mostrado además aquí, que la sobreexpresión de CtBP2 en el hígado de ratones obesos alivia dramáticamente la intolerancia a la glucosa así como también la esteatosis hepática a través de la represión de la expresión del gen gluconeogénico y lipogénico. En una modalidad de la invención, un anticuerpo anti-aP2 es administrado para el tratamiento de un trastorno en un hospedero, que incluye un humano, asociado con la administración de la trayectoria FoxO1/CtBP2. En una modalidad, se describen tratamientos mejorados para trastornos mediados por FoxO1 o trastornos mediados por CtBP2 en los cuales la aP2 en suero es dirigida y la actividad biológica de aP2 es neutralizada o modulada usando un anticuerpo monoclonal aP2 de baja afinidad de unión descrito en la presente, en donde el nivel de expresión de uno o más genes regulados con FoxO1 o regulados con CtBP2 se reduce. En una modalidad, se proporciona en la presente un método para modular la expresión de un gen regulado por FoxO1 y/o CtBP2 que comprende administrar a un hospedero un anticuerpo monoclonal aP2 de baja afinidad de unión descrito en la presente. *Véase* Jack et al. "C-terminal binding

protein: A metabolic sensor implicated in regulating adipogenesis." Int J Biochem Cell Biol. 2011 Mayo; 43(5):693-6; Vernochet C, et al. "C/EBPalpha and the corepressors CtBP1 and CtBP2 regulate repression of select visceral white adipose genes during induction of the brown phenotype in white adipocytes by peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists." Mol Cell Biol. 2009 Sep;29(17):4714-28; Kajimura, S. et al. "Regulation of the brown and white fat gene programs through a PRDM16/CtBP transcriptional complex." Genes Dev. 2008 May 15;22 (10):1397-409.

Los agentes de unión al antígeno pueden estar en cualquier forma que proporcionan los resultados deseados. Como ejemplos no limitantes, la forma del agente de unión puede incluir un fragmento de cadena única, fragmento Fab, fragmento Fab', fragmento F(ab')2, un scFv, un scAb, cadena ligera de dominio único, cadena pesada de dominio único, un agente de unión al antígeno sintético que incluye una porción enlazante que se origina naturalmente o que no se origina naturalmente entre dos o más fragmentos (por ejemplo un compuesto que enlaza dos o más de las CDRs de cadena ligera descritas en la presente o una variante del mismo con una o más sustituciones de aminoácido), un agente de unión al antígeno conjugado para suministro dirigido, así como también cualquier péptido obtenido a partir de, o derivado de tal

anticuerpo.

En un aspecto, la presente invención proporciona un polinucleótido, tal como ADN, que codifica un anticuerpo o fragmento como se describe en la presente, por ejemplo como se proporciona en la Tabla 12. También se proporciona una célula hospedera que comprende tal polinucleótido.

Específicamente, la invención incluye administrar una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-aP2 descrito en la presente, o una composición farmacéuticamente aceptable del mismo, capaz de reducir la actividad de aP2 secretada (es decir, aP2 extracelular) en un fluido corporal de un hospedero, por ejemplo, sangre o suero, el cual resulta en la atenuación de la severidad de, por ejemplo, trastornos mediados por aP2, que incluyen pero no se limitan a un trastorno o síntoma metabólico, cardiovascular, inflamatorio, hepático o neoplásico.

En un aspecto de la invención, el anticuerpo monoclonal anti-aP2 purificado o agente de unión al antígeno se une a una proteína aP2 humana (Seq. ID. No. 1) con un patrón único de puntos de contacto dentro de 3-4 Angströms.

En una modalidad, el anticuerpo monoclonal anti-aP2 se une a aP2 humana que tiene la secuencia de aminoácido:

MCDAFVGTW**K** **LVS**SENFDDY MKEVGVGFAT RKVAGM**AK**PN MIISVNGDVI TIKSES**T**FKN

TEISFILGQE FDEVTADDRK VKSTITLDGG VLVHVQKWDG

KSTTIKRKRE DDKLVVECVM

KGVTSTRVY**E** R**A** (Seq. ID No. 1),

o una variante de la misma que se origina naturalmente. En una modalidad alternativa, el anticuerpo monoclonal anti-aP2 se une a una proteína aP2 humana que tiene una secuencia de aminoácido que es al menos 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntica a la Seq. ID No. 1. En una modalidad, el anticuerpo monoclonal anti-aP2 se une a una proteína aP2 humana que tiene una secuencia de aminoácido que tiene una o más (por ejemplo 1, 2, 3 o 4) sustituciones, adiciones y/o supresiones de aminoácido comparadas con la Seq. ID No. 1.

En una modalidad, el anticuerpo monoclonal anti-aP2 o agente de unión al antígeno se une a un epítopo seleccionado a partir de una secuencia de aminoácido subrayada en la Seq. ID No. 1 anterior. En una modalidad, el anticuerpo monoclonal anti-aP2 interactúa directamente con uno o más, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9, aminoácidos en negrita en la Seq. ID No. 1 anterior. En un ejemplo, el anticuerpo monoclonal anti-aP2 o agente de unión al antígeno se une a un epítopo de la proteína aP2 humana que comprende al menos uno, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más, de los aminoácidos 9-17, aminoácidos 20-28, o aminoácidos 118-132 de la Seq. ID No. 1, y opcionalmente tiene una kD de al menos aproximadamente $\geq 10^{-7}$ M.

En otro ejemplo, el anticuerpo monoclonal anti-aP2 o agente de unión al antígeno del mismo se une a un epítopo de aP2 humana que comprende uno o más, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9 o más, residuos de aminoácido seleccionados a partir de 10K, 11L, 12V, 13S, 37A, 38K, 57T, 130E, 132A (en negrita en la Seq. ID No. 1, anterior), o un residuo de aminoácido dentro de aproximadamente 4 angströms de cualquiera de 10K, 11L, 12V, 13S, 37A, 38K, 57T, 130E, y 132A, opcionalmente con una KD para aP2 secretada de aproximadamente $\geq 10^{-7}$ M.

En una modalidad, la cadena ligera del anticuerpo se une a un epítopo de aP2 humana que comprende uno o más, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9 o más, residuos de aminoácido seleccionados a partir de 10K, 11L, 12V, 13S, 37A, 38K, 57T, 130E, o 132A, o un residuo de aminoácido dentro de aproximadamente 4 angströms del mismo. En una modalidad, la cadena ligera del anticuerpo se une a un epítopo de aP2 humana que comprende uno o más, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9 o más, residuos de aminoácido seleccionados a partir de 10K, 11L, 12V, 13S, 37A, 38K, 57T, 130E, o 132A, o un residuo de aminoácido dentro de aproximadamente 4 angströms del mismo, y tiene una kD de al menos aproximadamente $\geq 10^{-7}$ M.

En una modalidad, el anticuerpo monoclonal anti-aP2 o agente de unión al antígeno se une a aP2 solamente a

través, o principalmente a través de, CDRs de cadena ligera. En una modalidad alternativa, el anticuerpo monoclonal anti-aP2 o agente de unión al antígeno tiene CDRs de cadena ligera que se unen a aP2 con una mayor afinidad que sus CDRs de cadena pesada que se unen a aP2. Como un ejemplo, el anticuerpo o agente de unión al antígeno específicamente se une a aP2, y no se une específicamente a FABP5/Mal1.

Se proporcionan en la presente métodos para producir anticuerpos y agentes de unión al antígeno anti-aP2 descritos, así como también métodos para conjugar el anticuerpo o fragmento a un polímero, tal como PEG.

La presente descripción también incluye composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad efectiva de uno de los anticuerpos anti-aP2 y/o agentes de unión al antígeno en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable. El anticuerpo monoclonal anti-aP2 o agente de unión al antígeno puede ser administrado al hospedero por cualquier ruta deseada, que incluye vía intravenosa, sistémica, transdermal tópica, sublingual, bucal, oral, intra-oral, tópica, intranasal, intraocular, o inhalación. En una modalidad, el anticuerpo monoclonal anti-aP2 o agente de unión al antígeno es administrado al hospedero mediante suministro de liberación controlada.

Se presenta método para prevenir o atenuar la severidad de un trastorno mediado por aP2 en un hospedero,

tal como un human, que incluye administrar una cantidad efectiva de un anticuerpo humanizado, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal anti-aP2 o agente de unión al antígeno descritos en la presente, que resulta en la reducción o atenuación de la actividad biológica de aP2 secretada. Ejemplos no limitantes de usos de los anticuerpos y agentes de unión al antígeno anti-aP2 descritos administrando una cantidad efectiva a un hospedero en necesidad del mismo incluyen, una o una combinación de:

(i) Reducción de colesterol total;

(ii) Reducción de lipoproteína de alta densidad (HDL, por sus siglas en inglés), lipoproteína de baja densidad (LDL), lipoproteína de muy baja densidad (VLDL), y/o triglicéridos;

(iii) Reducción de niveles de glucosa en sangre en ayunas;

(iv) Reducción de niveles de masa grasa;

(v) Reducción de producción de glucosa hepática;

(vi) Reducción de lipólisis de células grasas;

(vii) Reducción de

hiperinsulinemia;

(viii) Reducción de esteatosis hepática;

(ix) Mejoramiento en el metabolismo de la glucosa;

(x) Incremento en la sensibilidad de la insulina; y/o,

(xi) Prevención de muerte, disfunción o pérdida de células-β de isletas.

Otras características y ventajas de la invención llegarán a ser aparentes a partir de la siguiente descripción detallada y reivindicaciones

.

Breve Descripción de las Figuras

Las Figuras 1A-8C se discuten además en el Ejemplo 1 abajo.

La Figura 1A es una tabla que lista las afinidades de unión (KD(M)) de anticuerpos monoclonales anti-aP2 (CA33, CA13, CA15, CA23, y H3) a aP2 humana y de ratón como se determina por análisis de interacción biomolecular, usando un sistema Biacore T200.

La Figura 1B es un esquema que describe el diseño de estudio *in vivo* y régimen de anticuerpo para el tratamiento de ratones obesos (alimentados con una dieta alta

en grasa (HFD)) con vehículo o anticuerpos anti-aP2. Los ratones (21 semanas de edad) se alimentaron HFD por 15 semanas previo a la administración del anticuerpo (n=10 para cada grupo). Los anticuerpos anti-aP2 se administraron por inyección subcutánea a una concentración de 33 mg/kg, dos veces por semana.

La Figura 1C es una gráfica de barras que muestra los niveles de insulina en plasma (ng/ml) en la semana 0 (barras abiertas) o semana 4 (barras sólidas) en ratones tratados con vehículo o anticuerpos monoclonales anti-aP2 CA33, CA13, CA15, CA23, o H3. * $p < 0.05$.

La Figura 1D es una gráfica de barras que muestra los niveles de glucosa en sangre (mg/dl) en la semana 0 (barras abiertas) o semana 4 (barras sólidas) en ratones obesos en una dieta alta en grasa (HFD) tratados con vehículo o anticuerpos monoclonales anti-aP2 CA33, CA13, CA15, CA23, o H3. Los niveles de glucosa en sangre se midieron después de 6 horas de extracción de alimento durante el día. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

La Figura 1E es una gráfica de línea que muestra los niveles de glucosa (mg/dl) contra el tiempo (minutos) durante una prueba de tolerancia a la glucosa (GTT). La prueba se realizó después de 2 semanas de tratamiento en ratones obesos en HFD con vehículo (rombos) o anticuerpos monoclonales anti-aP2 (0.75g/kg de glucosa)(CA33;

cuadrados)(CA15; triángulos). * $p < 0.05$.

La Figura 1F es una gráfica de línea que muestra los niveles de insulina (mg/dl) contra el tiempo (minutos) durante una prueba de tolerancia a la insulina (ITT). Esta prueba se realizó después de 3 semanas de tratamiento en ratones obesos en HFD con vehículo (rombos) o anticuerpos monoclonales anti-aP2 (0.75 IU/kg de insulina) (CA33; cuadrados) (CA15; triángulos). ** $p < 0.01$.

La Figura 1G es una gráfica de barras que muestra el peso corporal (g) en la semana 0 (barras abiertas) o semana 4 (barras sólidas) en ratones tratados con vehículo o anticuerpos monoclonales anti-aP2 CA33, CA13, CA15, CA23, o H3. El peso se midió en el estado alimentado. * $p < 0.05$.

La Figura 2A es una gráfica de barras de la interacción de señal (nm) como se determina por análisis del octeto para los anticuerpos anti-aP2 CA33 y H3 contra aP2 (barras negras) comparado con las proteínas relacionadas FABP3 (barras grises) y FABP5/Mal1 (barras ligeramente grises).

La Figura 2B es una gráfica de barras de niveles de aP2 en plasma (ng/ml) como se determina por ELISA en ratones alimentados con HFD tratados con vehículo, CA33, o H3 por 3 semanas (n=10 ratones por grupo). Los ratones han estado en HFD por 12 semanas antes de que se iniciara el experimento. Un manchado Western para detectar aP2 en suero a partir de

tres ratones de cada grupo (vehículo, CA33, o H3) se muestra en el recuadro. ** $p < 0.01$.

La Figura 2C es una tabla de bloqueo cruzado de anticuerpo de H3 contra CA33, CA13, CA15, y CA23 como se determina por análisis Biacore. ++ = bloqueo completo; + = bloqueo parcial; - = sin bloqueo cruzado.

La Figura 2D muestra la secuencia de epítopo de residuos aP2 involucrados en la interacción con CA33 y H3, como se identifica por espectrometría de masas de intercambio de hidrógeno-deuterio (HDX). Los residuos que interactúan están subrayados. La interacción indicada de CA33 primero con la hélice alfa y la primera lámina beta de aP2 en residuos 9-17, 20-28 y 118-132 de la Seq ID. No. 2, los cuales parcialmente son traslapados con los residuos 21-41 de aP2 de la Seq. ID. No. 2 identificado por H3.

La Figura 2E es una imagen superimpuesta del Fab de CA33 co-cristalizado con aP2 y el Fab de H3 co-cristalizado con aP2.

La Figura 2F es un mapeo de alta resolución de epítopo CA33 en aP2. Los residuos que interactúan en ambas moléculas están indicados. Se muestran enlaces de hidrógeno como líneas punteadas. La cadena lateral de K10 en aP2 forma una interacción hidrofóbica con la cadena lateral de fenilo de Y92.

La Figura 2G es una gráfica de línea que muestra el

ácido paranárico que se une a aP2 (fluorescencia relativa) contra pH en la presencia de anticuerpo de control IgG (círculos) o anticuerpo CA33 (cuadrados).

La Figura 2H es una gráfica que muestra la unión de CA33 a aP2 (unidades de resonancia) contra el tiempo (segundos) en respuesta a concentraciones incrementadas de aP2 cargado con lípido.

La Figura 2I es una gráfica que muestra la unión de CA33 a aP2 (unidades de resonancia) contra el tiempo (segundos) en respuesta a concentraciones incrementadas de aP2 deslipidado.

La Figura 3A es una gráfica de barras que muestra la glucosa en sangre en ayunas (mg/dl) en ratones aP2-/- obesos inducidos con HFD antes de (barras abiertas) y después del tratamiento con vehículo o anticuerpo CA33 por tres semanas (barras sólidas).

La Figura 3B es una gráfica de barras que muestra el peso corporal (g) en ratones aP2-/- obesos inducidos con HFD antes de (barras abiertas) y después del tratamiento con vehículo o anticuerpo CA33 por tres semanas (barras sólidas).

La Figura 3C es una gráfica de línea que muestra los niveles de glucosa (mg/dl) en ratones aP2-/- obesos inducidos con HFD contra el tiempo (minutos) durante una prueba de tolerancia a la glucosa (GTT). La prueba se realizó después de 2 semanas de tratamiento de vehículo (triángulos)

o anticuerpo CA33 (cuadrados) en ratones aP2-/-.

La Figura 3D es una gráfica de barras que muestra el peso corporal (g) en ratones ob/ob antes de (barras abiertas) y después de (barras sólidas) 3 semanas de tratamiento con vehículo o anticuerpo CA33 (n=10 ratones por grupo). ** $p < 0.01$.

La Figura 3E es una gráfica de barras que muestra los niveles de glucosa en sangre en ayunas (mg/dl) en ratones ob/ob antes de (barras abiertas) y después de (barras sólidas) 3 semanas de tratamiento con vehículo o anticuerpo CA33 (n=10 ratones por grupo). ** $p < 0.01$.

La Figura 3F es una gráfica de barras que muestra los niveles de insulina en plasma (ng/ml) en ratones ob/ob después de tres semanas de tratamiento con vehículo (barra abierta) o anticuerpo CA33 (barra sólida). ** $p < 0.01$.

La Figura 3G es una gráfica de línea que muestra los niveles de glucosa (mg/dl) en ratones ob/ob contra el tiempo (minutos) durante una prueba de tolerancia a la glucosa (GTT). La prueba se realizó después de 2 semanas de tratamiento de vehículo (triángulos) o anticuerpo CA33 (cuadrados) en ratones aP2-/-. * $p < 0.05$.

La Figura 4A es una imagen representativa de ígado teñido con hemtoxilina y eosina (HyE) a partir de ratones obesos inducidos con HFD después de 5 semanas de tratamiento con vehículo o CA33. La barra de escala es 50μm.

La Figura 4B es una gráfica de barras de contenido de triglicéridos en hígado (TG) (mg/g de tejido) en ratones obesos inducidos con HFD después de 5 semanas de tratamiento con vehículo (barra abierta) o anticuerpo CA33 (barra sólida). * $p < 0.05$.

La Figura 4C es una gráfica de barras que muestra la expresión de mARN de estearoil-CoA desaturasa de genes lipogénicos (Scd1), sintasa de ácido graso (Fasn) y acetil-CoA carboxilasa (Acc1) en muestras hepáticas a partir de ratones obesos inducidos con HFD después de 5 semanas de vehículo (barras negras) o tratamiento con CA33 (barras grises). ** $p < 0.01$.

La Figura 4D es una gráfica de barras que muestra los niveles de ácido graso no esterificado en plasma (NEFA) (mg/ml) en ratones obesos inducidos con HFD después de 5 semanas de vehículo (barra abierta) o tratamiento con CA33 (barra sólida). ** $p < 0.01$.

La Figura 4E es una gráfica de barras que muestra los niveles de glicerol en plasma (mg/ml) en ratones obesos inducidos con HFD después de 5 semanas de vehículo (barra abierta) o tratamiento con CA33 (barra sólida). * $p < 0.05$.

La Figura 4F es una gráfica de barras que muestra los niveles de colesterol total en plasma (mg/dl) en ratones obesos inducidos con HFD después de 5 semanas de vehículo (barra abierta) o tratamiento con CA33 (barra sólida).* $p <$

0.05.

La Figura 4G es una gráfica de barras que muestra los niveles de triglicéridos en plasma (mg/dl) en ratones obesos inducidos con HFD después de 5 semanas de vehículo (barra abierta) o tratamiento con CA33 (barra sólida).

La Figura 4H es una gráfica de barras que muestra los niveles de FABP3 o FABP5 en plasma (Mal1) (ng/ml) en ratones obesos inducidos con HFD después de 5 semanas de vehículo (barra abierta) o tratamiento con CA33 (barra sólida).

La Figura 4I es una gráfica de barras que muestra los niveles de glucagón en plasma (pg/ml) en ratones obesos inducidos con HFD después de 5 semanas de vehículo (barra abierta) o tratamiento con CA33 (barra sólida).

La Figura 4J es una gráfica de barras que muestra los niveles de adiponectina en plasma (µg/ml) en ratones obesos inducidos con HFD después de 5 semanas de vehículo (barra abierta) o tratamiento con CA33 (barra sólida).

La Figura 5A es una gráfica de barras de masa grasa corporal (g) (barra abierta) y masa magra (g) (barra gris) como se determina por absorsiometría de rayos-X de energía dual (DEXA) después de 5 semanas de vehículo o tratamiento con CA33. (n=10 por grupo). * $p < 0.05$.

La Figura 5B es una gráfica de barras que muestra el peso del hígado (g) y % de peso corporal de ratones obesos

después de 5 semanas de vehículo (barras abiertas) o tratamiento con CA33 (barras sólidas). ** $p < 0.01$.

La Figura 5C es una gráfica de barras que muestra la actividad física (unidades de actividad – AU) para ratones en la luz o en la oscuridad después de 5 semanas de vehículo (barras abiertas) o tratamiento con CA33 (barras sólidas).

La Figura 5D es una gráfica de barras que muestra ingesta total de alimento (g) en ratones obesos después de 5 semanas de vehículo (barra abierta) o ratones tratados con CA33 (barra sólida) en HFD (n=8 por grupo).

La Figura 5E es una gráfica de barras que muestra las concentraciones de VO2 por volumen durante los periodos de luz y oscuridad en ratones tratados con CA33 (barra sólida) por ocho semanas comparado con el vehículo (barra abierta).

La Figura 5F es una gráfica de barras que muestra la relación de intercambio respiratorio calculada (RER) durante periodos de luz y oscuridad en ratones tratados con CA33 (barra sólida) por ocho semanas comparado con el vehículo (barra abierta).

La Figura 5G es una gráfica de barras que muestra el peso del tejido adiposo marrón (BAT) en ratones tratados con CA33 (barra sólida) por ocho semanas comparado con el vehículo (barra abierta).

La Figura 5H muestra secciones teñidas de HyE

representativas de BAT en ratones después del tratamiento con CA33 (barra sólida) por ocho semanas comparado con el vehículo (barra abierta).

La Figura 5I es una gráfica de barras que muestra el peso del tejido adiposo blanco perigonadal (PGWAT) en ratones obesos después de 5 semanas de vehículo (barra abierta) o ratones tratados con CA33 (barra sólida). ** $p < 0.01$.

La Figura 5J es una imagen representativa de tejido adiposo epididimal teñido con hematoxilina y eosina (HyE) después de 5 semanas de tratamiento con vehículo (imagen izquierda) o CA33 (imagen derecha). La barra de escala es 200μm.

La Figura 5K es una gráfica de barras que muestra células F4/80+ Mac (%) en tejido adiposo determinado por FACS después de 5 semanas de vehículo (barra abierta) o ratones tratados con CA33 (barra sólida).

La Figura 5L es una gráfica de barras que muestra células CD11b+ (%) en tejido adiposo determinado por análisis de FACS después de 5 semanas de vehículo (barra abierta) o ratones tratados con CA33 (barra sólida).

La Figura 5M es una gráfica de barras que muestra niveles de mARN (mRNA/Tbp) para TNF, IL-1β, IL-6, CCL2, CXCL1, F4/80 o CD68 en tejido adiposo blanco perigonadal (PG-WAT) después de 5 semanas de vehículo (barra abierta) o

ratones tratados con CA33 (barra sólida).

La Figura 5N es un manchado Western que muestra los niveles de proteína aP2/FABP4 en tejido adiposo en ratones tratados con vehículo o CA33 por 3 semanas. Las muestras de tejido adiposo de animales aP2-/-, mal1-/-, y aP2/mal1-/- se incluyeron como controles de proteína. β-tubulina se muestra como un control de carga.

La Figura 5O es un manchado Western que muestra los niveles de proteína Mal1/FABP5 del tejido adiposo en ratones tratados con vehículo o CA33 por 3 semanas. Las muestras de tejido adiposo a partir de animales aP2-/-, mal1-/-, y aP2/mal1-/- se incluyeron como proteínas de control. La β-tubulina se mostró como un control de carga.

La Figura 5P es una gráfica de barras de niveles de proteína relativos para ya sea aP2 o mal1 en ratones tratados con vehículo o CA33 por 3 semanas. Los resultados mostrados en la Figura 5P cuantifican los manchados Western mostrados en las Figuras 5N y 5O.

La Figura 6A es una gráfica de barras que muestra la expresión de mARN de fosfoenolpiruvato carboxilasa 1 (Pick1) y glucosa-6-fosfatasa (G6pc) de genes gluconeogénicos. Se recolectaron muestras hepáticas después de 6 horas de extracción de alimento durante el día a partir de ratones obesos tratados con vehículo (barras abiertas) o CA33 (barras sólidas) (n=10 para cada grupo) por 4 semanas. *

$p < 0.05$.

La Figura 6B es una gráfica de barras que muestra la actividad enzimática de Pck1 (nM/min/g) en muestras hepáticas. Se recolectaron muestras hepáticas después de 6 horas de extracción de alimento durante el día a partir de ratones obesos tratados con vehículo (barras abiertas) o CA33 (barras sólidas) (n=10 para cada grupo) por 4 semanas. * $p < 0.05$.

La Figura 6C es una gráfica de barras que muestra la actividad enzimática de glucosa-6-fosfatasa (G6pc) (U/mg) en fracción microsomal hepática para ratones tratados con vehículo (barras abiertas) o CA33 (barras sólidas) (n=10 para cada grupo) por cuatro semanas. * $p < 0.05$.

La Figura 6D es una gráfica de línea que muestra la glucosa en sangre (mg/dl) contra el tiempo durante el pinzamiento hiperinsulinémico-euglucémico. Se realizaron estudios de pinzamiento en ratones obesos en una dieta alta en grasa (HFD) después de cinco semanas de tratamiento con vehículo (rombos) o CA33 (cuadrados) (n=7 para cada grupo).

La Figura 6E es una gráfica de barras que muestra la velocidad de infusión de glucosa (GIR) (mg/kg/min) en ratones obesos en una dieta alta en grasa (HFD) después de cinco semanas de tratamiento con vehículo (barra abierta) o CA33 (barra sólida). * $p < 0.05$.

La Figura 6F es una gráfica de barras que muestra

el pinzamiento en la producción de glucosa hepática (c-HGP) (mg/kg/min) en ratones obesos en una dieta alta en grasa (HFD) después de cinco semanas de tratamiento con vehículo (barra abierta) o CA33 (barra sólida).* $p < 0.05$.

La Figura 6G es una gráfica de barras que muestra el índice de desaparición de glucosa corporal total (RD) (mg/kg/min) en ratones obesos en una dieta alta en grasa (HFD) después de cinco semanas de tratamiento con vehículo (barra abierta) o CA33 (barra sólida). * $p < 0.05$.

La Figura 6H es una gráfica de barras que muestra la absorción de glucosa en músculo del trípcep sural (mg/kg/min) en ratones obesos en HFD después de cinco semanas de tratamiento con vehículo (barra abierta) o CA33 (barra sólida). * $p < 0.05$.

La Figura 6I es una gráfica de barras que muestra la glicólisis en sangre total en ratones obesos en una dieta alta en grasa (HFD) después de cinco semanas de tratamiento con vehículo (barra abierta) o CA33 (barra sólida). * $p < 0.05$.

La Figura 7A es una gráfica de línea que muestra los niveles de glucosa (mg/dl) contra el tiempo (minutos) en una prueba de tolerancia a la glucosa (GTT) después de dos semanas de tratamiento de anticuerpo selectivo usando anticuerpos de alta afinidad (CA13, CA15, CA23, y H3) versus vehículo control.

La Figura 7B es una gráfica de línea que muestra los niveles de glucosa (mg/dl) contra el tiempo (minutos) en una prueba de tolerancia a la insulina (ITT) después de tres semanas de tratamiento de anticuerpo selectivo usando anticuerpos de alta afinidad (CA13, CA15, CA23, y H3) contra el vehículo control.

La Figura 8A es una gráfica de barras que muestra la producción de glucosa hepática basal (mg/kg/min) en ratones tratados con control de vehículo (barra abierta) o CA33 (barra sólida) durante el pinzamiento hiperinsulinémico-euglucémico de ratones con HFD.

La Figura 8B es una gráfica de barras que muestra los niveles de insulina en suero (ng/ml) ratones CA33 (barras sólidas) o ratón con control de vehículo (barras abiertas) durante el pinzamiento hiperinsulinémico-euglucémico de ratones con HFD. ** $p < 0.01$.

La Figura 8C es una gráfica de barras que muestra la absorción de glucosa (mg/kg/min) en tejido adiposo blanco gonadal (GWAT) en ratones tratados con vehículo de control (barra abierta) o CA33 (barra sólida) durante el pinzamiento hiperinsulinémico-euglucémico de ratones con HFD.

Las Figuras 9-16 se discuten además en el Ejemplo 2 abajo.

La Figura 9 es una gráfica lineal que ilustra la incidencia de diabetes (%) contra el tiempo (semanas de

tratamiento) en el modelo de ratón NOD para Diabetes Tipo 1. Ratones NOD fueron tratados con vehículo (rombos) o el anticuerpo monoclonal aP2 CA33 (cuadrados).

La Figura 10A es una gráfica lineal que ilustra el índice de muerte (%) contra el tiempo (semanas de tratamiento) en el modelo de ratón NOD para Diabetes Tipo 1. Ratones NOD fueron tratados con vehículo (rombos) o el anticuerpo monoclonal aP2 CA33 (cuadrados).

La Figura 10B es una gráfica de barras que ilustra el nivel de glucosa en sangre (mg/dL) en ratones NOD tratados con PBS o tratados con anticuerpo aP2 después de un ayuno de 6 horas.

La Figura 10C es una gráfica lineal que ilustra el nivel de insulina (ng/mL) en ratones NOD tratados con PBS o tratados con anticuerpo aP2 después de un ayuno de 6 horas.

Las Figuras 11A y 11B muestran Ratones NOD $aP2^{+/+}$ y NOD $aP2^{-/-}$ se sometieron a la prueba de tolerancia a la glucosa (GTT) (Figura 11A) y prueba de tolerancia a la insulina (ITT) (Figura 11B).

La Figura 12A es una gráfica de barras que muestra secreción de insulina (ADN ng/ml/ug) a partir de isletas de ratón NOD $aP2^{+/+}$ y NOD $aP2^{-/-}$ después de la estimulación con ya sea baja o alta glucosa.

Las Figuras 12B y 12C ilustran gráficas de barras que muestran el contenido de insulina total (ADN ng/ml/ug) a

partir de isletas aisladas de ratones de cuatro (Figura 12B) y siete (Figura 12C) semanas de edad NOD $aP2^{+/+}$ (barra izquierda) y NOD $aP2^{-/-}$ (barra derecha).

La Figura 13 ilustra el número de isletas visibles en ratones NOD $aP2^{-/-}$ comparado con ratones NOD $aP2^{+/+}$ después de la disección pancreática.

Las Figuras 14A y 14B ilustran células beta teñidas (Figura 14A), las cuales fueron subsecuentemente cuantificadas (Figura 14B) en ratones NOD $aP2^{+/+}$ y NOD $aP2^{-/-}$.

Las Figuras 15A-15C ilustran gráficas de barras que muestran la secreción de insulina estimulada por glucosa (ADN ng/ml/ug) a partir de ya sea una línea de células beta de insulinoma de rata (INS1) (Figura 15A), ratones c57b/6 deficientes de aP2 (Isletas de Ratón) (Figura 15B), o isletas humanas (Figura 15C) después de la estimulación con ya sea baja o alta glucosa.

La Figura 15D ilustra que la aP2 es tomada en Isletas de Ratón después de 20 minutos de tratamiento con 10 ug/ml aP2 (n=5).

Las Figuras 15E y 15F son gráficas de barras que muestran la secreción de insulina (ADN ng/ml/ug) después del tratamiento de aP2 por 24 hrs bajo condiciones “ayunadas” a partir de ya sea células beta INS1 (Figura 15E) o isletas primarias aisladas a partir de ratones $aP2^{-/-}$ (Figura 15F) después de la estimulación con ya sea baja o alta glucosa.

La Figura 16 es un diagrama de un modelo inducible de diabetes Tipo 1 en ratones (promotor en insulina de rata – virus de coriomeningitis linfocítica – glicoproteína, o RIP-LCMV-GP, ratones). Los ratones se inyectaron con LCMV, lo cual conduce a destrucción de células β y al desarrollo de diabetes.

La Figura 17 es un esquema que muestra un esquema de administración de anticuerpo aP2 en un modelo de ratón inducido con diabetes Tipo 1 (Ratones RIP-LCMV-GP) en un grupo de aP2-/- (Grupo C) y ratones aP2-normales inyectados dos veces semanalmente con ya sea 33 mg/kg de CA33 (Grupo B) o control de PBS (Grupo A) y alimentados con una dieta de alimento normal.

La Figura 18 es una gráfica de línea que muestra las mediciones de glucosa en sangre en ayunas de 6 horas (mg/dl) contra el tiempo (días) en un modelo de ratón inducido con diabetes Tipo 1 (Ratones RIP-LCMV-GP) en un grupo de aP2-/- (triángulos) y ratones aP2-normales inyectados dos veces semanalmente con ya sea 33 mg/kg de CA33 (cuadrados) o control (PBS) (círculos) y alimentados con una dieta de alimento normal. Animales tratados con CA33 y deficientes de aP2 tienen glucosa en sangre significantemente inferior en ayunas después de la administración de LCMV comparado con animales tratados con vehículos. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$.

La Figura 19 es una gráfica de barras que muestra la incidencia de diabetes Tipo 1 en un modelo de ratón inducido con diabetes Tipo 1 (Ratones RIP-LCMV-GP) en un grupo de aP2-/- (triángulos) y ratones aP2-normales inyectados dos veces semanalmente con ya sea 33 mg/kg de CA33 (cuadrados) o control (PBS) (círculos) y alimentados con una dieta alta en grasa. La diabetes se define como una medición de glucosa en sangre en ayunas de 6 horas mayor de 250 mg/dl. El tratamiento con CA33 proporcionó protección contra el desarrollo de diabetes tipo 1 en el modelo RIP-LCMV-GP similar a aquel observado en animales genéticamente deficientes en aP2.

La Figura 20A es una gráfica de barras que muestra la infiltración de isletas (%; no insulitis (barras abiertas); peri-insulitis (barras a cuadros); insulitis leve (barras grises); insulitis severa (barras negras)) en ratones de control GP+, ratones GP+ aP2-/-, o ratones GP+ tratados con CA33, 14 días después de la inyección con LCMV. Los ratones fueron tratados con 1.5 mg de CA33 o vehículo por inyección dos veces semanalmente, iniciando 14 días previo a la infección con LCMV. Se realizaron registros de insulitis en secciones pancreáticas teñidas con HyE. Cada isleta se registró como ya sea “no insulitis”, “peri-insulitis”, “insulitis leve”, o “insulitis severa”. La gráfica de barras representa el porcentaje de cada tipo de isleta en cada

animal analizado.

La Figura 20B es una fotografía representativa de una isleta que muestra poca a ninguna insulitis.

La Figura 20C es una fotografía representativa de una isleta que muestra insulitis severa.

La Figura 20D es una gráfica de barras que muestra las isletas con insulitis leve (%) en ratones de control GP+, ratones GP+ aP2-/-, o ratones GP+ tratados con CA33, 14 días después de la inyección con LCMV. Los ratones fueron tratados con 1.5 mg de CA33 o vehículo por inyección dos veces semanalmente, iniciando 14 días previo a la infección con LCMV. * $p<0.05$; ** $p<0.01$.

La Figura 20E es una gráfica de barras que muestra isletas con insulitis severa (%) en ratones de control GP+, ratones GP+ aP2-/-, o ratones GP+ tratados con CA33, 14 días después de la inyección con LCMV. Los ratones fueron tratados con 1.5 mg de CA33 o vehículo por inyección dos veces semanalmente, iniciando 14 días previo a la infección con LCMV. ** $p<0.01$; *** $p<0.005$.

La Figura 21A es una serie de imágenes representativas de isletas teñidas para ATF6 (columna izquierda) o XBP1 (columna derecha) en ratones de control GP+, ratones GP+ aP2-/-, o ratones GP+ tratados con CA33, 14 días después de la inyección con LCMV. Los ratones fueron tratados con 1.5 mg de CA33 o vehículo por inyección dos

veces semanalmente, iniciando 14 días previo a la infección con LCMV.

La Figura 21B es una gráfica de barras que muestra moveles de ATF6 (intensidad de fluorescencia relativa, RFI) en muestras pancreáticas de ratones de control GP+, ratones aP2-/- GP+, o ratones GP+ tratados con CA33, 14 días después de la inyección con LCMV. Los ratones fueron tratados con 1.5 mg de CA33 o vehículo por inyección dos veces semanalmente, iniciando 14 días previo a la infección con LCMV. ** $p<0.01$; *** $p<0.005$.

La Figura 21C es una gráfica de barras que muestra los niveles de sXBP1 (intensidad de fluorescencia relativa, RFI) en muestras pancreáticas de ratones de control GP+, ratones aP2-/- GP+, o ratones GP+ tratados con CA33, 14 días después de la inyección con LCMV. Los ratones fueron tratados con 1.5 mg de CA33 o vehículo por inyección dos veces semanalmente, iniciando 14 días previo a la infección con LCMV. ** $p<0.01$; *** $p<0.005$.

Las Figuras 22A-26B se discuten además en el Ejemplo 3 abajo.

La Figura 22A es una tabla que proporciona la dosis de anticuerpo (µg) y cálculos de volumen de inyección (µl) para lograr una dosificación de 33 mg/kg con base en el peso corporal promedio de ratones de exclusión génica ApoE (modelo de ratón con aterosclerosis) en los puntos de tiempo

indicados (semanas).

La Figura 22B es una gráfica que muestra el área de lesión aterosclerótica (%) en ratones ApoE con exclusión génica tratados con PBS (círculos), CA33 (cuadrados), o CA15 (triángulos). Las aortas de ratones ApoE con exclusión génica sacrificados se disectaron a partir de la aorta próxima a la bifurcación ilíaca, y las aortas se clavaron en una preparación en cara. En cara las aortas perforadas se tiñeron con Sudán IV. La cuantificación de las áreas de lesión se logró usando software ImageJ desarrollado en el NIH. El perímetro externo de la aorta perforada se definió en el software para establecer el área total de la aorta como un antecedente blanco. El porcentaje en área de las lesiones teñidas con rejo con Sudán IV entonces se midieron y calcularon por el software. * $p < 0.05$.

La Figura 22C es una imagen representativa de una aorta perforada en cara a partir de un ratón con exclusión génica de ApoE alimentados con dieta occidental y tratados con vehículo por doce semanas.

La Figura 22D es una imagen representativa de una aorta perforada en cara a partir de un ratón con exclusión génica de ApoE alimentados con dieta occidental y tratados con CA33 (33 mg/kg) por doce semanas.

La Figura 22E es una imagen representativa de una aorta perforada en cara a partir de un ratón con exclusión

génica de ApoE alimentados con dieta occidental y tratados con CA15 (33 mg/kg) por doce semanas.

La Figura 22F es una gráfica de línea que muestra el peso corporal promedio (g) de ratones ApoE con exclusión génica contra la edad (semanas de edad) en ratones tratados por doce semanas con PBS (círculos), CA33 (cuadrados), o CA15 (triángulos). Ratones ApoE con exclusión génica fueron alimentados con dieta occidental y tratados con vehículo o anticuerpo (33 mg/kg) por doce semanas.

La Figura 22G ilustra la expresión de proteína aP2 en tejido adiposo de ratones *aP2$^{adip-/-}$*.

Las Figuras 22H-22J: son gráficas de barras que muestran el nivel de aP2 (ng/ml) (Figura 22H), triglicéridos (mg/dl) (Figura 22I), y colesterol (mg/dl) (Figura 22J) en ratones *ApoE$^{-/-}$aP2$^{adip+/+}$ y ApoE$^{-/-}$aP2$^{adip-/-}$* después de 12 semanas de dieta occidental.

La Figura 22K es una gráfica de barras que muestra el área de lesión aterosclerótica en ratones *ApoE$^{-/-}$aP2$^{adip+/+}$ y ApoE$^{-/-}$aP2$^{adip-/-}$*.

La Figura 22L es una imagen representativa de una aorta perforada en cara a partir de *ApoE$^{-/-}$aP2$^{adip+/+}$ y ApoE$^{-/-}$aP2$^{adip-/-}$* ratones alimentados con dieta occidental for 12 semanas.

La Figura 23A es una gráfica de barras que muestra el peso corporal promedio (g) de ratones ApoE con exclusión

génica tratados por doce semanas con PBS (barra negra), CA33 (barra ligeramente gris), o CA15 (barra gris). Ratones ApoE con exclusión génica fueron alimentados con dieta occidental y tratados con vehículo o anticuerpo (33 mg/kg) por doce semanas. Ratones tratados con CA33 mostraron un peso corporal promedio inferior estadísticamente significante que los ratones tratados con vehículo. * $p < 0.05$.

La Figura 23B es una gráfica de barras que muestra el peso hepático (g) de ratones ApoE con exclusión génica tratados por doce semanas con PBS (barra negra), CA33 (barra ligeramente gris), o CA15 (barra gris). Ratones ApoE con exclusión génica fueron alimentados con dieta occidental y tratados con vehículo o anticuerpo (33 mg/kg) por doce semanas. Ratones tratados con CA33 muestran un peso ligero promedio inferior estadísticamente significativa los ratones tratados con vehículo. * $p < 0.05$.

La Figura 23C es una gráfica de barras que muestra el peso corporal menos el peso del hígado (g) de ratones ApoE con exclusión génica tratados por doce semanas con PBS (barra negra), CA33 (barra ligeramente gris), o CA15 (barra gris). Ratones ApoE con exclusión génica fueron alimentados con dieta occidental y tratados con vehículo o anticuerpo (33 mg/kg) por doce semanas. Ratones tratados con CA33 muestran un peso corporal promedio inferior menor que el peso del hígado que el de los ratones tratados con vehículo.

La Figura 23D es una gráfica de barras que muestra el peso corporal promedio, masa magra, o masa grasa (g) de ratones ApoE con exclusión génica tratados por doce semanas con PBS (barra negra), CA33 (barra ligeramente gris), o CA15 (barra gris). Ratones ApoE con exclusión génica fueron alimentados con dieta occidental y tratados con vehículo o anticuerpo (33 mg/kg) por doce semanas y peso corporal, masa magra, y masa grasa fueron fueron medidos por espectroscopia de absorbancia de rayos-X dual (DEXA).

La Figura 24A es una gráfica de barras de niveles de glucosa basal en ayunas (mg/dl) previo a una prueba de tolerancia a la glucosa en ratones ApoE con exclusión génica tratados con PBS (barra negra), CA33 (barra ligeramente gris), o CA15 (barra gris). Ratones ApoE con exclusión génica fueron alimentados con dieta occidental y tratados con vehículo o anticuerpo (33 mg/kg) por doce semanas. Ratones tratados con CA33 tienen glucosa en sangre en ayunas inferior estadísticamente significante que ratons tratados con vehículo. * $p < 0.05$.

La Figura 24B es una gráfica lineal de niveles de glucosa (mg/dl) contra el tiempo (minutos) durante una prueba de tolerancia a la glucosa en ratones ApoE con exclusión génica tratados con PBS (triángulos), CA33 (cuadrados), o CA15 (círculos). Ratones ApoE con exclusión génica fueron alimentados con dieta occidental y tratados con vehículo o

anticuerpo (33 mg/kg) por doce semanas. La prueba de la tolerancia a la glucosa se realizó por administración de glucosa oral (1.0 g/kg) en ratones conscientes después de un ayuno durante la noche (16 horas).

La Figura 25A es una gráfica de barras de colesterol en fracciones de lipoproteína (mg/dl) (lipoproteína total, lipoproteína de muy baja densidad (VLDL), lipoproteína de baja densidad (LDL), o lipoproteína de alta densidad (HDL)) en ratones ApoE con exclusión génica tratados con PBS (triángulos), CA33 (cuadrados), o CA15 (círculos) por seis semanas. La distribución del tamaño de partícula de las lipoproteínas fue se determina por cromatografía líquida de rápida resolución (FPLC), usando muestras combinadas de plasma. * $p < 0.05$.

La Figura 25B es una gráfica de barras de colesterol en fracciones de lipoproteína (mg/dl) (lipoproteína total, lipoproteína de muy baja densidad (VLDL), lipoproteína de baja densidad (LDL), o lipoproteína de alta densidad (HDL)) en ratones ApoE con exclusión génica tratados con PBS (triángulos), CA33 (cuadrados), o CA15 (círculos) por doce semanas. La distribución del tamaño de partícula de las lipoproteínas fue se determina por cromatografía líquida de rápida resolución (FPLC), usando muestras combinadas de plasma. * $p < 0.05$.

La Figura 26A es una gráfica de barras de

triglicéridoss en fracciones de lipoproteína (mg/dl) (lipoproteína total, lipoproteína de muy baja densidad (VLDL), lipoproteína de baja densidad (LDL), o lipoproteína de alta densidad (HDL)) en ratones ApoE con exclusión génica tratados con PBS (triángulos), CA33 (cuadrados), o CA15 (círculos) por seis semanas. La distribución del tamaño de partícula de las lipoproteínas fue se determina por cromatografía líquida de rápida resolución (FPLC), usando muestras combinadas de plasma. * $p < 0.05$.

La Figura 26B es una gráfica de barras de triglicéridoss en fracciones de lipoproteína (mg/dl) (lipoproteína total, lipoproteína de muy baja densidad (VLDL), lipoproteína de baja densidad (LDL), o lipoproteína de alta densidad (HDL)) en ratones ApoE con exclusión génica tratados con PBS (triángulos), CA33 (cuadrados), o CA15 (círculos) por doce semanas. La distribución del tamaño de partícula de las lipoproteínas fue se determina por cromatografía líquida de rápida resolución (FPLC), usando muestras combinadas de plasma. * $p < 0.05$.

Las Figuras 27-28 se discuten además en el Ejemplo 4 abajo.

La Figura 27 proporciona fragmentos de anticuerpo de región variable de cadena ligera kappa humanizados anti-aP2 humana, en donde la secuencia 909 (Seq. ID. No.445) es la secuencia variable de cadena ligera de conejo, y las

secuencias 909 gL1 (Seq. ID. No.446), gL10 (Seq. ID. No.448), gL13 (Seq. ID. No.487), gL50 (Seq. ID. No.488), gL54 (Seq. ID. No.450), y gL55 (Seq. ID. No.452) son injertos humanizados de 909 cadenas ligeras variables usando la línea germinal humana IGKV1-17 (Seq. ID. No.506) como la armazón aceptora. Las CDRs se muestran en negritas/subrayadas, mientras los residuos donadores aplicables se muestran en negritas/cursivas y son resaltados: 2V, 3V, 63K y 70D. La mutación en CDRL3 para remover un residuo de Cisteína se muestra en negritas/subrayadas y son resaltados: 90A.

La Figura 28 proporciona fragmentos de anticuerpo de region variable de cadena pesada humanizados anti-aP2 humana, en donde la secuencia 909 (Seq. ID. No.454) es la secuencia de cadena pesada variable de conejo, y las secuencias 909gH1 (Seq. ID. No.455), gH14 (Seq. ID. No.457), gH15 (Seq. ID. No.459), gH61 (Seq. ID. No.461), y gH62 (Seq. ID. No.463) son injertos humanizados de 909 cadenas pesadas variables usando la línea germinal humana IGHV4 (Seq. ID. No.481) como la armazón aceptora. Las CDRs se muestran en negritas/subrayadas. Los dos huecos de residuo en la armazón 3, en el bucle entre las hebras de lámina beta D y E, son resaltadas en gH1: 75 y 76. Los residuos donadores aplicables se muestran en negritas/cursivas son resaltados: 23T, 67F, 71K, 72A, 73S, 74T, 77T, 78V, 79D, 89T, y 91F. Las mutaciones en CDRH2 para remover un residuo de Cisteína se muestran en

negritas/subrayadas y son resaltadas: 59S. Las mutaciones en CDRH3 para remover un sitio de isomerización potencial de Aspartato se muestran en negrita/subrayadas y son resaltadas: 98E. El residuo Glutamina N-terminal es remplazado con ácido glutámico y se muestra en negritas y resaltado: 1E.

Las Figuras 29-31 se discuten además en el Ejemplo 5 abajo.

La Figura 29 es una ilustración que presenta puntos de contacto clave entre aP2 y un anticuerpo anti-aP2 derivado de murino. Como se muestra en la figura, la sustitución de residuos de aminoácidos particulares con regiones CDR de las cadenas pesada y ligera resulta en una reducción en la afinidad de los anticuerpos alterados en comparación con el anticuerpo H3 precursor.

La Figura 30A proporciona sustituciones de aminoácido para inducir una reducción en la afinidad de unión en un anticuerpo anti-aP2 derivado de murino comparado con el anticuerpo precursor H3, donde g1 = precursor de tipo silvestre H3. Las afinidades de unión (µM) se muestran para CA33 y dos anticuerpos similares a H3 de afinidad reducida.

La Figura 30B proporciona la secuencia de proteína de la cadena pesada que detalla las sustituciones de aminoácido para inducir una reducción en la afinidad de unión en un anticuerpo anti-aP2 derivado de murino comparado con el anticuerpo precursor H3, donde g1 = precursor de tipo

silvestre H3 (Seq. ID. No.482), g19= W33A, Y52S (Seq. ID. No. 483), y g20 = W33A, Y52S, y Y98F (Seq. ID No. 484). Las CRs están subrayadas y las sustituciones de aminoácido se muestran en negritas.

La Figura 30C proporciona la secuencia de proteína de la cadena ligera que detalla las sustituciones de aminoácido para inducir una reducción en la afinidad de unión en un anticuerpo anti-aP2 derivado de murino comparado con el anticuerpo precursor H3, donde g1 = precursor de tipo silvestre H3 (Seq. ID. No.485) y g11= W91A (Seq. ID. No.486). Las CRs están subrayadas y las sustituciones de aminoácido se muestran en negritas.

La Figura 31 es una tabla que indica los datos de afinidad contra aP2 humana y de ratón para anticuerpos anti-aP2 derivados de murino que han sido mutados para reducir la afinidad de unión. Las afinidades de unión (KD) se muestran para dos clones para cada anticuerpo (APP5168/PB1172 y APP5169/PB1171) y se muestra la afinidad de unión promedio (KD) (µM).

Las Figuras 32A–46C se discuten además en el Ejemplo 6 abajo.

Las Figuras 32A-32G ilustran que la aP2 regula la expresión del gen gluconeogénico en una manera dependiente de FoxO1. Los hepatocitos primarios fueron incubados cono sin 50 µg/ml de aP2 en la presencia o ausencia de 2 µM de forscolina

(fsk) por 3h (Figuras 32A, 32B, 32C, 32D, y 32E) o 6h (Figura 32F). Las Figuras 32A y 32B muestran el impacto de la estimulación de forscolina en el efecto de aP2 en la expresión del gen gluoneogénico (G6pc y Pck1 respectivamente) en hepatocitos, así como también el papel de la unión lípida de aP2 en este proceso (n=4). mut: mutante de unión lípida, deslip: aP2 deslipidada, WT: aP2 cargada con lípido. La Figura 32C ilustra la selección de los factores de transcripción por exclusión génica mediada por siARN y el efecto en forscolina y la expresión *G6pc* estimulada por aP2 (n=4). La Figura 32D ilustra el efecto de exclusión génica de FoxO1 mediada por adenovirus en la expresión de *G6pc* mediada por aP2 (n=4). La Figura 32E ilustra la eficiencia de la exclusión génica a niveles de proteína para FoxO1. La Figura 32F ilustra el efecto de la estimulación de aP2 de actividad de luciferasa FHRE en hepatocitos primarios (n=6). La Figura 32G ilustra la producción de glucosa a partir de hepatocitos después de la exclusión génica de FoxO1 mediada por adenovirus y estimulación de aP2 (n=5). Los datos son expresados como la media ± SEM. *, ** y NS denota $p < 0.05$, $p < 0.01$ y diferencia no significante, respectivamente, determinada por la prueba t de Student.

Las Figuras 33A-33I ilustra que la aP2 altera el metabolismo de ácido graso para regular la expresión del gen gluconeogénico. Las Figuras 33A y 33B muestran los resultados

tabulados para la expresión de *G6pc* y *Pck1*, respectivamente, a partir de hepatocitos primarios preincubados con vehículo o 50 µM de Etomoxir por 30 min y estimulado con 50 µg/ml de aP2 en la presencia o ausencia de 2 µM de forscolina (fsk) por 3 h (n=4). Las Figuras 33C y 33D muestra los resultados obtenidos cuando hepatocitos primarios fueron estimulados con 50 µg/ml de aP2 por 2 h, y estimulados con 150 µM de palmitato (Figura 33C) o 150 µM de oleato (Figura 33D) por la cantidad indicada de tiempo para medir el índice de consumo de oxígeno (OCR, Figura 33C, n=6) o absorción de ácido graso (FIG 33D, n=5). Las Figuras 33E y 33F ilustran los niveles de mARN obtenidos para *G6pc* y *Pck1*, respectivamente, cuando los hepatocitos primarios fueron estimulados con 50 µg/ml de aP2 por 2 h y las células fueron además estimuladas con 50 µg/ml de aP2 en la presencia o ausencia de 2 µM de forscolina (fsk)/100 µM de de palmitato por 3 h (n=4). Las Figuras 33G y 33H ilustran los niveles de mARN obtenidos para *G6pc* y *Pck1*, respectivamente, cuando los hepatocitos primarios fueron preincubados con 5 µM de Triacsina C por 30 min y tratados además como en la Figura 33D con o sin las mismas concentraciones de Triascina C (n=4). La Figura 33I ilustra el nivel de acil-CoA graso nuclear (pmol/10^6 células) en hepatocitos primarios después fueron tratados con ya sea vehículo o aP2. Los datos son expresados como la media ± SEM. *, ** y NS denota $p < 0.05$, $p < 0.01$ y diferencia no

significante, respectivamente, determinado por la prueba t de Student.

Las Figuras 34A-34N demuestran la existencia de un nuevo complejo transcripcional FoxO1/CtBP2 regulado por aP2. Los hepatocitos primarios fueron estimulados con 50 µg/ml de aP2 (Figuras 34A, 34B, 34H, 34L, 34M y 34N) en la presencia o ausencia de 2 µM de forscolina (fsk) por 3 h (Figuras 34A y 34B) o 90 min (Figuras 34H, 34K, 34M y 34N). Las Figuras 34A y 34B muestran los efectos de exclusión génica de CtBP1 y CtBP2 mediada por adenovirus en la expresión de *G6pc* y *Pck1* inducida por aP2, respectivamente (n=4). La Figura 34C muestra las porciones similares a PxDLS en secuencias FoxO de ratón y humana como se indica por los rectángulos: FOXO de ratón aminoácidos 571 a 610 (Seq. ID. No.603), FOXO3 de ratón aminoácidos 581 a 610 (Seq. ID. No.604), FOXO4 aminoácidos 411 a 480 (Seq. ID. No.605, FOXO6 de ratón aminoácidos 481 a 520 (Seq. ID. No.606), FOXO1 humano aminoácidos 581 a 620 (Seq. ID. No.607, FOXO3 humano aminoácidos 591 a 630 (Seq. ID. No.608, FOXO4 humano aminoácidos 451 a 490 (Seq. ID. No.609, FOXO6 humano aminoácidos 451 a 490 (Seq. ID. No.610).

Las Figuras 34D y 34E muestran el complejo FoxO1/CtBP endógeno en hepatocitos primarios mostrados por coinmunoprecipitación recíproca de CtBP o FoxO1, respectivamente. Las Figuras 34F y 34G ilustran el papel

crítico de la porción PxDL en el complejo FoxO1/CtBP2. Células HEK293 fueron transfectadas con ya sea plásmido de control, FoxO1 de tipos silvestre FLAG o FLAG-FoxO1 mutante (Mut: PSDL>PSAS, Δpsdl: supresión de porción PxDL) junto con el plásmido de expresión CtBP2. Los complejos fueron inmunoprecipitados con perlillas de agarosa FLAG. La Figura 34H muestra la disociación del complejo nativo FoxO1/CtBP2 por tratamiento de aP2. El complejo endógeno de FoxO1/CtBP2 fue inmunoprecipitado a partir de los hepatocitos primarios. Las Figuras 34I y 34J muestran la capacidad de detección de nutriente del complejo FoxO1/CtBP2. Células HEK293 fueron transfectadas con FoxO1 y CtBP2 de tipo silvestre FLAG. Las concentraciones incrementada de ya sea oleoil-CoA (0, 50, 150, 500 µM) (Figura 34I) o NADH (0, 10, 30, 100 µM) (Figura 34J) fueron agregados a los lisados celulares e inmunoprecipitados con perlillas de agarosa FLAG. La Figura 34K muestra el efecto del estado rédox citosólico en el complejo FoxO1/CtBP2. Células HEK293 fueron transfectadas con FoxO1 y CtBP2 de tipo silvestre FLAG e incubadas con diferentes relaciones de lactato y piruvato por 1 h. La Figura 34L ilustra el efecto de forscolina y tratamiento de aP2 en la localización nuclear/citoplásmica de FoxO1 y CtBP2. NE: extracto nuclear. Las Figuras 34M y 34N muestran el análisis de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) (n=4) de FoxO1 o CtBP2, respectivamente, en el promotor *G6pc*. Los

datos son expresados como la media ± SEM. * y ** denota $p < 0.05$ y $p < 0.01$, respectivamente, determinado por la prueba t de Student.

Las Figuras 35A-35G muestran la regulación de ajuste fino de la expresión del gen gluconeogénico por CtBP2. Los hepatocitos primarios fueron estimulados con vehículo o 2 µM de forscolina (fsk) por 3 h (Figs. 35A, 35D y 35E) o 6 h (Figs. 35B, 35F) después de la exclusión génica (Figs. 35A-35B) o sobreexpresión (Figs. 35C-35F) de CtBP2. La Figura 35A muestra el efecto de la exclusión génica de CtBP2 y/o FoxO1 en la expresión de *G6pc* (n=5). La escala de ejes-y es expandida en el recuadro para mostrar los datos en la ausencia de fsk más claramente. La Figura 35B muestra la actividad de luciferasa FHRE después de la expresión génica de CtBP2 (n=8). La Figura 35C muestra la sobreexpresión de GUS y CtBP2 en hepatocitos primarios. Las Figuras 35D y 35E muestran la regulación de la expresión del gen gluconeogénico por sobreexpresión de CtBP2 (n=4). La Figura 35F muestra la actividad de luciferasa FHRE después de la sobreexpresión de CtBP2 (n=8). La Figura 35G muestra el efecto de actividad aguda de insulina y señalización de cAMP en el complejo FoxO1/CtBP2. Las células HEK293 transfectadas con FLAG-FoxO1 y CtBP2 fueron estimulados con ya sea vehículo, 100 nM de insulina (ins) o 50 µM de forscolina (fsk) por 30 min.

Las Figuras 36A-36N muestra la regulación del

complejo endógeno de FoxO1/CtBP2 *in vivo*. Figuras 36A, 36C, 36E, 36G, y 36J: homogenados hepáticos a partir de los siguientes grupos de ratones fueron sometidos a co-inmunoprecipitación para someter al ensayo el complejo endógeno FoxO1/CtBP2. Todos los ratones fueron sacrificados después de 4-6 h de ayuno. La cuantificación densitométrica se muestra a la derecha de cada manachado; véase Figuras 36B, 36D, 36F, 36H y 36K. Figuras 36A y 36B: ratones *ob/ob* genéticamente obesos y sus ratones flacos de control. Figuras 36C y 36D: ratones obesos inducidos con dieta (dieta alta en grasa (HFD) por 16 semanas) y sus ratones flacos de control (alimento normal (NC)). Figuras 36E y 36F: expresión agénica de aP2 (KO) o sus ratones de tipo silvestre de control (WT) en alimento normal (NC) o dieta alta en grasa (HFD) por 16 semanas. Figuras 36G y 36H: ratones obesos inducidos por dieta (HFD) tratados con anticuerpo aP2 monoclonal (CA33) o vehículo, y ratones flacos de control (NC). Figuras 36I, 36J, 36K, 36L, y 36M: se administró aP2 recombinante en ratones flacos de tipo silvestre por 5 días. Niveles de aP2 en suero (Figura 36I) y complejo FoxO1/CtBP2 (Figura 36J y 36K), expresión del gen en el hígado (Figuras 36L y 36M) fueron analizados (n=4). La Figura 36N muestra los resultados de la exclusión génica mediada por adenovirus de CtBP2 en el hígado de ratones flacos de tipo silvestre 5 días después de la transducción (n=6). * y ** denota $p < 0.05$ y $p < 0.01$,

respectivamente, determinado por la prueba t de Student.

Las Figuras 37A-37Q muestran la ganancia de función CtBP2 en hígado mejora la tolerancia la glucosa y alivia la esteatosis en ratones obesos. El CtBP2 fue sobreexpresado en el hígado de ratones obesos inducidos por dieta (14 semanas en la dieta) por transducción adenoviral. HFD: dieta alta en grasa, NC: alimento normal. Las Figuras 37A y 37B tabulan la medición de pesos corporales y niveles de glucosa en sangre, respectivamente, después del ayuno durante la noche (n=4-5). Figuras 37C, 37D, y 37Q: ratones obesos inducidos por dieta transducidos con AdGUS o AdCtBP2 se sometieron a la prueba de tolerancia a la glucosa (GTT, Figura 37C), prueba de tolerancia a la insulina (ITT, Figura 37D), y prueba de tolerancia al piruvato (PTT, Figura 37Q)(n=10-12). Figuras 37E, 37F y 37G: Expresión del gen en hígado (n=4-5) para mARN de *G6pc*, *Pck1*, o *Alb*, respectivamente. La Figura 37H ilustra las secciones teñidas con hematoxilina y eosina representativas de hígado. La Figura 37I muestra el contenido de triglicéridos de hígado tabulados (n=10). La Figura 37J muestra los niveles de ALT en suero tabulados (n=10). Las Figuras 37K, 37L, 37M, 37N, y 37O muestran la expresión de *Mlxipl*/*Srebf1c* (Figura 37K y 37L) y la expresión del gen lipogénico (Figuras 37M, 37N y 37O) en el hígado (n=10). Los ratones fueron sacrificados después de ayuno durante la noche. La Figura 37P es un diagrama que muestra un mecanismo

regulador potencial. ACSL; acil-CoA sintetasa. Los datos son expresados como la media ± SEM. *, ** y NS denota $p < 0.05$, $p < 0.01$ y diferencia no significante, respectivamente, determinado por la prueba t de Student.

Las Figuras 38A-38D muestran la expresión del gen gluconeogénico inducida por aP2 amplificada por estímulada por cAMP. Las Figuras 38A y 38B muestran los niveles de mARN de Pck1 y mARN de G6pc, respectivamente, de cuando los hepatocitos primarios fueron estimulados con o son 50 µg/ml de aP2 en la ausencia o presencia de 2 µM de forscolina (fsk) por 3 h (n=4). La escala del eje-y es expandida en el recuadro para mostrar los datos en la ausencia de fsk más claramente. En las Figuras 38C y 38D, los hepatocitos primarios fueron tratados en la misma forma como en la Figura 38A con o sin inhibidor de PKA (H89, 20 µM) (n=4); los niveles de mARN de G6pc y mARN de Pck1 fueron medidos y tabulados. Los datos son expresados como la media ± SEM. ** denota $p < 0.01$ determinado por la prueba t de Student.

Las Figuras 39A-39H muestra la selección del(los) factor(es) de transcripción responsables de la regulación ascendente mediada por aP2 de genes gluconeogénicos. Las Figuras 39A, 39B y 39C muestran la eficiencia de la exclusión génica en el nivel de mARN, que corresponde al experimento mostrado en la Figura 32C (n=4). Las Figuras 39D, 39E, 39F y 39G muestran la selección del(los) factor(es) de

transcripción responsables de la regulación ascendente dependiente de aP2 de genes gluconeogénicos. Los hepatocitos primarios fueron tratados en la misma forma como la Figura 32A después de la exclusión agénica de Hif1a, Ppargc1a o Stat3 (n=4). La Figura 39H muestra los niveles de expresión de *Foxo1* como en la Figura 32C (n=4). Los datos son expresados como la media ± SEM. * y ** denota $p < 0.05$ y $p < 0.01$, respectivamente, determinado por la prueba t de Student.

Las Figuras 40A-40G muestran Activación transcripcional dependiente de CtBP2 por aP2. Las Figuras 40A, 40B, 40C y 40D muestra la eficiencia de la exclusión génica en los niveles de proteína y mARN que corresponden a las Figuras 34A-34N (n=4). Las Figuras 40E, 40F y 40G muestran la expresión del gen gluconeogénico en hepatocitos primarios después de la exclusión génica mediada adenoviral de HNF4α (n=4). Los perfiles para expresión del gen para G6pc y Pck1 se muestran en la Figura 40E y 40F, respectivamente, y la eficiencia de la exclusión génica en los niveles de proteína se muestran en la Figura 40G. Los datos son expresados como la media ± SEM. * y ** denota $p < 0.05$ y $p < 0.01$, respectivamente, determinado por la prueba t de Student.

Las Figuras 41A-41F muestran la Caracterización del complejo FoxO1/CtBP. Las Figuras 41A y 41B muestran los

resultados de estudios de mutagénesis para la interacción de FoxO1/CtBP1. Las células HEK293 transfectadas con FoxO1 FLAG de tipo silvestre (WT) o FoxO1 mutante (Mut: PSDL>PSAS, Δpsdl: supresión de la porción PxDL) junto con el plásmido de expresión CtBP1 fueron sometidos a lisis y sometidos a co-inmunoprecipitación. La Figura 41C muestra los resultados de incubard los hepatocitos primarios con 50 µg/ml de aP2 en la presencia o ausencia de forscolina (fsk, 2 µM) por 2 h y el complejo nativo de FoxO1/CtBP2 fue inmunoprecipitado. La Figura 41D muestra larelación de piruvato/lactato celular. Los hepatocitos primarios fueron tratados como en la Figura 33E. La Figura 41E muestra la inmunocitoquímica que corresponde a la Figura 34L. La Figura 41F muestra los niveles de fosforilación y acetilación de FoxO1. Los hepatocitos primarios fueron tratados con forscolina (fsk, 2 µM) y/o 50 µg/ml aP2 por 30 min.

La Figura 42 muestra el efecto de la sobreexpresión de CtBP2 en la expresión de genes particulares. Los hepatocitos primarios fueron tratados como en la Figura 35D y se analizó el perfil de la expresión del gen.

Las Figuras 43A-43G ilustra los resultados de la administración *in vivo* de aP2 recombinante. La aP2 recombinante se administró en ratones flacos de tipo silvestre por 5 días (n=4). Las Figuras 43A, 43B, 43C, 43D y 43E muestran los resultados para los pesos corporales antes

(día 0) y después de las inyecciones intraperitoneales (día 5) de aP2, niveles de suero en insulina, glucagón, glicerol, y ácidos grasos libres (FFA), respectivamente. Las Figuras 43F y 43G muestran los niveles de mARN para Pck1 y Foxo1, respectivamente, en ratones KO FoxO1 específicos del hígado o de tipo silvestre tratados con aP2 recombinante (n=7-8). Los datos son expresados como la media ± SEM. NS denota diferencia no significante determinado por la prueba t de Student.

Las Figuras 44A-44C Sobre expresión de CtBP2 *in vivo*. La Figura 44A ilustra los niveles de proteína de la sobreexpresión de GUS y CtBP2 en hígado. Las Figuras 44B ilustran los niveles de glucosa en sangre sin normalización al valor de referencia en el estudio ITT (Figura 37D, n=10-12). La Figura 44C muestra los niveles de insulina en suero en GUS o CtBP2 sobreexpresado en hígado. Los datos son expresados como la media ± SEM. * y ** denota $p < 0.05$ y $p < 0.01$, respectivamente, determinado por la prueba t de Student.

La Figura 45A-45F Involucramiento de CtBP2 en la patogénesis de esteatosis hepática. Las Figuras 45A, 45B, 45C, 45D, 45E, y 45F muestran el efecto de la sobreexpresión de CtBP2 en la expresión del gen lipogénicos en hepatocitos primarios de tipo silvestre (Figuras 45A, 45B, 45C, y 45D, n=4) o hepatocitos de exclusión génica de FoxO1 (Figuras 45E

y 45F, n=5). Las Figuras 45G, 45H, 45I, y 45J muestran los resultados de muestras de hígado analizadas después de 14 días de transducción de Ad/shCtBP2 en ratones flacos de tipo silvestre. La Figura 45G muestra las reacciones de hígado teñidas con Hematoxilina y Eosina representativas. La Figura 45H muestra el contenido de triglicéridos hepáticos (n=6). La Figura 45I y 45J muestra la expresión de Estearoil-CoA desaturasa-1 de hígado (*Scd1*) y Sintasa de ácido graso (*Fasn*) (n=6), respectivamente. Los ratones fueron sacrificados después de ayuno durante la noche. Los datos son expresados como la media ± SEM. * y ** denota $p < 0.05$ y $p < 0.01$, respectivamente, determinado por la prueba t de Student.

Las Figuras 46A-46C Ilustran que la adición de aP2 recombinante activa la translocación y actividad de FOXO1. La Figura 46A ilustra la translocación nuclear de FOXO1 en isletas humanas y de ratón tratadas con 10 ug/ml de aP2 por 20 minutos (N=3 Isletas de Ratón, N=1 isletas humanas). La Figura 46B ilustra cambios de expresión de gen de genes objetivo FOXO1 en células INS1 tratadas con 10 ug/ml de aP2 por 24 hrs (N=4/grupo). La Figura 46C ilustra la validación de cambio en la expresión del gen objetivo FOXO1 que muestra la proteína VEGFA incrementada después de 24 hrs de 10 ug/ml de tratamiento con aP2 (N=3/grupo).

La Figura 47 es una gráfica lineal de la resistencia de las vías respiratorias (cmH2O.s/ml) contra

metacolina (mg/ml) durante una prueba de estimulación de metacolina en ratones aP2 y de tipo silvestre con exclusión génica tratados con ya sea ovalbúmina o vehículo.

Descripción Detallada de la Invención

Se proporcionan anticuerpos monoclonales anti-aP2 y agentes de unión al antígeno que tienen actividad superior e inesperada para el tratamiento de trastornos mediados por aP2. Por ejemplo, se proporcionan agentes de unión al antígeno y anticuerpos monoclonales anti-aP2 que comprenden una cadena ligera o fragmento de cadena ligera que tiene una región variable, en donde tal región variable comprende una, dos, o tres CDRs seleccionadas independientemente a partir de la Seq. ID No. 7, Seq. ID No. 8 y Seq. ID No. 9, Seq. ID No. 10, Seq. ID No. 11, Seq. ID No. 12, y Seq. ID No. 13. Alternativamente, uno o más de las CDRs seleccionadas y descritas puede ser alterada por sustitución de uno o más aminoácidos que no afectan adversamente o que mejoran las propiedades del anticuerpo o agente de unión al antígeno, como se describe además en la presente. En una modalidad, la(s) CDR(s) seleccionada(s) es/son colocadas en un armazón de inmunoglobulina humana. En una modalidad, el armazón de inmunoglobulina humana es además modificado o alterado para mantener la especificidad de afinidad de unión de la región CDR injertada.

Uno de los descubrimientos inesperados descritos en

la presente es que los anticuerpos y agentes de unión al antígeno descritos no se unen fuertemente a la proteína aP2. Típicamente, los anticuerpos y otros agentes de unión al antígenos se buscan por tener fuerte afinidad de unión (KD muy baja), como se reportó por Miao, et al. (Véase Antecedentes de la invención).

Por lo tanto, en otra modalidad, se ha descubierto que un anticuerpo o agente de unión al antígeno que se une a la proteína aP2 en su estado secretado (no citosólico) con una *afinidad de unión más débil de KD aproximadamente $\geq 10^{-7}$ M, tiene una capacidad mejorada para neutralizar la aP2 secretada y causar un efecto inhibidor significante en trastornos mediados por aP2 cuando se proporciona en una cantidad efectiva a un hospedero en necesidad del mismo. Además, se ha descubierto que el uso de un anticuerpo anti-aP2 de unión de baja afinidad reduce los efectos indeseables vistos con el uso de anticuerpos anti-aP2 de alta afinidad, por ejemplo, ganancia de peso y niveles en suero de aP2 incrementados.

Los anticuerpos y agentes de unión al antígeno anti-aP2 de la presente invención pueden ser alternativamente descritos por puntos de contacto entre el anticuerpo o agente de unión al antígeno con el(los) epítopo(s) de la proteína aP2. La aP2 se conoce por tener un epítopo discontinuo, en el cual los aminoácidos están en proximidad cercana en la

proteína plegada pero no cercanos cuando la proteína es no plegada o estirada (véase documento WO 2010/102171). De este modo, en una modalidad, el anticuerpo monoclonal anti-aP2 o agente de unión al antígeno del mismo se une a un epítopo de aP2 humana que comprende uno o más, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9, residuos de aminoácido seleccionados a partir de 10K, 11L, 12V, 13S, 37A, 38K, 57T, 130E, 132A (en negrita en la Seq. ID No. 1, anterior), o un residuo de aminoácido dentro de aproximadamente 3 o 4 angströms de cualquiera de 10K, 11L, 12V, 13S, 37A, 38K, 57T, 130E, y 132A, opcionalmente con una KD para aP2 secretada de aproximadamente $\geq 10^{-7}$ M. En una modalidad particular, el anticuerpo tiene contacto con cada uno de estos aminoácidos dentro de un intervalo de 3 o 4 Angströms. En otra modalidad, el anticuerpo o agente de unión al antígeno de la presente invención tiene un contacto en el intervalo de 3 o 4 Angströms con al menos 6, 7, o 8 de los residuos de aminoácido listados.

En una modalidad, el anticuerpo monoclonal anti-aP2 o agente de unión al antígeno se une a aP2 solamente a través, o principalmente a través, de regiones determinantes de complementariedad (CDRs) de cadena ligera. En una modalidad alternativa, el anticuerpo monoclonal anti-aP2 o agente de unión al antígeno tiene CDRs de cadena ligera que se unen a aP2 con una mayor afinidad que sus CDRs de cadena

pesada que se unen a aP2. Como un ejemplo, el anticuerpo o agente de unión al antígeno específicamente se une a aP2, y no se une específicamente a FABP5/Mal1.

Cuando se administra a un hospedero en necesidad del mismo, estos anticuerpos anti-aP2 y agentes de unión al antígeno neutralizan la actividad de aP2 y proporcionan niveles de glucosa en sangre en ayunas inferior, metabolismo de glucosa sistémica mejorado, sensibilidad a la insulina sistémica incrementada, masa grasa reducida, esteatosis hepática, perfiles lípidos en suero mejorados, y/o formación de placa aterogénica reducida en un hospedero cuando se compara con anticuerpos monoclonales anti-aP2 que tienen afinidades de unión superiores. Por lo tanto, los anticuerpos y agentes de unión al antígeno anti-aP2 descritos en la presente son particularmente útiles para tratar trastornos metabólicos que incluye, pero no se limita a, diabetes (ambos tipo 1 y tipo 2), hiperglicemia, obesidad, enfermedad de hígado graso, dislipidemia, síndrome de ovario poliquístico (POS), un trastorno proliferativo tal como un tumor o neoplasma, (que incluyen, por ejemplo, cáncer de vejiga transicional, cáncer de ovario y liposarcoma), aterosclerosis y otros trastornos cardiovasculares administrando una cantidad efectiva a un hospedero, típicamente un humano, en necesidad de la misma.

La presente invención de este modo proporciona al

menos lo siguiente:

(a) Un anticuerpo anti-aP2 monoclonal o agente de unión antigénica, como se describe en la presente, o una variante o conjugado del mismo descritos.

(b) Un anticuerpo anti-aP2 monoclonal humanizado o agente de unión antigénica, como se describe en la presente, o una variante o conjugado del mismo descritos.

(c) Un anticuerpo anti-aP2 monoclonal o agente de unión antigénica, como se describe en la presente, o una variante o conjugado del mismo descritos, en donde el anticuerpo o conjugado de anticuerpo es caracterizado por al menos uno de:

i. Inclusión armazónl de una o más CDRs descritas en las Seq. IDs 7-13 o a variantes de las mismos con sustituciones de aminoácido que no afectan adversamente las propiedades de unión de la región CDR como se describe en las Seq. IDs 7-13;

ii. Afinidad de unión a KD para aP2 humana de $\geq 10^{-7}$ M; y/o

iii. Puntos de contacto con una proteína aP2 humana o de ratón dentro de 3 o 4 Angströms como se especifica además en la presente.

(d) Un anticuerpo anti-aP2 monoclonal o

agente de unión antigénica, como se describe en la presente, o una variante o conjugado del mismo descritos para uso para tratar un hospedero, y en particular un humano, con un trastorno mediado por aP2.

(e) Uso de un anticuerpo anti-aP2 monoclonal o agente de unión antigénica, como se describe en la presente, o una variante o conjugado del mismo, para tratar un hospedero, y en particular un humano, con un trastorno mediado por aP2.

(f) Uso de un anticuerpo anti-aP2 monoclonal o agente de unión antigénica, como se describe en la presente, o una variante o conjugado del mismo, en la manufactura de un medicamento para tratar un hospedero, y en particular un humano, con un trastorno mediado por aP2.

(g) Un proceso para manufacturar un medicamento propuesto para el uso terapéutico en el tratamiento de un trastorno mediado por aP2, caracterizado porque un anticuerpo anti-aP2 monoclonal o agente de unión antigénica, como se describe en la presente, o una variante o conjugado del mismo es usado en la manufactura.

(h) Una composición farmacéutica que incluye una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-aP2 monoclonal o agente de unión antigénica, como se

describe en la presente, o una variante o conjugado del mismo descritos.

Definiciones Generales

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado como se entiende comúnmente por uno de habilidad ordinaria en la técnica a la cual pertenece esta invención. Aunque los métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos en la presente pueden ser usados en la práctica o pruebas de la presente invención, los métodos y materiales adecuados se describen abajo. Todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes, y otras referencias mencionadas en la presente están incorporadas por referencia en su totalidad. En el caso de conflicto, la presente especificación, que incluye definiciones, regirán. En adición, los materiales, métodos y ejemplos son solamente ilustrativos y no están propuestos para ser limitantes.

A menos que se requiera de otro modo por el contexto, los términos singulares deben incluir pluralidades y los términos plurales deben incluir el singular. En esta solicitud, el uso de "o" significa "y/o" a menos que se declare de otro modo. Además, el uso del término "que incluyen", así como también otras formas, tales como "incluye" e "incluido", no son limitantes. También, términos tales como "elemento" o "componente" abarca tanto elementos

como componentes que comprenden una unidad y elementos y componentes que comprenden más de una subunidad a menos que se declare específicamente de otro modo.

En general, las nomenclaturas usadas en conjunto con, y técnicas de, células y cultivo de tejidos, biología molecular, inmunología, microbiología, genética y proteína y química de ácido nucleico e hibridización descritos en la presente son aquellas bien conocidas y comúnmente usadas en la técnica. Los métodos y técnicas de la presente invención son en general realizadas de conformidad con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en varias referencias generales y más específicas que son mencionadas y discutidas a través de la presente especificación a menos que se indique de otro modo. Las técnicas de purificación y reacciones enzimáticas pueden ser realizadas de conformidad con las especificaciones del fabricante, como se realiza comúnmente en la técnica o como se describe en la presente. Las nomenclaturas usadas en conjunto con, y los procedimientos de laboratorio y técnicas de, química analítica, química orgánica sintética, y medicinal, y química farmacéutica descrita en la presente son aquellas bien conocidas y comúnmente usadas en la técnica. Las técnicas estándares son usadas para síntesis química, análisis químico, preparación farmacéutica, formulación, y suministro, y tratamiento de pacientes.

Tal presente invención puede ser más fácilmente entendida, los términos seleccionados se definen abajo.

El término “hospedero” como se usa en la presente, típicamente se refiere a un sujeto humano, y en particular donde una armazón humana o humanizada se usa como una armazón aceptora. Donde otro hospedero es tratado, se entiende por aquellos expertos en la técnica que el anticuerpo o agente de unión al antígeno puede necesitar ser adaptado a tal hospedero para evitar el rechazo o hacerlo más compatible. Se sabe cómo usar las CDRs en la presente invención y diseñarlas por ingeniería en la secuencia peptídica o armazón apropiada para el suministro y función deseada para un intervalo de hospederos. Otros hospederos pueden incluir otros mamíferos o especies vertebrados. El término “hospedero”, por lo tanto, puede referirse alternativamente a animales tales como ratones, monos, perros, cerdos, conejos, cerdos domesticados (cerdos y puercos), rumiantes, equinos, aves de corral, felinos, murinos, bovinos, caninos, y similares, donde el anticuerpo o agente de unión al antígeno, si es necesario es adecuadamente diseñado para compatibilidad con el hospedero.

El término “polipéptido” como se usa en la presente, se refiere a cualquier cadena polimérica de aminoácidos. Los términos “péptido” y “proteína” son usados intercambiablemente con el término polipéptido y también se refieren a una cadena polimérica de aminoácidos. El término

"polipéptido" abarca proteínas artificiales o nativas, fragmentos de proteína, y análogos de polipéptido de una secuencia de proteína. Un polipéptido puede ser monomérico o polimérico.

El término "recuperar" como se usa en la presente, se refiere al proceso de proporcionar una especie química tal como un polipéptido sustancialmente libre de componentes naturalmente asociados por aislamiento, por ejemplo, usando las técnicas de purificación de proteína bien conocidas en la técnica

El término "proteína aP2 humana" o "proteína aP2/FABP4 humana", como se usa en la presente se refiere a la proteína codificada por la Seq. ID. No. 1, y variantes naturales de la misma, como se describe por Baxa, C. A., Sha, R. S., Buelt, M. K., Smith, A. J., Matarese, V., Chinander, L. L., Boundy, K. L., Bernlohr, A. Human adipocyte lipid-binding protein: purification of the proteína and cloning de its complementary DNA. Biochemistry 28: 8683-8690, 1989.

El término "proteína aP2 de ratón" o "proteína aP2/FAB4P de ratón", como se usa en la presente, se refiere a la proteína codificada por la Seq. ID. No. 2, y variantes naturales de la misma. La proteína de ratón es registrada en el Swiss-Prot bajo el número P04117.

Los términos "unión específica" o "específicamente de unión", como se usa en la presente, con referencia a la

interacción de un anticuerpo, una proteína, o un péptido con una segunda especie química, significa que la interacción es dependiente de la presencia de una armazón particular (por ejemplo, una "determinante antigénica" o "epítopo" como se define abajo) en las especies químicas; por ejemplo, un anticuerpo reconoce y se une a una armazón de proteína específica en lugar de a proteínas en general. Si un anticuerpo es específico para un epítopo "A", la presencia de una molécula que contiene epítopo A (o A no etiquetado, libre), en una reacción que contiene "A" etiquetado y el anticuerpo, reducirá la cantidad de A etiquetado unido al anticuerpo.

El término "anticuerpo", como se usa en la presente, se refiere ampliamente a cualquier molécula de inmunoglobulina (Ig) comprendida de cuatro cadenas de polipéptido, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L), o cualquier fragmento, mutante, variante funcional, o derivado del mismo, el cual retiene al menos alguna porción de las características de unión al epítopo de una molécula Ig permitiéndole unirse específicamente a aP2. Tales formatos de anticuerpo mutante, variante o derivado se conocen en la técnica y describen abajo. Modalidades no limitantes las cuales se discuten abajo. Un anticuerpo se dice, es "capaz de unirse" a una molécula si es capaz de reaccionar específicamente con la molécula, de este modo uniendo la

molécula al anticuerpo.

Un "anticuerpo monoclonal" como se usa en la presente está propuesto para referirse a una preparación de moléculas de anticuerpo, las cuales comparten una secuencia de aminoácido de cadena ligera común y cadena pesada común, o cualquier fragmento funcional, mutante, variante, o derivación del mismo el cual retiene al menos las características de unión del epítopo de cadena ligera de una molécula Ig, contrario con preparaciones de anticuerpo "policlonal" que contienen una mezcla de diferentes anticuerpos. Los anticuerpos monoclonales pueden ser generados por varias tecnologías conocidas como despliegue de fago, bacteria, levadura o de ribosoma, así como también métodos clásicos ejemplificados por anticuerpos derivados de hibridoma (por ejemplo, un anticuerpo secretado por un hibridoma preparado por tecnología de hibridoma, tal como el estándar de Kohler y metodología de hibridoma de Milstein ((1975) Nature 256:495-497).

En un anticuerpo de longitud completa, cada cadena pesada está comprendida de una región variable de cadena pesada (abreviada en la presente como HCVR o VH) y una región constante de cadena pesada (CH). La región constante de cadena pesada está comprendida de cuatro dominios--ya sea CH1, Bisagra, CH2, y CH3 (cadenas pesadas γ, α y δ), o CH1, CH2, CH3, y CH4 (cadenas pesadas μ y ε). Cada cadena ligera

está comprendida de una región variable de cadena ligera (abreviada en la presente como LCVR o VL) y una región constante de cadena ligera (CL). La región constante de cadena ligera está comprendida de un dominio, CL. Las regiones VH y VL pueden ser además subdivididas en regiones de hipervariabilidad, llamadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que son más conservadas, llamadas regiones de armazón (FR). Cada VH y VL está compuesta de tres CDRs y cuatro FRs, arregladas del término amino al término carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase.

El término "agente de unión al antígeno" o "agente de unión antigénica" como se usa en la presente, se refiere a uno o más fragmentos o porciones de un anticuerpo que retiene la capacidad para unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, aP2), o modificaciones sintéticas de fragmentos de anticuerpo que retienen la capacidad de unión deseada al antígeno. Se ha mostrado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo puede ser realizada por fragmentos o ciertas porciones de un anticuerpo de longitud completa, o modificaciones del mismo. Las modalidades incluyen formatos biespecíficos, específico dual y multi-específicos los cuales

pueden unirse específicamente a dos o más diferentes antígenos o a varios epítopos o regiones de epítopo discontinuas de un antígeno. Ejemplos no limitantes de agentes de unión al antígeno incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste de los dominios VL, VH, CL, y CH1; (ii) un fragmento F(ab')2, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab ligados por un puente disulfuro a la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste de los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste de los dominios VL y VH de una rama única de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546, Winter et al., Publicación PCT WO 90/05144 A1 en la presente incorporada por referencia), la cual comprende un dominio variable único; (vi) una región determinante de complementariedad aislada (CDR), (vii) fusiones de fragmentos de anticuerpo tales como aquellos que son inmunoglobulinas en carácter, por ejemplo, diacuerpo, scab, biespecíficos, triacuerpos, Fab-Fv, Fab-Fv-Fv, tricuerpo, (Fab-Fv)2-Fc, y (viii) porciones de anticuerpo tales como CDRs o bucles de anticuerpo injertadas en armazones no inmunoglobulina tales como fubronectina o cierres de leucina (véase Binz et al. (2005) Nat. Biotech. 23:1257-1268, incorporado en la presente). Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, son codificados por genes separados, pueden ser unidos, usando métodos recombinantes un otros, por un

enlazador sintético o que se origina naturalmente que les permite ser elaborados como una cadena de proteína única en las cual las regiones VL y VH se aparean para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena única (scFv); véase por ejemplo, Bird et al. (1988) Science 242:423-426; y Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Tales anticuerpos de cadena única también están propuestos para ser abarcados dentro del término agente de unión al antígeno. Otras formas de anticuerpos de cadena única, tales como diacuerpos también están abarcadas. Los diacuerpos son anticuerpos biespecíficos, bivalentes, en los cuales los dominios de VH y VL son expresados en una cadena de polipéptido único, pero usando un enlazador que es también corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena, de este modo forzando los dominios a aparearse con dominios complementarios de otra cadena y creando dos sitios de unión al antígeno (véase por ejemplo, Holliger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak, R. J., et al. (1994) Structure 2:1121-1123). Tales porciones de unión al anticuerpo se conocen en la técnica (Kontermann and Dubel eds., Antibody Engineering (2001) Springer-Verlag. New York. 790 pp. (ISBN 3-540-41354-5).

El término “constructo de anticuerpo” como se usa en la presente se refiere a un polipéptido que comprende una

o más de las porciones de unión al antígeno de la invención ligada a un polipéptido enlazador o a un dominio constante de inmunoglobulina. Los polipéptidos enlazadores comprenden dos o más residuos de aminoácido unidos por enlaces peptídicos y son usados para enlazarse a una o más porciones de unión al antígeno. Tales polipéptidos enlazadores son bien conocidos en la técnica (véase por ejemplo, Holliger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak, R. J., et al. (1994) Structure 2:1121-1123). Un dominio constante de inmunoglobulina se refiere a un dominio constante de cadena pesada o ligera, por ejemplo a dominios constantes humanos IgA, IgD, IgE, IgG o IgM. Las secuencias de aminoácido de dominio constante de cadena pesada y cadena ligera se conocen en la técnica. Ejemplos no limitantes de región constante γ1 de cadena pesada Ig y cadenas λ y κ de cadena ligera Ig se proporcionan en las Tablas 8 y 6, respectivamente.

Todavía además, un anticuerpo o porción de unión al antígeno del mismo, puede ser parte de una molécula de inmunoadhesión más grande, formada por asociación covalente o no covalente del anticuerpo o porción de anticuerpo con una o más de otras proteínas o péptidos. Ejemplos de tales moléculas de inmunoadhesión incluyen el uso de la región de núcleo de estreptavidina para hacer una molécula scFv tetramérica (Kipriyanov, S. M., et al. (1995) Human Antibodies adn Hybridomas 6:93-101) y el uso de un residuo de

cisteína, un péptido marcador y una etiqueta polihistidina C-terminal para hacer moléculas scFv bivalentes y biotiniladas (Kipriyanov, S. M., et al. (1994) Mol. Immunol. 31:1047-1058). Las porciones de anticuerpo, tales como fragmentos Fab y F(ab')2, pueden ser preparadas a partir de anticuerpos completos usando técnicas convencionales, tales como digestión de papaína o pepsina, respectivamente, de anticuerpos completos. Sin embargo, los anticuerpos, porciones de anticuerpo y moléculas de inmunoadhesión se pueden obtener usando técnicas de ADN recombinante estándar, como se describe en la presente.

Un "anticuerpo aislado", como se usa en la presente, está propuesto para referirse a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que específicamente se une a aP2 está sustancialmente libre de anticuerpos que específicamente unen antígenos distintos de aP2). Un anticuerpo aislado que específicamente se une a, por ejemplo, aP2 humana puede, sin embargo, tener reactividad cruzada a otros antígenos, tales como moléculas aP2 de otras especies. Sin embargo, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otros químicos y/o materiales celulares.

El término "anticuerpo injertado con CDR" se refiere a anticuerpos los cuales comprenden secuencias de

región variable de cadena pesada y ligera a partir de una especie pero en la cual las secuencias de una o más de las regiones CDR de VH y/o VL son reemplazadas con secuencias de CDR de otras especies, tales como anticuerpos que tienen regiones variables de cadena ligera y pesada humana en las cuales una o más de las CDRs humanas (por ejemplo, CDR3) han sido reemplazadas con secuencias CDR murinas.

Los términos "numeración Kabat", "definiciones Kabat" y "etiquetado Kabat" son usados intercambiablemente en la presente. Estos términos, los cuales son reconocidos en la técnica, se refieren a un sistema de numeración de residuos de aminoácido los cuales son más variables (es decir, hipervariables) que otros residuos de aminoácido en las regiones variables de cadena pesada y ligera de un anticuerpo, o una porción de unión al antígeno de la misma (Kabat et al. (1971) *Ann. NY Acad, Sci.* 190:382-391 y, Kabat, E. A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición*, U.S. Department de Health and Human Services, NIH Publicación No. 91-3242). Para la región variable de cadena pesada, la región hipervariable varía desde las posiciones de aminoácido 31-35 (CDR-H1), residuos 50-65 (CDR-H2) y residuos 95-102 (CDR-H3) de conformidad con el sistema de numeración Kabat. Sin embargo, de conformidad con Chothia (Chothia et al., (1987) J. Mol. Biol., 196, 901-917 (1987)), el bucle equivalente a CDR-H1 se extiende a

partir del residuo 26 hasta el residuo 32. De este modo a menos que se indique de otro modo "CDR-H1" como se emplea en la presente está propuesto para referirse a residuos 26 hasta 35, como se describe por una combinación del sistema de numeración de Kabat y la definición de bucle topológico de Chothia. Para la región variable de cadena ligera, la región hipervariable varía desde las posiciones de aminoácido 24 hasta 34 para la CDRL1, posiciones de aminoácido 50 hasta 56 para CDRL2, y posiciones de aminoácido 89 hasta 97 para CDRL3.

Como se usa en la presente, los términos "aceptor" y "anticuerpo aceptor" se refieren al anticuerpo o secuencia de ácido nucleico que proporciona o codifica al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o 100% de las secuencias de aminoácido de una o más de las regiones de armazón. En algunas modalidades, el término "aceptor" se refiere a la secuencia de ácido nucleico o aminoácido de anticuerpo que proporciona o codifica la(s) región(es) constante(s). En aún otra modalidad, el término "aceptor" se refiere a la secuencia de ácido nucleico o aminoácido de anticuerpo que proporciona o codifica uno o más de las regiones de armazón y la(s) región(es) constante(s). En una modalidad específica, el término "aceptor" se refiere a una secuencia humana de ácido nucleico o aminoácido de anticuerpo que proporciona o codifica al menos 80%, preferiblemente, al

menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98%, o 100% de las secuencias de aminoácido de uno o más de las regiones de armazón. De conformidad con esta modalidad, un aceptor puede contener al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, o al menos 10 residuos de aminoácido que (ocurre) no ocurren en una o más posiciones específicas de un anticuerpo humano. Una región de armazón aceptora y/o región(es) constantes aceptoras pueden ser, por ejemplo, derivadas u obtenidas a partir de un gen de anticuerpo de línea germinal, un gen de anticuerpo maduro, un anticuerpo funcional (por ejemplo, anticuerpos bien conocidos en la técnica, anticuerpo en desarrollo, o anticuerpos comercialmente disponibles).

Como se usa en la presente, el término "CDR" se refiere a la región determinante de complementariedad dentro de las secuencias variables de anticuerpo. Existen tres CDRs en cada una de las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera, las cuales son designadas CDRH1, CDRH2 y CDRH3 para la cadena pesada CDRs, y CDRL1, CDRL2, y CDRL3 para las CDRs de cadena ligera. El término "serie de CDR" como se usa en la presente se refiere a un grupo de tres CDRs que ocurren en una región variable única capaz de unirse al antígeno. Los límites exactos de estas CDRs han sido definidas de manera diferente de conformidad con diferentes sistemas. El sistema descrito por Kabat (Kabat et al.,

Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) y (1991)) no solamente proporciona un sistema de numeración de residuo no ambiguo aplicable a cualquier región variable de un anticuerpo, sino también proporciona límites de residuos precisos que definen las tres CDRs. Estas CDRs pueden ser referidas como CDRs de Kabat. Chothia y colaboradores (Chothia & Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987) y Chothia et al., Nature 342:877-883 (1989)) encontró que ciertas sub-porciones dentro de las CDRs de Kabat adoptan conformaciones de esqueleto de péptido casi idéntico, debido a que tienen mayor diversidad en el nivel de secuencia de aminoácido. Estas sub-porciones fueron designadas como L1, L2 y L3 o H1, H2 y H3 donde la "L" y the "H" designa las regiones de cadenas ligeras y cadenas pesadas, respectivamente. Estas regiones pueden ser referidas como CDRs de Chothia, las cuales tienen límites que se traslapan con las CDRs de Kabat. Otros límites que definen las CDRs que se traslapan con las CDRs de Kabat han sido descritas por Padlan (FASEB J. 9:133-139 (1995)) y MacCallum (J Mol Biol 262(5):732-45 (1996)). Todavía otras definiciones de límites de CDR pueden no seguir estrictamente uno de los sistemas anteriores, pero todavía no obstante traslaparse con las CDRs de Kabat, aunque pueden ser acortadas o alargadas en vista de la predicción o hallazgos experimentales que residuos particulares o grupos de residuos

o aún CDRs completas no impactan significantemente la unión al antígeno. Los métodos usados en la presente pueden utilizar CDRs definidas de conformidad con cualquiera de estos sistemas, aunque las modalidades preferidas usan Kabat o Chothia, o una mezcla de los mismos, definidas CDRs.

Como se usa en la presente, el término residuo "canónico" se refiere a un residuo en una CDR o armazón que define una estructura CDR canónica particular como se define por Chothia et al. (J. Mol. Biol. 196:901-907 (1987); Chothia et al., J. Mol. Biol. 227:799 (1992), ambas incorporadas en la presente por referencia). De conformidad con Chothia et al., las porciones críticas de las CDRs de muchos anticuerpos tienen conformaciones de esqueleto peptídico casi idéntico debido a la mayor diversidad en el nivel de secuencia de aminoácido. Cada estructura canónica especifica principalmente una serie de ángulos de torsión de esqueleto peptídico para un segmento contiguo de residuos de aminoácido formando un bucle.

Como se usa en la presente, los términos "donador" y "anticuerpo donador" se refieren a un anticuerpo que proporciona una o más CDRs. En una modalidad preferida, el anticuerpo donador es un anticuerpo a partir de una especie diferente del anticuerpo a partir del cual las regiones de armazón se obtienen o derivan. En el contexto de un anticuerpo humanizado, el término "anticuerpo donador" se

refiere a un anticuerpo no humano que proporciona una o más CDRs.

Como se usa en la presente, el término "armazón" o "secuencia de armazón" se refiere a las secuencias restantes de una región variable menos las CDRs. Debido a que la definición exacta de una secuencia CDR puede ser determinada por diferentes sistemas, el significado de una secuencia de armazón es sometido a interpretaciones correspondientemente diferentes. Las seis CDRs (CDR-L1, -L2, y -L3 de cadena ligera y CDR-H1, -H2, y -H3 de cadena pesada) también dividen las regiones de armazón en la cadena ligera y la cadena pesada en cuatro sub-regiones (FR1, FR2, FR3 y FR4) en cada cadena, en la cual la CDR1 está posicionada entre FR1 y FR2, CDR2 entre FR2 y FR3, y CDR3 entre FR3 y FR4. Sin especificar las sub-regiones particulares como FR1, FR2, FR3 o FR4, una región de armazón, como se refiere por otros, representa las FR combinados dentro de la región variable de una cadena de inmunoglobulina que se origina naturalmente, única. Como se usa en la presente, una FR representa una de las cuatro sub-regiones y las FRs representa dos o más de las cuatro sub-regiones que constituyen una región de armazón.

Las secuencias aceptoras de cadena ligera y cadena pesada humana se conocen en la técnica. En una modalidad de la invención las secuencias aceptoras de cadena pesada y cadena ligera humana se seleccionan a partir de las

secuencias descritas en las Tablas 4, 5, y 7. Diferentes combinaciones para secuencias de armazón humana FR1 a FR4 se describen en tales tablas.

Como se usa en la presente, el término "gen de anticuerpo de línea germinal" o "fragmento de gen" se refiere a una secuencia de inmunoglobulina codificada por células no linfoides que no se han sometido al proceso de maduración que conduce a reacomodo genético y mutación para expresión de una inmunoglobulina particular. Véase, por ejemplo, Shapiro et al., Crit. Rev. Immunol. 22(3): 183-200 (2002); Marchalonis et al., Adv Exp Med Biol. 484:13-30 (2001). Una de las ventajas proporcionadas por las varias modalidades de la presente invención toma ventaja del reconocimiento que los genes de anticuerpo de líneas germinales son más probablemente genes de anticuerpo maduros para conservar las estructuras de secuencia de aminoácido esenciales características de los individuos en las especies, por lo tanto es menos probable que se reconozca a partir de tal fuente extraña cuando se usa terapéuticamente en tales especies.

Como se usa en la presente, el término residuos "clave" se refiere a ciertos residuos dentro de la región variable que tienen más impacto en la especificidad de unión y/o afinidad de un anticuerpo, en particular un anticuerpo humanizado. Un residuo clave incluye, pero no se limita a,

uno o más de los siguientes: un residuo que es adyacente a una CDR, un sitio de glicosilación potencial (puede ser ya sea un sitio de glicosilación N- u O-), un residuo raro, un residuo capaz de interactuar con el antígeno, un residuo capaz de interactuar con una CDR, un residuo canónico, un residuo de contacto entre la región variable de cadena pesada y región variable de cadena ligera, un residuo dentro de la zona Vernier, y un residuo en la región que se traslapa entre la definición de Chothia de una cadena pesada variable CDR1 y la definición Kabat de la primera armazón de cadena pesada.

El término "anticuerpo humanizado" en general se refiere a anticuerpos los cuales comprenden secuencias de región variable de cadena pesada y ligera a partir de especies no humanas (por ejemplo, un conejo, ratón, etc.), pero en las cuales al menos una porción de la secuencia VH y/o VL ha sido alterada para ser más "parecida a humana", es decir, más similar a las secuencias variables de línea germinal humana. Un tipo de anticuerpo humanizado es un anticuerpo injertado con CDR, en el cual las secuencias CDR humanas son introducidas en secuencias VH y VL no humanas para reemplazar las secuencias CDR no humanas correspondientes. Otro tipo de anticuerpo humanizado es un anticuerpo CDR-injertado, en el cual al menos una CDR no humana es insertada en un armazón humano. La última es típicamente el enfoque de la presente invención.

En particular, el término "anticuerpo humanizado" como se usa en la presente, es un anticuerpo o una variante, derivado, análogo o fragmento del mismo el cual se une inmuno-específicamente a un antígeno de interés y el cual comprende una región de armazón (FR) que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácido de un anticuerpo humano y una región determinante de complementariedad (CDR) que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácido de un anticuerpo no humano. Como se usa en la presente, el término "sustancialmente" en el contexto de una CDR se refiere a una CDR que tiene una secuencia de aminoácido al menos 50, 55, 60, 65, 70, 75 o 80%, preferiblemente al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% idéntica con la secuencia de aminoácido de una CDR de anticuerpo no humano. En una modalidad, el anticuerpo humanizado tiene una región CDR que tiene una o más (por ejemplo 1, 2, 3 o 4) sustituciones, adiciones y/o supresiones de aminoácido en comparación con la CDR de anticuerpo no humano. Además, la CDR no humana puede ser diseñada para ser más "similar a humano" o compatible con el cuerpo humano, usando técnicas conocidas. Un anticuerpo humanizado comprende sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables (Fab, Fab', F(ab')2, F(ab')c, Fv) en los cuales todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a aquellas de una inmunoglobulina no humana (es decir,

anticuerpo donador) y todas o sustancialmente todas de las regiones de armazón son aquellas de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. Preferiblemente, un anticuerpo humanizado también comprende al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente aquella de una inmunoglobulina humana. En algunas modalidades, un anticuerpo humanizado contiene tanto la cadena ligera así como también al menos el dominio variable de una cadena pesada. El anticuerpo también puede incluir la CH1, bisagra, CH2, y CH3, o CH1, CH2, CH3, y CH4 de la cadena pesada. En algunas modalidades, un anticuerpo humanizado solamente contiene una cadena ligera humanizada. En algunas modalidades, un anticuerpo humanizado solamente contiene una cadena pesada humanizada. En modalidades específicas, un anticuerpo humanizado solamente contiene un dominio variable humanizado de una cadena ligera y/o pesada humanizada.

El anticuerpo humanizado puede ser seleccionado a partir de cualquier clase de inmunoglobulinas, que incluyen IgY, IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, y cualquier isotipo, que incluye sin limitación IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. El anticuerpo humanizado puede comprender secuencias de más de una clase o isotipo, y dominios constantes particulares pueden ser seleccionados para optimizar las funciones efectoras deseadas usando técnicas bien conocidas en la técnica.

Las regiones de armazón y CDR de un anticuerpo humanizado no necesitan corresponder precisamente a las secuencias precursoras, por ejemplo, la CDR de anticuerpo donador o el armazón consenso puede ser mutagenizado por sustitución, inserción y/o supresión de al menos un residuo de aminoácido de manera que la CDR o residuo de armazón en tal sitio no corresponde exactamente a ya sea el anticuerpo donador o el armazón consenso. En una modalidad preferida, tales mutaciones, sin embargo, no serán extensivas. Usualmente, al menos 50, 55, 60, 65, 70, 75 o 80%, preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90%, y muy preferiblemente al menos 95%, 98% o 99% de los residuos de anticuerpo humanizado corresponderán a aquellos de las secuencias FR y CDR parentales. En una modalidad, uno o más (por ejemplo 1, 2, 3 o 4) sustituciones, adiciones y/o supresiones de aminoácido pueden estar presentes en el anticuerpo humanizado comparado con las secuencias FR y CDR parentales. Como se usa en la presente, el término "armazón consenso" se refiere a la región de armazón en la secuencia de inmunoglobulina consenso. Como se usa en la presente, el término "secuencia de inmunoglobulina consenso" se refiere a la secuencia formada a partir de los aminoácidos que se originan más frecuentemente (o nucleótidos) en una familia de secuencias de inmunoglobulinas relacionadas (véase por ejemplo, Winnaker, From Genes to Clones (Verlagsgesellschaft,

Weinheim, Germany 1987). En una familia de inmunoglobulinas, cada posición en la secuencia consenso está ocupada por el aminoácido que se origina más frecuentemente en tal posición en la familia. Si dos aminoácidos ocurren igualmente frecuentemente, cualquiera puede ser incluida en la secuencia consenso.

Como se usa en la presente, zona "Vernier" se refiere a una subserie de residuos de armazón que pueden ajustarse a la estructura de CDR y ajutarse fino para acoplarse al antígeno como se describe por Foote y Winter (1992, J. Mol. Biol. 224:487-499, la cual es incorporada en la presente por referencia). Los residuos de la zona Vernier forman una capa subyacente a la CDRs y puede impactar en la estructura de las CDRs y la afinidad del anticuerpo.

Como se usa en la presente, el término "neutralizante" se refiere a neutralización de la actividad biológica de la proteína aP2, por ejemplo, la proteína aP2 secretada, cuando un anticuerpo descrito en la presente específicamente se une a la proteína aP2. La neutralización puede ser el resultado de diferentes formas de unión de tal anticuerpo a aP2. Preferiblemente un anticuerpo neutralizante es un anticuerpo cuya unión a aP2 resulta en la neutralización de una actividad biológica de aP2. Preferiblemente la proteína de unión neutralizante se une a aP2 y reduce la actividad biológica de aP2 por al menos

aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 50%, 60%, 80%, 85%, o más. La neutralización de la actividad biológica de aP2 por un anticuerpo neutralizante puede ser evaluada midiendo uno o más indicadores de la actividad biológica de aP2 descritos en la presente.

Un "anticuerpo monoclonal neutralizante" como se usa en la presente está propuesto para referirse a una preparación de moléculas de anticuerpo, las cuales después de la unión a aP2 son capaces de inhibir o reducir la actividad biológica de aP2 ya sea parcialmente o completamente.

Como se usa en la presente, el término "atenuación", "atenuado", y similares, se refiere a la disminución o reducción en la severidad de un síntoma o condición causado por los niveles de aP2 en suero elevados.

El término "epítopo" o "determinante antigénico" incluye cualquier determinante de polipéptido capaz de unión específica a un receptor de células T o inmunoglobulina. En ciertas modalidades, las determinantes de epítopos incluyen agrupamientos de superficie químicamente activos de moléculas tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcar, fosforilo, o sulfonilo, y, en ciertas modalidades, pueden tener características estructurales tridimensionales específicas, y/o características de carga específica. Un epítopo es una región de un antígeno que está unida por un anticuerpo. En ciertas modalidades, un anticuerpo se dice se

une específicamente a un antígeno cuando reconoce preferiblemente su antígeno objetivo en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas.

El término "K_{asoc}", como se usa en la presente, está propuesto para referirse a la constante de activación para la asociación de un anticuerpo con el antígeno para formar el complejo de anticuerpo/antígeno como se conoce en la técnica.

El término "K_{disoc}", como se usa en la presente, está propuesto para referirse a la constante de velocidad de disociación para la disociación de un anticuerpo a partir del complejo de anticuerpo/antígeno como se conoce en la técnica.

El término "K_d", como se usa en la presente, está propuesto para referirse a la constante de disociación de una interacción de anticuerpo-antígeno particular como se conoce en la técnica.

La intensidad, o afinidad de interacciones de unión inmunológicas pueden ser expresadas en términos de la constante de disociación (K_d) de la interacción, en donde una k_d más pequeña representa una afinidad mayor o superior. Las propiedades de unión inmunológica de polipéptidos seleccionados pueden ser cuantificadas usando métodos bien conocidos en la técnica. Uno de tales métodos involucra medir las velocidades de formación de complejo de antígeno/sitio de unión al antígeno y disociación, en donde estas velocidades dependen de las concentraciones de los asociados del

complejo, la afinidad de la interacción, y parámetros geométricos que influencian igualmente la velocidad en ambas direcciones. De este modo, tanto la "constante de velocidad de asociación" ("K_{asoc}") como la "constante de velocidad de disociación" ("K_{disoc}") pueden ser determinadas calculando las concentraciones y las velocidades actuales de asociación y disociación. (Nature 361:186-87 (1993)). La relación de K_{asoc}/K_{disoc} permite la cancelación de todos los parámetros no relacionados con la afinidad, y es igual a la constante de disoaciación K_d. Davies et al. (1990) Annual Rev Biochem 59:439-473.

El término "KD", como se usa en la presente, está propuesto para referirse a la Afinidad (o constante de afinidad), la cual es una medida de la velocidad de unión (asociación y disociación) entre el anticuerpo y antígeno, determinando la resistencia de unión intrínseca de la reacción de unión del anticuerpo.

El término "conjugado de anticuerpo" se refiere a una proteína de unión, tal como un anticuerpo o fragmento de anticuerpo o porción de unión del mismo, químicamente ligado a una segunda porción química, tal como un agente terapéutico o citotóxico. El término "agente" es usado en la presente para denotar un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una molécula biológica, o un extracto elaborado a partir de los materiales biológicos.

Los términos “cristal”, y “cristalizado” como se usan en la presente, se refieren a un anticuerpo, o porción de unión al antígeno, que existe en la forma de un cristal. Los cristales son una forma del estado de la materia sólido, el cual es distinto de otras formas tales como el estado sólido amorfo o el estado cristalino líquido. Los cristales están compuestos de arreglos de átomos tridimensionales, de repetición, regulares, iones, moléculas (por ejemplo, proteínas tales como anticuerpos), o ensambles moleculares (por ejemplo, complejos de antígeno/anticuerpo). Estos arreglos tridimensionales son dispuestos de conformidad con las relaciones matemáticas específicas que son bien entendidas en el campo. La unidad fundamental, o bloque de construcción, que se repite en un cristal es llamado la unidad asimétrica. La repetición de la unidad asimétrica en un arreglo que se conforma a una simetría cristalográfica bien definida, dada, proporciona la “célula unitaria” del cristal. La repetición de la célula unitaria por traducciones regulares en las tres dimensiones proporciona el cristal. Véase Giege, R. and Ducruix, A. Barrett, Crystallization of Nucleic Acids of Proteins, a Practical Approach, 2nd ea., pp. 1-16, Oxford University Press, New York, N.Y., (1999).”

El término “polinucleótido” como se refiere en la presente significa una forma polimérica de dos o más nucleótidos, ya sea ribonucleótidos o desoxinucleótidos o una

forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. El término incluye formas de ADN de hebra única y doble, pero preferiblemente es ADN de doble hebra.

El término "polinucleótido aislado" como se usa en la presente significa un polinucleótido (por ejemplo, genómico, cADN, o de origen sintético, o algunas combinaciones de los mismos) que, en virtud de su origen, el "polinucleótido aislado" no está asociada con toda o una porción de un polinucleótido con la cual el "polinucleótido aislado" se encuentra en la naturaleza; está operablemente ligado a un polinucleótido que no está ligado en la naturaleza; o no ocurre en la naturaleza como parte de una secuencia más grande.

El término "vector," como se usa en la presente, está propuesto para referirse a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al cual ha sido ligado. Un tipo de vector es un "plásmido", el cual se refiere a un bucle de ADN de doble hebra circular en el cual, segmentos de ADN adicionales pueden ser ligados. Otro tipo de vector es un vector viral, en donde segmentos de ADN adicionales pueden ser ligados en el genoma viral. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula hospedera en la cual son introducidos (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores de mamífero episomales). Otros vectores (por

ejemplo, vectores de mamífero no episomales) pueden ser integrados en el genoma de una célula hospedera después de la introducción en la célula hospedera, y de este modo son replicados junto con el genoma hospedero. Sin embargo, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los cuales están operativamente ligados. Tales vectores son referidos en la presente como "vectores de expresión recombinante (o simplemente, "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante están a menudo en la forma de plásmidos. En la presente especificación, "plásmido" y "vector" pueden ser usados intercambiablemente ya que el plásmido es la forma de vector más comúnmente usada. Sin embargo, la invención está propuesta para incluir tales otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (por ejemplo, retrovirus de replicación defectiva, adenovirus, y virus adeno-asociados), los cuales sirven a las funciones equivalentes.

El término "operablemente ligado" se refiere a una yuxtaposición en donde los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar en su manera propuesta. Una secuencia de control "operablemente ligada" a una secuencia codificante está ligada en tal forma que la expresión de la secuencia codificante se logra bajo condiciones compatibles con las secuencias de control.

Secuencias “operablemente ligadas” incluyen tanto secuencias de control de expresión que son contiguas con el gen de interés como secuencias de control de expresión que actúan en trans o en una distancia para controlar el gen de interés. El término “secuencia de control de expresión” como se usa en la presente se refiere a secuencias de polinucleótido, las cuales son necesarias para efectuar la expresión y procesamiento de secuencias codificantes a las cuales están ligadas. Las secuencias de control de expresión incluyen iniciación, terminación, promotor y secuencias mejoradoras de la transcripción apropiadas; las señales de procesamiento de ARN eficientes tales como señales de poliadenilación y empalme; secuencias que estabilizan el mARN citoplásmico; secuencias que mejoran la eficiencia de la traducción (es decir, secuencia consenso Kozak); secuencias que mejoran la estabilidad de la proteína; y cuando se desee, secuencias que mejoran la secreción de la proteína. La naturaleza de tales diferentes secuencias de control depende del organismo hospedero; en procariotas, tales secuencias de control en general incluyen promotor, sitio de unión ribosomal, y secuencia de terminación de la transcripción; en eucariotas, en general, tales secuencias de control incluyen promotores y secuencias de terminación de la transcripción. El término “secuencias de control” está propuesto para incluir componentes cuya presencia es esencial para la expresión y

procesamiento, y también pueden incluir componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, secuencias líderes y secuencias de patrón de fusión.

"Transformación", como se define en la presente, se refiere a cualquier proceso por el cual el ADN exógeno entra a una célula hospedera. La transformación puede ocurrir bajo condiciones naturales o artificiales usando varios métodos bien conocidos en la técnica. La transformación puede depender de cualquier método conocido para la inserción de secuencias de ácido nucleico extrañas en una célula hospedera procariótica o eucariótica. El método es seleccionado con base en la célula hospedera siendo transformada y puede incluir, pero no se limita a, infección viral, electroporación, lipofección, y bombardeo de partículas. Tales células "transformadas" incluyen células establemente transformadas en las cuales el ADN insertado es capaz de replicación ya sea como un plásmido que se replica de manera autónoma o como parte del cromosoma hospedero. También incluye células, las cuales expresan temporalmente el ADN o ARN insertado por periodos de tiempo limitados.

El término "célula hospedera recombinante" (o simplemente "célula hospedera"), como se usa en la presente, está propuesto para referirse a una célula en la cual el ADN exógeno ha sido introducido. Se debe entender que tales términos están propuestos para referirse no solamente a la

célula objetivo particular, sino, a la progenie de tal célula. Debido a que pueden ocurrir ciertas modificaciones en generaciones sucesivas debido a ya sea mutación o influencias ambientales, tal progenie no puede, en efecto, ser idéntica a la célula precursora, sino todavía estar incluida dentro del alcance del término "célula hospedera" como se usa en la presente. Preferiblemente, las células hospederas incluyen células procarióticas y eucarióticas seleccionadas a partir de cualquiera de los Reinos de vida. Las células eucarióticas preferidas incluyen células protistas, fúngicas, vegetales y animales. Más preferiblemente, las células hospederas incluyen pero no se limitan a la línea de células procarióticas de *E. coli*; líneas de células de mamífero CHO, HEK 293 y COS; la línea de células de insecto Sf9; y la célula fúngica de *Saccharomyces cerevisiae*.

Las técnicas estándares pueden ser usadas para ADN recombinante, síntesis de oligonucleótido, y cultivo de tejidos y transformación (por ejemplo, electroporación, lipofección). Las reacciones enzimáticas y técnicas de purificación pueden ser realizadas de conformidad con las especificaciones del fabricante o como se realiza comúnmente en la técnica o como se describe en la presente. Las técnicas y procedimientos anteriores pueden en general, ser realizados de conformidad con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en varias referencias generales

y más específicas que son citadas y discutidas a través de la presente especificación. Véase por ejemplo, Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)), la cual es incorporada en la presente por referencia para cualquier propósito.

Como se usa en la presente, el término "cantidad efectiva" se refiere a la cantidad de una terapia la cual es suficiente para reducir o aliviar la severidad y/o duración de un trastorno o uno o más síntomas el mismo, prevenir el avance de un trastorno, causar la regresión de un trastorno, prevenir la recurrencia, desarrollo, comienzo o progreso de uno o más síntomas asociados con un trastorno, detectar un trastorno, o potenciar o mejorar el(los) efecto(s) terapéutico(s) o profiláctico(s) de otra terapia (por ejemplo, agente profiláctico o terapéutico).

Proteína aP2

Las proteínas de unión al ácido graso (FABPs, por sus siglas en inglés) son miembros de la superfamilia de proteínas de unión lípida (LBP, por sus siglas en inglés). Nueve FABPs diferentes se han identificado hasta la fecha, cada una muestra enriquecimiento tisular relativo: L (hepático), I (intestinal), H (músculo y corazón), A (adipocito), E (epidermal), Il (ileal), B (cerebro), M (mielina) y T (testículos). El papel primario de todos los

miembros de la familia FABP es la regulación de la absorción de ácido graso y el transporte intracelular. La estructura de todas las FABPs es similar - la porción básica que caracteriza estas proteínas es el barril-β, y un ligando único (por ejemplo, un ácido graso, colesterol, o retinoide) está unida en su cavidad interna llena de agua.

La proteína aP2 de unión al ácido graso del adipocito regula el metabolismo lípido y glucosa sistémica, y ha sido implicada en la patología de muchas enfermedades inmunometabólicas, tales como diabetes y aterosclerosis. Mientras aP2 ha sido clásicamente considerada una proteína citosólica, se ha encontrado por ser una adipocina activa que contribuye a hiperglicemia promoviendo la gluconeogénesis hepática. Los niveles de aP2 en suero se han encontrado por estar marcadamente elevados en obesidad humana y de ratón.

La proteína aP2 humana es una proteína de unión lípida intracelular y extracelular (secretada) de 14.7 kDa que consiste de 132 aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácido (Seq. ID No. 1) de la Tabla 1. La secuencia de cADN de aP2 humana fue previamente descrita en Baxa, C. A., Sha, R. S., Buelt, M. K., Smith, A. J., Matarese, V., Chinander, L. L., Boundy, K. L., Bernlohr, A. Human adipocyte lipid-binding protein: purification of the protein and cloning of its complementary DNA. Biochemistry 28: 8683-8690, 1989, y se proporciona en la Seq. ID No. 5. La proteína

humana es registrada en el Swiss-Prot bajo el número P15090.

La secuencia de proteína aP2 de ratón comprende la secuencia de aminoácido de la Seq. ID No. 2 de la Tabla 1. La secuencia de cADN de aP2 de ratón se proporciona en la Seq. ID No. 6. La proteína de ratón es registrada en el Swiss-Prot bajo el número P04117.

Tanto la proteína aP2 de ratón como humana incluye al menos dos dominios conservados mayores: una señal de localización nuclear de 11 aminoácidos (aa22-32: kevgvgfatrk (Seq. ID No. 3)); y una región de unión de ácido graso de tres aminoácidos (aa127-129: rvy (Seq. ID No. 4)).

Tabla 1: Proteína aP2 y Secuencias de cADN

Proteína o cADN	**Seq. ID No.**	**SECUENCIA**
Proteína de unión-ácido graso, adipocito (FABP4/aP2)[H. sapiens]	1	MCDAFVGTWKLVSSENFDDYMKEVGVGFATRKVAG MAKPNMIISVNGDVITIKSESTFKNTEISFILGQE FDEVTADDRKVKSTITLDGGVLVHVQKWDGKSTTI KRKREDDKLVVECVMKGVTSTRVYERA
Proteína de unión-ácido graso, adipocito (FABP4/aP2 [*M. musculus*])	2	MCDAFVGTWKLVSSENFDDYMKEVGVGFATRKVAG MAKPNMIISVNGDLVTIRSESTFKNTEISFKLGVE FDEITADDRKVKSIITLDGGALVQVQKWDGKSTTI KRKRDGDKLVVECVMKGVTSTRVYERA
secuencia de aminoácido de localización nuclear aP2	3	KEVGVGFATRK
secuencia de	4	RVY

Proteína o cADN	**Seq. ID No.**	**SECUENCIA**
aminoácido de dominio de unión al ácido graso aP2		
Proteína de unión-ácido graso, adipocito (FABP4/aP2)[*H. sapiens*] cADN	5	ATGTGTGATGCTTTTGTAGGTACCTGGAAACTTGT CTCCAGTGAAAACTTTGATGATTATATGAAAGAAG TAGGAGTGGGCTTTGCCACCAGGAAAGTGGCTGGC ATGGCCAAACCTAACATGATCATCAGTGTGAATGG GGATGTGATCACCATTAAATCTGAAAGTACCTTTA AAAATACTGAGATTTCCTTCATACTGGGCCAGGAA TTTGACGAAGTCACTGCAGATGACAGGAAAGTCAA GAGCACCATAACCTTAGATGGGGGTGTCCTGGTAC ATGTGCAGAAATGGGATGG AAAATCAACCACCATAAAGAGAAAACGAGAGGATG ATAAACTGGTGGTGGAATGCGTCATGAAAGGCGTC ACTTCCACGAGAGTTTATGAGAGAGCATAA
Proteína de unión-ácido graso, adipocito (FABP4/aP2 [*M. musculus*]) cADN	6	ATGTGTGATGCCTTTGTGGGAACCTGGAAGCTTGT CTCCAGTGAAAACTTCGATGATTACATGAAAGAAG TGGGAGTGGGCTTTGCCACAAGGAAAGTGGCAGGC ATGGCCAAGCCCAACATGATCATCAGCGTAAATGG GGATTTGGTCACCATCCGGTCAGAGAGTACTTTTA AAAACACCGAGATTTCCTTCAAACTGGGCGTGGAA TTCGATGAAATCACCGCAGACGACAGGAAGGTGAA GAGCATCATAACCCTAGATGGCGGGGCCCTGGTGC AGGTGCAGAAGTGGGATGGAAAGTCGACCACAATA AAGAGAAAACGAGATGGTGACAAGCTGGTGGTGGA ATGTGTTATGAAAGGCGTGACTTCCACAAGAGTTT ATGAAAGGGCATGA

Epítopos de Unión a aP2

En un aspecto de la invención, se proporcionan

moléculas de anticuerpo monoclonal anti-aP2, que incluyen anticuerpos monoclonales humanizados, y agentes de unión al antígeno, que se unen específicamente a aP2 humana o aP2 de ratón en aminoácidos identificados, específicos dentro de la molécula aP2 mientras se pliega en su forma conformacional, nativa o de complejo con su patrón de unión natural.

En una modalidad, el anticuerpo monoclonal anti-aP2 se une a aP2 humana que tiene la secuencia de aminoácido:

MCDAFVGTW**K LVS**SENFDDY MKEVGVGFAT RKVAGM**AK**PN MIISVNGDVI TIKSES**T**FKN TEISFILGQE FDEVTADDRK VKSTITLDGG VLVHVQKWDG KSTTIKRKRE DDKLVVECVM KGVTSTRVY**E** R**A** (Seq. ID. No 1),

o una variante de la misma que se origina naturalmente.

En una modalidad alternativa, el anticuerpo monoclonal anti-aP2 o agente de unión al antígeno se une a una aP2 humana que tiene una secuencia de aminoácido que es al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntica a la Seq. ID No. 1. En una modalidad, el anticuerpo tiene una KD para aP2 de $\geq 10^{-7}$ M. En una modalidad, el anticuerpo se une a un epítopo seleccionado a partir de una secuencia de aminoácido subrayada en la Seq. ID No. 1 anterior y tiene una KD para aP2 de aproximadamente $\geq 10^{-7}$ M. En una modalidad, el anticuerpo se une a un epítopo que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, o 4) sustituciones, adiciones, o

supresiones de aminoácido comparadas con la Seq. ID. No. 1.

Epítopos de Unión a aP2 como se Determina por Cristalografía de rayos-X

En una modalidad, el agente de unión al antígeno o anticuerpo anti-aP2 interactúa directamente con uno o más, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9, aminoácidos en negrita en la Seq. ID No. 1 anterior dentro de una distancia de 3 o 4 Angströms. En otra modalidad, el anticuerpo monoclonal anti-aP2 o agente de unión al antígeno contacta los nueve aminoácidos en negrita en la Seq. ID No. 1 anterior dentro de una distancia de 3 o 4 Angströms.

En una modalidad, el anticuerpo monoclonal anti-aP2 purificado se une a un epítopo no contiguo de aP2 humano y/o de ratón que comprende al menos uno o más, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9 residuos de aminoácido seleccionados a partir de 10K, 11L, 12V, 13S, 37A, 38K, 57T, 130E, y 132A (en negrita en la Seq. ID No. 1, anterior), o un residuo de aminoácido dentro de aproximadamente 4 angströms de cualquiera de 10K, 11L, 12V, 13S, 37A, 38K, 57T, 130E, y 132A. En una modalidad, el anticuerpo monoclonal anti-aP2 purificado se une a un epítopo de aP2 humana que comprende al menos uno o más, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9, residuos de aminoácido seleccionados a partir de 10K, 11L, 12V, 13S, 37A, 38K, 57T, 130E, y 132A (en negrita en la Seq. ID No. 1, anterior), o un residuo de aminoácido dentro de

aproximadamente 4 angströms de cualquiera de 10K, 11L, 12V, 13S, 37A, 38K, 57T, 130E, y 132A y tiene una KD para aP2 de ≥ 10^{-7} M.

En una modalidad alternativa, el anticuerpo monoclonal anti-aP2 purificado se une a un epítopo de aP2 humano y/o de ratón que comprende al menos uno o más, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, o 7, residuos de aminoácido seleccionados a partir de 10K, 11L, 12V, 13S, 38K, 130E, o 132A (en negrita en la Seq. ID No. 1, anterior), o un residuo de aminoácido dentro de aproximadamente 4 angströms de cualquiera de 10K, 11L, 12V, 13S, 38K, 130E, o 132A. En una modalidad, el anticuerpo monoclonal anti-aP2 purificado se une a un epítopo de aP2 humana que comprende al menos uno o más, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, o 7, residuos de aminoácido seleccionados a partir de 10K, 11L, 12V, 13S, 38K, 130E, o 132A (en negrita en la Seq. ID No. 1, anterior), o un residuo de aminoácido dentro de aproximadamente 4 angströms de cualquiera de 10K, 11L, 12V, 13S, 38K, 130E, o 132A y tiene una KD para aP2 de ≥ 10^{-7} M. En una modalidad, el anticuerpo además se une a 37A y/o 57T.

En una modalidad, la cadena ligera del anticuerpo se une a un epítopo de aP2 humana que comprende al menos uno o más, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9, residuos de aminoácido seleccionados a partir de 10K, 11L, 12V, 13S, 37A, 38K, 57T, 130E, o 132A, o un residuo de aminoácido dentro de

aproximadamente 4 angströms del mismo, y tiene una kD de al menos aproximadamente ≥ 10^{-7} M. En una modalidad, la cadena ligera del anticuerpo se une a un epítopo de aP2 humana que comprende al menos uno o más, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, o 7, residuos de aminoácido seleccionados a partir de 10K, 11L, 12V, 13S, 37A, 38K, 57T, 130E, o 132A, o un residuo de aminoácido dentro de aproximadamente 4 angströms del mismo, y tiene una kD de al menos aproximadamente ≥ 10^{-7} M.

En una modalidad, la cadena ligera del anticuerpo se une a un epítopo de aP2 humana que comprende al menos uno o más, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9, residuos de aminoácido seleccionados a partir de 10K, 11L, 12V, 13S, 37A, 38K, 57T, 130E, o 132A, o un residuo de aminoácido dentro de aproximadamente 4 angströms del mismo, y la cadena pesada del anticuerpo se une a un epítopo de aP2 humana que comprende al menos uno de 10K y 132A, o un aminoácido dentro de aproximadamente 4 angströms del mismo. En una modalidad, el anticuerpo tiene una kD de al menos aproximadamente ≥ 10^{-7} M.

En una modalidad, la cadena ligera del anticuerpo se une a un epítopo de aP2 humana que comprende al menos uno o más, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, o 7, residuos de aminoácido seleccionados a partir de 10K, 11L, 12V, 13S, 38K, 130E, o 132A, o un residuo de aminoácido dentro de aproximadamente 4 angströms del mismo, y la cadena pesada del anticuerpo se une a un epítopo de aP2 humana que comprende al

menos one de 10K y 132A, o un aminoácido dentro de aproximadamente 4 angströms del mismo, y tiene una kD de al menos aproximadamente ≥ 10^{-7} M.

En una modalidad, el anticuerpo se une a la proteína aP2 humana en su conformación nativa al menos a 10K. En una modalidad, el anticuerpo se une a la proteína aP2 humana en su conformación nativa al menos a 38K. En una modalidad, el anticuerpo se une a la proteína aP2 humana en su conformación nativa al menos a 12V. En una modalidad, el anticuerpo se une a la proteína aP2 humana en su conformación nativa al menos a 11L. En una modalidad, el anticuerpo se une a la proteína aP2 humana en su conformación nativa al menos a 130E. En una modalidad, el anticuerpo se une a la proteína aP2 humana en su conformación nativa al menos a 132A. En una modalidad, el anticuerpo se une a la proteína aP2 humana en su conformación nativa al menos a 13S. En una modalidad, el anticuerpo se une a la proteína aP2 humana en su conformación nativa al menos a 11L y 12V. En una modalidad, el anticuerpo se une a la proteína aP2 humana en su conformación nativa al menos a 130E y 132A. En una modalidad, el anticuerpo se une a la proteína aP2 humana en su conformación nativa en un aminoácido específico descrito anteriormente y tiene una KD de aproximadamente ≥ 10^{-7} M.

En una modalidad, el anticuerpo se une a la proteína aP2 humana en su conformación nativa al menos a 10K

y 38K. En una modalidad, el anticuerpo se une a la proteína aP2 humana en su conformación nativa al menos a 10K, 38K, y 12V. En una modalidad, el anticuerpo se une a la proteína aP2 humana en su conformación nativa al menos a 10K, 38K, 12V, y 11L. En una modalidad, el anticuerpo se une a la proteína aP2 humana en su conformación nativa al menos a 10K, 38K, 12V, 11L, y 57T. En una modalidad, el anticuerpo se une a la proteína aP2 humana en su conformación nativa al menos a 10K, 38K, 12V, 11L, 57T, y 37A. En una modalidad, el anticuerpo se une a la proteína aP2 humana en su conformación nativa al menos a 10K, 38K, 12V, 11L, 57T, 37A, y 130E. En una modalidad, el anticuerpo se une a la proteína aP2 humana en su conformación nativa al menos a 10K, 38K, 12V, 11L, 57T, 37A, 130E, y 132A. En una modalidad, el anticuerpo se une a la proteína aP2 humana en su conformación nativa al menos a 10K, 38K, 12V, 11L, 57T, 37A, 130E, 132A, y 13S.

También se proporciona en la presente una región o epítopo específico de aP2 humana la cual está unida por un anticuerpo proporcionado por la presente invención, en particular un epítopo unido por el anticuerpo que comprende la secuencia variable de cadena ligera 909gL1 (Seq. ID No. 446), 909gL10 (Seq. ID No. 448), 909gL13 (Seq. ID No. 487), 909gL50 (Seq. ID No. 488), 909gL54 (Seq. ID No. 450), o 909gL55 (Seq. ID No. 452), y/o la secuencia variable de cadena pesada 909gH1 (Seq. ID No. 455), 909gH14 (Seq. ID No.

457), 909gH15 (Seq. ID No. 459), 909gH61 (Seq. ID No. 461), o 909gH62 (Seq. ID No. 463).

Esta región o epítopo específico de la proteína aP2 humana proporcionados en la presente puede ser identificada por cualquier método de mapeo de epítopo adecuado conocido en la técnica en combinación con cualquiera de los anticuerpos proporcionados por la presente invención. Ejemplos de tales métodos incluyen seleccionar péptidos de longitudes variantes derivados de aP2 para unión al anticuerpo de la presente invención con el fragmento más pequeño que puede unirse específicamente al anticuerpo que contiene la secuencia del epítopo reconocido por el anticuerpo. Los péptidos aP2 pueden ser producidos sintéticamente o por digestión proteolítica de la proteína aP2. Los péptidos que se unen al anticuerpo pueden ser identificados mediante, por ejemplo, análisis espectrométrico de masas. En otro ejemplo, espectroscopía de NMR o cristalografía de rayos-X pueden ser usados para identificar el epítopo unido por un anticuerpo de la presente invención. La cristalización y técnicas de cristalografía de rayos-X para determinar la estructura de aP2 e interacciones específicas de la proteína aP2 con sus patrones de unión natural, por ejemplo, ácidos grasos de cadena larga y cadena media, se describen en Marr et al., Expression, purification, crystallization and structure of human adipocito lipid-binding protein (aP2), Acta Cryst. (2006), F62, 1058-1060.

Una vez identificado, el fragmento epitópico el cual se une a un anticuerpo de la presente invención puede ser usado, si se desea, como un inmunógeno para obtener anticuerpos adicionales los cuales se unen al mismo epítopo.

En un ejemplo el epítopo de la molécula de anticuerpo es determinado por cristalografía de rayos-X usando la proteína aP2 (Seq. ID No. 1).

En una modalidad, el anticuerpo de la presente invención comprende al menos uno o más aminoácidos específicos dentro de un dominio CDR como se define en la Tabla 2 que interactúa con una proteína aP2 humana o de ratón en su conformación nativa en el punto de contacto de aminoácido definido en la Tabla 2.

Tabla 2: Puntos de contacto de proteína aP2/anticuerpo anti-aP2

Cadena Ab	**CDR Ab**	**Aminoácido Ab**	**Átomo de fuente Ab**	**Aminoácido aP2**	**Átomo objetivo aP2**	**Distancia (angströms)**
Ligera	CDRL3	92Tyr	C	10Lys	C	3.72
Ligera	CDRL3	92Tyr	C	10Lys	C	3.92
Ligera	CDRL3	92Tyr	O	10Lys	C	3.66
Ligera	CDRL3	93Gly	N	10Lys	C	3.30
Ligera	CDRL3	93Gly	C	10Lys	C	3.65
Ligera	CDRL3	93Gly	C	10Lys	C	3.67
Ligera	CDRL3	94Thr	N	10Lys	C	3.74
Ligera	CDRL3	92Tyr	C	10Lys	C	3.25

Cadena Ab	CDR Ab	Aminoácido Ab	Átomo de fuente Ab	Aminoácido aP2	Átomo objetivo aP2	Distancia (angströms)
Ligera	CDRL3	92Tyr	C	10Lys	C	3.85
Ligera	CDRL3	92Tyr	C	10Lys	C	3.14
Ligera	CDRL3	94Thr	O	10Lys	C	3.31
Heavy		104Leu*	C	10Lys	N	3.06
Ligera	CDRL3	93Gly	N	10Lys	N	2.74
Ligera	CDRL3	93Gly	C	10Lys	N	3.64
Ligera	CDRL3	92Tyr	C	10Lys	N	3.37
Ligera	CDRL3	92Tyr	C	10Lys	N	3.32
Ligera	CDRL3	92Tyr	C	10Lys	N	3.02
Ligera	CDRL3	92Tyr	C	10Lys	N	3.87
Ligera	CDRL3	92Tyr	C	10Lys	N	3.35
Ligera	CDRL3	92Tyr	C	10Lys	N	3.88
Ligera	CDRL3	92Tyr	C	10Lys	N	3.29
Ligera	CDRL3	92Tyr	C	10Lys	N	3.82
Ligera	CDRL3	92Tyr	O	11Leu	N	3.77
Ligera	CDRL3			11Leu	C	3.93
Ligera	CDRL3			11Leu	C	3.95
Ligera	CDRL3			11Leu	C	3.46
Ligera	CDRL3	92Tyr	C	11Leu	O	3.51
Ligera	CDRL3	92Tyr	C	11Leu	O	3.82
Ligera	CDRL3	92Tyr	O	11Leu	O	2.40
Ligera	CDRL3	95Tyr	C	11Leu	O	3.60
Ligera	CDRL3			12Val	C	3.88
Ligera	CDRL3			12Val	C	3.52
Ligera	CDRL3	96Ala	N	12Val	C	3.92
Ligera	CDRL3	95Tyr	C	12Val	C	3.88

Cadena Ab	CDR Ab	Aminoácido Ab	Átomo de fuente Ab	Aminoácido aP2	Átomo objetivo aP2	Distancia (angströms)
Ligera	CDRL3	95Tyr	C	12Val	O	3.25
Ligera	CDRL3	95Tyr	C	12Val	O	3.43
Ligera	CDRL3	95Tyr	C	12Val	O	3.45
Ligera	CDRL3	96Ala	N	12Val	O	2.72
Ligera	CDRL3	96Ala	C	12Val	O	3.77
Ligera	CDRL3	95Tyr	C	12Val	O	3.90
Ligera	CDRL3	95Tyr	C	12Val	O	3.97
Ligera	CDRL3			13Ser	N	3.93
Ligera	CDRL1	28Asp	C	37Ala	C	3.94
Ligera	CDRL1	28Asp	C	37Ala	C	3.68
Ligera	CDRL1	28Asp	O	37Ala	C	3.83
Ligera	CDRL1	28Asp	O	37Ala	C	4.00
Ligera	CDRL1	28Asp	C	38Lys	N	3.88
Ligera	CDRL1	28Asp	C	38Lys	N	3.60
Ligera	CDRL1	28Asp	O	38Lys	N	3.20
Ligera	CDRL1			38Lys	C	3.93
Ligera	CDRL1	28Asp	O	38Lys	C	3.40
Ligera	CDRL1			38Lys	C	3.40
Ligera	CDRL1	27Glu	O	38Lys	C	3.50
Ligera	CDRL3	95Tyr	C	38Lys	C	3.80
Ligera	CDRL3	95Tyr	C	38Lys	C	3.83
Ligera	CDRL3	95Tyr	C	38Lys	N	3.99
Ligera	CDRL1	28Asp	O	38Lys	N	3.56
Ligera	CDRL1	27Glu	C	38Lys	N	2.96
Ligera	CDRL3	95Tyr	C	38Lys	N	3.54

Cadena Ab	CDR Ab	Aminoácido Ab	Átomo de fuente Ab	Aminoácido aP2	Átomo objetivo aP2	Distancia (angströms)
Ligera	CDRL3	95Tyr	C	38Lys	N	3.28
Ligera	CDRL3	95Tyr	C	38Lys	N	3.54
Ligera		100Phe*	C	38Lys	N	3.23
Ligera		100Phe*	C	38Lys	N	3.95
Ligera	CDRL1	28Asp	O	38Lys	O	3.89
Ligera	CDRL1	30Ser	O	38Lys	O	3.37
Ligera	CDRL1	28Asp	O	57Thr	C	3.57
Ligera	CDRL1	28Asp	C	57Thr	O	3.25
Ligera	CDRL1	28Asp	O	57Thr	O	2.61
Ligera	CDRL1	28Asp	O	57Thr	O	3.15
Ligera	CDRL1	28Asp	O	57Thr	C	3.95
Ligera	CDRL3	94Thr	O	130Glu	C	3.88
Ligera	CDRL3	94Thr	C	130Glu	O	3.84
Ligera	CDRL3	94Thr	O	130Glu	O	2.81
Heavy	CDRH3	104Leu*	C	132Ala	C	3.95
Heavy	CDRH3			132Ala	C	3.97
Ligera	CDRL1	32Tyr	O	132Ala	C	3.59

*indica los puntos de contacto fuera de las regiones CDR como se determina por la numeración Kabat.

Los anticuerpos monoclonales anti-aP2 de la presente invención pueden ser además definidos por aminoácidos específicos dentro de las CDRs que contactan la proteína aP2 en su forma conformacional, nativa durante la

unión. En una modalidad, se proporciona un anticuerpo monoclonal anti-aP2 purificado que comprende una cadena ligera que comprende los siguientes aminoácidos en la posición específica identificada: CDRL1 - 27Glu, 28Asp, 30Ser; CDRL3 - 92Tyr, 93Gly, 94Thr, 95Tyr, 96Ala; y 100Phe. En una modalidad, el anticuerpo se une a la proteína aP2 humana en su conformación nativa y tiene una KD de aproximadamente $\geq 10^{-7}$ M. En una modalidad, el anticuerpo monoclonal anti-aP2 es humanizado.

En una modalidad, se proporciona un anticuerpo monoclonal anti-aP2 purificado que comprende una cadena ligera que comprende los siguientes aminoácidos en la posición identificada: CDRL1 - 27Glu, 28Asp, 30Ser; CDRL3 - 92Tyr, 93Gly, 94Thr, 95Tyr, 96Ala; y 100Phe; y una cadena pesada que comprende el siguiente aminoácido en la posición identificada: 104Leu. En una modalidad, el anticuerpo se une a la proteína aP2 humana en su conformación nativa y tiene una KD de aproximadamente $\geq 10^{-7}$ M. En una modalidad, el anticuerpo monoclonal anti-aP2 es humanizado.

En una modalidad, se proporciona un anticuerpo monoclonal anti-aP2 purificado que comprende una cadena ligera que comprende el siguiente aminoácido en la posición identificada: CDRL3 – 91Ala; y una cadena pesada que comprende los siguientes aminoácidos en las posiciones identificadas: CDRH1 – 33Ala; CDRH2 – 52Ser. En una

modalidad, la cadena pesada comprende además el siguiente aminoácido en la posición identificada: CDRH3 - 98Phe. En una modalidad, el anticuerpo se une a la proteína aP2 humana en su conformación nativa y tiene una KD de aproximadamente ≥ 10^{-7} M. En una modalidad, el anticuerpo monoclonal anti-aP2 es humanizado.

En una modalidad, el anticuerpo monoclonal anti-aP2 purificado se une a aP2 solamente a través, o principalmente a través, de sus CDRs de cadena ligera. En una modalidad alternativa, el anticuerpo monoclonal anti-aP2 purificado tiene CDRs de cadena ligera que se unen a aP2 con una mayor afinidad que sus CDRs de cadena pesada que se unen a aP2.

En una modalidad, el anticuerpo monoclonal anti-aP2 purificado es caracterizado por tener una baja afinidad para aP2 humana en su forma conformacional, nativa. En una modalidad, el anticuerpo monoclonal anti-aP2 purificado tiene una KD para aP2 humana de aproximadamente ≥ 10^{-7} M. En una modalidad, el anticuerpo monoclonal anti-aP2 purificado tiene una KD para aP2 humana de entre aproximadamente 10^{-4} hasta 10^{-6} M. En una modalidad, el anticuerpo monoclonal anti-aP2 purificado tiene una KD para aP2 humana de aproximadamente > 500nM. En una modalidad, el anticuerpo monoclonal anti-aP2 purificado tiene una KD para aP2 humana de aproximadamente 500nM hasta aproximadamente 10µM. En una modalidad, el anticuerpo monoclonal anti-aP2 purificado tiene una KD para

aP2 humana de aproximadamente 1μM hasta aproximadamente 7μM. En una modalidad, el anticuerpo monoclonal anti-aP2 purificado tiene una KD para aP2 humana de aproximadamente 2μM hasta aproximadamente 5μM.

En una modalidad alternativa, el anticuerpo monoclonal anti-aP2 purificado tiene una baja afinidad de unión para aP2 de ratón en su forma conformacional, nativa. En una modalidad, el anticuerpo monoclonal anti-aP2 purificado tiene una KD para aP2 de ratón de $\geq 10^{-7}$ M. En una modalidad, el anticuerpo monoclonal anti-aP2 purificado tiene una KD para aP2 de ratón de entre aproximadamente 10^{-4} hasta 10^{-6} M. En una modalidad, el anticuerpo monoclonal anti-aP2 purificado tiene una KD para aP2 de ratón de aproximadamente > 500nM. En una modalidad, el anticuerpo monoclonal anti-aP2 purificado tiene una KD para aP2 de ratón de aproximadamente 500nM hasta aproximadamente 10μM. En una modalidad, el anticuerpo monoclonal anti-aP2 purificado tiene una KD para aP2 de ratón de aproximadamente 1μM hasta aproximadamente 7μM. En una modalidad, el anticuerpo monoclonal anti-aP2 purificado tiene una KD para aP2 de ratón de aproximadamente 2μM hasta aproximadamente 5μM.

En una modalidad, el anticuerpo específicamente se une a aP2, y no se une específicamente a FABP5/Mal1.

En una modalidad, se proporciona un anticuerpo monoclonal anti-aP2 purificado, y un proceso para elaborar el

mismo, en donde la afinidad para aP2 ha sido reducida identificando un anticuerpo anti-aP2 que tiene una KD para aP2 de al menos < 10-7 M, alterar al menos un aminoácido en ya sea una región CDR o una región FR del anticuerpo ani-aP2, en donde la alteración resulta en un anticuerpo anti-aP2 con a KD de al menos aproximadamente ≥ 10^{-7} M. En una modalidad, el anticuerpo alterado es capaz de unirse a aP2 humana en su forma conformacional nativa. En una modalidad alternativa, el anticuerpo alterado es capaz de unirse a aP2 de ratón en su forma de conformación nativa. En una modalidad, se proporciona un método para reducir la afinidad para un anticuerpo anti-aP2 que tiene una KD de < 10^{-7} M que comprende 1) identificar un anticuerpo monoclonal que tiene una afinidad de al menos < 10^{-7} M para una proteína aP2, 2) identificar un aminoácido dentro de una región CDR que contacta la proteína aP2 en su forma conformacional nativa, y 3) sustituir uno o más aminoácidos de contacto con un aminoácido seleccionado a partir de alanina, fenilalanina, y serina, en donde la sustitución resulta en una reducción en la afinidad del anticuerpo a una KD de aproximadamente ≥ 10^{-7} M. En una modalidad, un residuo de cisteína en CDRL3 es sustituido. En una modalidad, el residuo de cisteína es sustituido con un aminoácido seleccionado de alanina, glutamina, e histidina.

Epítopos de Unión a aP2 como se Determina por

Intercambio de Hidrógeno-Deuterio

En un aspecto de la invención, el anticuerpo monoclonal purificado se une a un epítopo de la proteína aP2 humana como se determina por intercambio de hidrógeno-deuterio (HDX) que comprende al menos uno, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10, o más, de aminoácidos 9-17, aminoácidos 20-28, o aminoácidos 118-132 de la Seq. ID No. 1. En una modalidad, el anticuerpo monoclonal purificado se une a un epítopo de la proteína aP2 humana que comprende al menos uno, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más, de aminoácidos 9-17 (WKLVSSENF) (Seq. ID No. 22), aminoácidos 20-28 (YMKEVGVGF) (Seq. ID No. 23), o aminoácidos 118-132 (CVMKGVTSTRVYERA) (Seq. ID No. 24) de la Seq. ID No. 1, y tiene una kD de al menos aproximadamente $\geq 10^{-7}$ M. En una modalidad, el anticuerpo monoclonal anti-aP2 purificado se une a un epítopo de la proteína aP2 humana dentro de puntos de contacto de 3-4 angströms de al menos uno, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más, de aminoácidos 9-17, aminoácidos 20-28, o aminoácidos 118-132 de la Seq. ID No. 1 cuando la proteína aP2 humana está en su forma conformacional, nativa. En una modalidad, el anticuerpo monoclonal anti-aP2 purificado se une a un epítopo de la proteína aP2 humana dentro de puntos de contacto de 3-4 angströms de al menos uno de, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más, aminoácidos 9-17, aminoácidos 20-28, o

aminoácidos 118-132 de la Seq. ID No. 1 cuando la proteína aP2 humana está en su forma conformacional, nativa y tiene una kD de al menos aproximadamente ≥ 10^{-7} M. Intercambio de hidrógeno-deuterio (HDX) para determinar las interacciones de unión y mapas de epítopo-anticuerpo son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, como se describe por Pandit et al. (2012) J. Mol. Recognit. Mar;25(3):114-24 (incorporado en la presente por referencia)).

Estructuras de Agente de Unión al Antígeno y Anticuerpos Anti-aP2

Los anticuerpos monoclonales anti-aP2 y agentes de unión al antígeno han sido descubiertos que tienen actividad superior e inesperada para el tratamiento de trastornos mediados por aP2. En una modalidad, se proporcionan anticuerpos monoclonales anti-aP2 y fragmentos que contienen una cadena ligera o fragmento de cadena ligera que tiene una región variable, en donde tal región variable comprende una, dos o tres CDRs seleccionadas independientemente a partir de la Seq. ID No. 7, Seq. ID No. 8, y Seq. ID No. 9, Seq. ID No. 10, Seq. ID No. 11, Seq. ID No. 12 y Seq. ID No. 13. Alternativamente, uno o más de las CDRs seleccionadas y descritas puede ser alterada por sustitución de uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8 aminoácidos) que no afectan adversamente o que mejoran las propiedades del anticuerpo o agente de unión al antígeno,

como se describe además en la presente. En una modalidad, la(s) CDR(s) seleccionada(s) es/son colocadas en un armazón de inmunoglobulina humana. En una modalidad, el armazón de inmunoglobulina humana es además modificado o alterado para mantener la especificidad de afinidad de unión de la región CDR injertada.

Por lo tanto, en otra modalidad, se ha descubierto que un anticuerpo o agente de unión al antígeno que se une a la proteína aP2 en su estado secretado (no citosólico) con una afinidad de unión más débil de KD aproximadamente $\geq 10^{-7}$ M, tiene una capacidad mejorada para neutralizar la aP2 secretada y causar un efecto inhibidor significante en trastornos mediados por aP2 cuando se proporciona en una cantidad efectiva a un hospedero en necesidad del mismo.

En una molécula de anticuerpo, existen dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Cada cadena pesada y cada cadena ligera tiene en su extremo N-terminal un dominio variable. Cada dominio variable está compuesto de cuatro regiones de armaxón (FRs) que alternan con tres regiones determinantes de complementariedad (CDRs). Los residuos en los dominios variables son convencionalmente numerados de conformidad con un sistema contemplado por Kabat et al (supra), o una combinación de Kabat y Chothia como se describe anteriormente para CDR-H1. Este sistema de numeración es usado en la presente especificación excepto

donde se indique de otro modo.

Las inmunoglobulinas (Ig) son las moléculas de reconocimiento del antígeno de células B.

Las inmunoglobulinas (Ig) son las moléculas de reconocimiento del antígeno de células B. Una molécula Ig es elaborada de 2 cadenas pesadas idénticas y 2 cadenas ligeras idénticas, ya sea kappa o lambda, unidas por enlaces disulfuro de manera que cada cadena pesada está ligada a una una cadena ligera y las 2 cadenas pesadas están ligadas en conjunto. Las cadenas ligeras kappa y lambda no tienen diferencias funcionales aparentes. Cada cadena ligera kappa y lambda Ig tiene una región variable N-terminal (V) que contiene el sitio de unión al antígeno y una región constante C-terminal (C) codificada por el gen de la región C (IGKC o IGLC), que proporciona funciones de señalización. Las regiones V de cadena ligera lambda y kappa son codificadas por 2 tipos de genes: genes V y genes de unión (J). La selección aleatoria de solo el gen 1 de cada tipo para parecerse a una región V representa la mayor diversidad de regiones V entre moléculas Ig. El locus de la cadena ligera kappa en cromosoma humano 2 contiene aproximadamente 40 genes V funcionales, seguido por aproximadamente 5 genes J funcionales. El locus ligero de cadena pesada lambda en el cromosoma humano 22 contiene aproximadamente 30 genes V funcionales, seguido por aproximadamente 4 genes J

funcionales. Debido al polimorfismo, los números de genes V y J funcionales difieren de entre los individuos.

Cada cadena pesada Ig tiene una región variable N-terminal (V) que contiene el sitio de unión al antígeno y una región constante (C) C-terminal, codificada por un gen de la región C, que proporciona funciones señalización o efectoras. La región V de cadena pesada es codificada por 3 tipos de genes: genes V, genes de unión (J), y genes de diversidad (D). La selección aleatoria de solo 1 gen de cada tipo para asemejarse a una región V representa la mayor diversidad de regiones V entre moléculas Ig. El locus de cadena psada en el cromosoma humano 14 contiene aproximadamente 40 genes V funcionales, seguido por aproximadamente 25 genes D funcionales y aproximadamente 6 genes J funcionales. Debido al polimorfismo, los números de genes funcionales V, J, y D difieren entre los individuos. Existen cinco tipos de cadenas pesadas de inmunoglobulina de mamífero: γ, δ, α, μ y ε. Definen las clases de inmunoglobulinas: IgG, IgD, IgA, IgM e IgE, respectivamente. Las cadenas pesadas γ, α y δ tienen una región constante compuestas de tres dominios de inmunoglobulina en serie (en una línea después de la otra) pero también tienen una región bisagra entre las regiones CH1 y CH2 para agregar flexibilidad. Las cadenas pesadas μ y ε tienen una región constante compuesta de cuatro dominios.

Las designaciones del residuo Kabat no siempre

corresponden directamente con la numeración lineal de los residuos de aminoácido. La secuencia de aminoácido lineal actual puede contener pocos o adicionales aminoácidos que en la numeración Kabat estricta que corresponde a un acortamiento de, o inserción en, un componente estructural, sea armazón o CDR, de la estructura del dominio variable básica. La numeración de residuos Kabat correcto puede ser determinada para un anticuerpo dado por alineación de residuos de homología en la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada Kabad "estándar".

Las CDRs del dominio variable de cadena pesada están localizadas en los residuos 31-35 (CDRH1), residuos 50-65 (CDRH2) y residuos 95-102 (CDRH3) de conformidad con la numeración Kabat. Sin embargo, de conformidad con Chothia (Chothia et al., (1987) J. Mol. Biol., 196, 901-917), el bucle equivalente a CDR-H1 se extiende desde el residue 26 hasta el residuo 32. De este modo a menos que se indique de otro modo, "CDR-H1" como se emplea en la presente está propuesto para referirse a residuos 26 hasta 35, como se describe por una combinación del sistema de numeración Kabat y definición de bucle topológico de Chothia.

Las CDRs del dominio variable de cadena ligera están localizados en los residuos 24-34 (CDRL1), residuos 50-56 (CDRL2) y residuos 89-97 (CDRL3) de conformidad con la numeración Kabat. Los anticuerpos para uso en la presente

descripción se pueden obtener usando cualquier método adecuado conocido en la técnica. La proteína aP2 que incluye proteínas de fusión, o células (recombinantemente o naturalmente) que expresan la proteína, pueden ser usadas para producir anticuerpos, los cuales reconocen específicamente aP2. La proteína aP2 usada puede ser la proteína biológicamente activa o un fragmento o derivado de la misma.

Las proteínas aP2 o péptidos, para uso para inmunizar un hospedero, pueden ser preparados por procesos bien conocidos en la técnica a partir de células hospederas diseñadas por ingeniería genética que comprenden sistemas de expresión o pueden ser recuperadas a partir de fuentes biológicas naturales. La proteína aP2 puede en muchos casos, ser parte de una proteína más grande tal como una proteína de fusión, por ejemplo, fusionada a una etiqueta de afinidad o similar, o formada en complejo con su patrón biológico que se origina naturalmente.

Se pueden obtener anticuerpos generados contra la proteína aP2, donde la inmunización de un animal es necesaria, administrando la proteína a un animal, preferiblemente un animal no humano, usando protocolos de rutina y bien conocidos, véase por ejemplo Handbook of Experimental Immunology, D. M. Weir (ed.), Vol 4, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, England, 1986). Muhos animales

de sangre caliente, tales como conejos, ratones, ratas, ovejas, vacas, camellos o cerdos, pueden ser inmunizados. Sin embargo, los ratones, conejos, cerdos y ratas en general son los más adecuados. Los anticuerpos monoclonales pueden ser preparados por cualquier método conocido en la técnica tal como la técnica de hibridoma (Kohler & Milstein, 1975, Nature, 256:495-497), la técnica de trioma, la técnica de hibridoma de células B humanas (Kozbor et al., 1983, Immunology Today, 4:72) y la técnica de hibridoma EBV (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, pp77-96, Alan R Liss, Inc., 1985).

Los anticuerpos para uso en la invención también pueden ser generados usando métodos de anticuerpo de linfocito único por clonación y expresando cADNs de región variable de inmunioglobulina a partir de linfocitos únicos seleccionados para la producción de anticuerpos específicos mediante, por ejemplo, los métodos descritos por Babcook, J. et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(15):7843-7848l; WO92/02551; WO2004/051268 y Solicitud de Patente Internacional número WO2004/106377. La selección para anticuerpos puede ser realizada usando ensayos para medir la unión a aP2 humana y/o ensayos para medir la capacidad para bloquear la unión de aP2 a su receptor natural. Un ejemplo de un ensayo de unión es un ELISA, en particular, usando una proteína de fusión de aP2 humana y Fc humana, la cual es

inmovilizada en placas, y empleando un anticuerpo secundario para detectar el anticuerpo anti-aP2 unido a la proteína de fusión. Ejemplos de ensayos de bloqueo y antagonísticos adecuados se describen en los jemplos de la presente.

Los anticuerpos humanizados (los cuales incluyen anticuerpos injertados a CDR), son moléculas de anticuerpo que tienen una o más regiones determinantes de complementariedad (CDRs) a partir de especies no humanas (por ejemplo, un conejo o ratón) y una región de armazón a partir de una molécula de inmunoglobulina humana (véase, por ejemplo, documentos US 5,585,089; WO91/09967). Se apreciará que puede ser solamente necesario transferir los residuos determinante de especificidad de las CDRs en lugar de la CDR completa (véase por ejemplo, Kashmiri et al., 2005, Methods, 36, 25-34). Los anticuerpos humanizados pueden comprender opcionalmente uno o más residuos de armazón derivados a partir de las especies no humanas de las cuales se derivaron las CDRs. Las últimas son a menudo referidas como residuos donadores. Las moléculas de anticuerpo de la presente invención tienen adecuadamente una afinidad de unión de aproximadamente $\geq 10^{-7}$ M, en particular en el intervalo micromolar (μM). La afinidad puede ser medida usando cualquier método adecuado conocido en la técnica, que incluye BIAcore, como se describe en los Ejemplos de la presente, usando aP2 recombinante o natural aislado o una

proteína/polipéptido de fusión adecuado. En una modalidad descrita en la presente, las afinidades de unión del anticuerpo monoclonal anti-aP2 descrito en la presente pueden incluir anticuerpos que tienen una KD de aproximadamente ≥ 10^{-7} M. En una modalidad, el anticuerpo monoclonal anti-aP2 purificado tiene una KD para aP2 humana de entre aproximadamente 10^{-4} hasta 10^{-6} M. En una modalidad, el anticuerpo monoclonal anti-aP2 purificado tiene una KD para aP2 humana de aproximadamente 2 hasta aproximadamente 5 µM.

En un ejemplo el anticuerpo de la presente invención no se une a FABP5/Mal1. En un ejemplo el anticuerpo de la presente invención se une a aP2 en su conformación estructural no lineal natural.

La afinidad de un anticuerpo o agente de unión al antígeno de la presente invención, así como también la extensión en la cual un agente de unión (tal como un anticuerpo) inhibie la unión, puede ser determinada por uno de habilidad ordinaria en las artes usando técnicas convencionales, por ejemplo, aquellas descritas por Scatchard et al. (Ann. KY. Acad. Sci. 51:660-672 (1949)) o por resonancia de plasmón de superficie (SPR) usando sistemas tales como BIAcore. Para resonancia de plasmón de superficie, las moléculas objetivo son inmovilizadas en una fase sólida y expuestas a ligandos en una fase móvil que corre a lo large de una celda de flujo. Si la unión del ligando al objetivo

inmovilizado ocurre, el índice de refracción local cambia, conduciendo a un cambio en el ángulo SPR, el cual puede ser monitoreado en tiempo real detectando cambios en la intensidad de la luz reflejada. Las velocidades de cambio de la señal SPR pueden ser analizadas para proporcionar constantes de velocidad aparente para las fases de asociación y disociación de la reacción de unión. La relación de estos valores proporciona la constante de equilibrio aparente (afinidad) (véase, por ejemplo, Wolff et al, Cancer Res. 53:2560-65 (1993)).

En la presente invención se determinó típicamente la afinidad de la molécula de anticuerpo de prueba usando SPR como sigue. La molécula de anticuerpo de prueba es capturada en una fase sólida y la aP2 humana se corre sobre el anticuerpo capturado en la fase móvil y se determina la afinidad de la molécula de anticuerpo de prueba para aP2 humana. La molécula de anticuerpo de prueba puede ser capturada en la superficie del chip de fase sólida usando cualquier método apropiado, por ejemplo, usando un agente de captura específico anti Fab' o anti-Fc. En un ejemplo, se determina la afinidad a pH 6. En un ejemplo se determina la afinidad a pH 7.4.

Se apreciará que la afinidad de anticuerpos proporcionada por la presente invención puede ser alterada usando cualquier método adecuado conocido en la técnica. La

presente invención por lo tanto también se refiere a variantes de las moléculas de anticuerpo de la presente invención, las cuales tienen una afinidad mejorada para aP2. También contemplada, como se describe en la presente además, está la modificación de anticuerpos anti-aP2 humana de alta afinidad con el fin de reducir la KD con al menos aproximadamente $\geq 10^{-7}$ M. Tales variantes pueden ser obtenidas por un número de protocolos de maduración de afinidad que incluyen mutar las CDRs (Yang et al., J. Mol. Biol., 254, 392-403, 1995), lanzadera de cadena (Marks et al., Bio/Technology, 10, 779-783, 1992), uso de cepas mutadoras de *E. coli* (Low et al., J. Mol. Biol., 250, 359-368, 1996), lanzadera de ADN (Patten et al., Curr. Opin. Biotechnol., 8, 724-733, 1997), despliegue de fago (Thompson et al., J. Mol. Biol., 256, 77-88, 1996) y PCR sexual (Crameri et al., Nature, 391, 288-291, 1998). Vaughan et al. (supra) discute estos métodos de maduración de afinidad.

Regiones de CDR

En un aspecto de la presente invención, se proporciona un anticuerpo monoclonal anti-aP2 o agente de unión al antígeno que se une a la proteína aP2 en su conformación nativa en donde el anticuerpo comprende al menos una, o más de una, de las regines de CDR proporcionadas en la Tabla 3.

Tabla 3: Regiones Determinantes de

Complementariedad del Anticuerpo Anti-aP2

Proteína	**Seq. ID No.**	**Secuencia**
CDRL1	7	QASEDISRYLV
CDRL1 variante 1	597	SVSSSISSSNLH
CDRL2	8	KASTLAS
CDRL2 variante 1	598	GTSNLAS
CDRL3	9	QCTYGTYAGSFFYS
CDRL3 variante 1	10	QATYGTYAGSFFYS
CDRL3 variante 2	11	QQTYGTYAGSFFYS
CDRL3 variante 3	12	QHTYGTYAGSFFYS
CDRL3 variante 4	13	QQASHYPLT
CDRL3 variante 5	599	QQWSHYPLT
CDRH1	14	GFSLSTYYMS
CDRH1 variante 1	15	GYTFTSNAIT
CDRH1 variante 2	600	GYTFTSNWIT
CDRH2	16	IIYPSGSTYCASWAKG
CDRH2 variante 1	17	IIYPSGSTYSASWAKG
CDRH2 variante 2	18	DISPGSGSTTNNEKFKS
CDRH2 variante 3	601	DIYPGSGSTTNNEKFKS
CDRH3	19	PDNDGTSGYLSGFGL
CDRH3 variante 1	20	PDNEGTSGYLSGFGL
CDRH3 variante 2	21	LRGFYDYFDF
CDRH3 variante 3	602	LRGYYDYFDF

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo monoclonal anti-aP2 purificado o fragmento de unión al antígeno que comprende una cadena ligera en donde el dominio variable comprende una, dos, o tres CDRs seleccionadas independientemente a partir de CDRL1 (QASEDISRYLV) (Seq. ID No. 7), CDRL1 variante 1 (SVSSSISSSNLH) (Seq. ID No. 597),

CDRL2 (KASTLAS) (Seq. ID No. 8), CDRL2 variante 1 (GTSNLAS) (Seq. ID No. 598), CDRL3 (QCTYGTYAGSFFYS) (Seq. ID. No. 9), CDRL3 variante 1 (QATYGTYAGSFFYS) (Seq. ID No. 10), CDRL3 variante 2 (QQTYGTYAGSFFYS) (Seq. ID No. 11), CDRL3 variante 3 (QHTYGTYAGSFFYS) (Seq. ID No. 12), CDRL3 variante 4 (QQASHYPLT) (Seq. ID No. 13), o CDRL3 variante 5 (QQWSHYPLT) (Seq. ID No. 599). En una modalidad, se proporciona en la presente un anticuerpo o agente de unión al antígeno que comprende una región variable de cadena ligera que comprende CDRL1 (Seq. ID No. 7), CDRL2 (Seq. ID No. 8), y CDRL3 (Seq. ID No. 9). En una modalidad, se proporciona en la presente un anticuerpo o agente de unión al antígeno que comprende una región variable de cadena ligera que comprende CDRL1 (Seq. ID No. 7), CDRL2 (Seq. ID No. 8), y CDRL3 variante 1 (Seq. ID No. 10). En una modalidad, se proporciona en la presente un anticuerpo o agente de unión al antígeno que comprende una región variable de cadena ligera que comprende CDRL1 (Seq. ID No. 7), CDRL2 (Seq. ID No. 8), y CDRL3 variante 2 (Seq. ID No. 11). En una modalidad, se proporciona en la presente un anticuerpo o agente de unión al antígeno que comprende una región variable de cadena ligera que comprende CDRL1 (Seq. ID No. 7), CDRL2 (Seq. ID No. 8), y CDRL3 variante 3 (Seq. ID No. 12).

En una modalidad, se proporciona en la presente un anticuerpo o agente de unión al antígeno que comprende una

región variable de cadena ligera que comprende CDRL3 variante 4 (Seq. ID No. 13), en donde el anticuerpo tiene una KD de aproximadamente ≥ 10^{-7} M. En una modalidad, se proporciona en la presente un anticuerpo o agente de unión al antígeno que comprende una región variable de cadena ligera que comprende CDRL1 variante 1 (Seq. ID No. 597), CDRL2 variante 1 (Seq. ID No. 598), y CDRL3 variante 4 (Seq. ID No. 13). En una modalidad, se proporciona en la presente un anticuerpo o agente de unión al antígeno que comprende una región variable de cadena ligera que comprende CDRL3 variante 4 (Seq. ID No. 13) y una región variable de cadena pesada que comprende CDHR1 variante 1 (GYTFTSNAIT) (Seq. ID No. 15), CDRH2 variante 2 (DISPGSGSTTNNEKFKS) (Seq. ID No. 18), and, en una modalidad, CDRH3 variante 2 (LRGFYDYFDF) (Seq. ID No. 21).

En una modalidad, el anticuerpo o agente de unión al antígeno comprende una, dos, o tres CDRs seleccionadas a partir de CDRL1 (Seq. ID No. 7), CDRL2 (Seq. ID No. 8), CDRL3 (Seq. ID No. 9), CDRL3 variante 1 (Seq. ID No. 10), CDRL3 variante 2 (Seq. ID No. 11), CDRL3 variante 3 (Seq. ID No. 12), y CDRL3 variante 4 (Seq. ID No. 13), y tiene una KD de aproximadamente ≥10^{-7} M. En una modalidad, las secuencias de CDR identificadas anteriormente son injertadas en un armazón de inmunoglobulina humana. En una modalidad, el armazón de inmunoglobulina humana es además modificado o alterado, por ejemplo dentro de la zona Vernier, para mantener la

especificidad de afinidad de unión de la región CDR injertada.

En una modalidad, se proporciona un anticuerpo monoclonal anti-aP2 purificado o agente de unión al antígeno que comprende una cadena ligera en donde el dominio variable comprende una, dos, o tres CDRs seleccionadas independientemente a partir de una secuencia de aminoácido que es al menos 80%, 85%, 90%, o 95% homóloga con CDRL1 (Seq. ID No. 7), CDRL2 (Seq. ID No. 8), CDRL3 (Seq. ID No. 9), CDRL3 variante 1 (Seq. ID No. 10), CDRL3 variante 2 (Seq. ID No. 11), CDRL3 variante 3 (Seq. ID No. 12), o CDRL3 variante 4 (Seq. ID No. 13). En una modalidad, el anticuerpo o agente de unión al antígeno tiene una KD de aproximadamente $\geq 10^{-7}$ M. En una modalidad, las secuencias de CDR identificadas anteriormente son injertadas en un armazón de inmunoglobulina humana. En una modalidad, el armazón de inmunoglobulina humana es además modificado o alterado, por ejemplo dentro de la zona Vernier, para mantener la especificidad de afinidad de unión de la región CDR injertada. En una modalidad, se proporciona un anticuerpo monoclonal anti-aP2 purificado o agente de unión al antígeno que comprende una cadena ligera en donde el dominio variable comprende una, dos, o tres CDRs seleccionadas independientemente a partir de una secuencia de aminoácido que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, o 4) sutituciones, adiciones, o supresiones de aminoácido como se

compara con CDRL1 (Seq. ID No. 7), CDRL2 (Seq. ID No. 8), CDRL3 (Seq. ID No. 9), CDRL3 variante 1 (Seq. ID No. 10), CDRL3 variante 2 (Seq. ID No. 11), CDRL3 variante 3 (Seq. ID No. 12), o CDRL3 variante 4 (Seq. ID No. 13).

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo monoclonal anti-aP2 purificado o agente de unión al antígeno que comprende una cadena ligera en donde el dominio variable comprende una, dos, o tres CDRs seleccionadas a partir de CDRL1 (Seq. ID No. 7), CDRL2 (Seq. ID No. 8), CDRL3 (Seq. ID No. 9), CDRL3 variante 1 (Seq. ID No. 10), CDRL3 variante 2 (Seq. ID No. 11), CDRL3 variante 3 (Seq. ID No. 12), o CDRL3 variante 4 (Seq. ID No. 13), y una, dos, o tres CDRs seleccionadas a partir de CDRH1 (GFSLSTYYMS) (Seq. ID NO. 14), CDRH1 variante 1 (Seq. ID No. 15), CDRH1 variante 2 (GYTFTSNWIT) (Seq. ID No. 600), CDRH2 (IIYPSGSTYCASWAKG) (Seq. ID No. 16), CDRH2 variante 1 (IIYPSGSTYSASWAKG) (Seq. ID No. 17), CDRH2 variante 2 (Seq. ID No. 18), CDRH2 variante 3 (DIYPGSGSTTNNEKFKS) (Seq. ID No. 601), CDHR3 (PDNDGTSGYLSGFGL) (Seq. ID No. 19), CDRH3 variante 1 (PDNEGTSGYLSGFGL) (Seq. ID No. 20), CDRH3 variante 2 (Seq. ID No. 21), o CDRH3 variante 3 (LRGYYDYFDFW) (Seq. ID No. 602). En una modalidad, se proporciona en la presente un anticuerpo o agente de unión al antígeno que comprende una región variable de cadena pesada que comprende CDRH1 variante 1 (Seq. ID No. 15), CDRH2 variante 2 (Seq. ID No. 18), y CDRH3

variante 3 (Seq. ID No. 602). En una modalidad, se proporciona en la presente un anticuerpo o agente de unión al antígeno que comprende una región variable de cadena pesada que comprende CDRH1 variante 1 (Seq. ID No. 15), CDRH2 variante 2 (Seq. ID No. 18), y CDRH3 variante 2 (Seq. ID No. 21). En una modalidad, el anticuerpo o agente de unión al antígeno tiene una KD de aproximadamente $\geq 10^{-7}$ M. En una modalidad, las secuencias de CDR identificadas anteriormente son injertadas en un armazón de inmunoglobulina humana. En una modalidad, el armazón de inmunoglobulina humana es además modificado o alterado, por ejemplo dentro de la zona Vernier, para mantener la especificidad de afinidad de unión de la región CDR injertada.

En una modalidad, el anticuerpo o agente de unión al antígeno comprende una, dos, o tres CDRs seleccionadas a partir de CDRH1 (Seq. ID NO. 14), CDRH1 variante 1 (Seq. ID No. 15), CDRH2 (Seq. ID No. 16), CDRH2 variante 1 (Seq. ID No. 17), CDRH2 variante 2 (Seq. ID No. 18), CDRH3 (Seq. ID No. 19), CDRH3 variante 1 (Seq. ID No. 20), o CDRH3 variante 2 (Seq. ID No. 21), y tiene una KD de aproximadamente $\geq 10^{-7}$ M. En una modalidad, el anticuerpo o agente de unión al antígeno comprende CDRs CDRH1 (Seq. ID No. 14), CDRH2 (Seq. ID No. 16), y CDRH3 (Seq. ID No. 19). En una modalidad, el anticuerpo o agente de unión al antígeno comprende CDRs CDRH1 (Seq. ID No. 14), CDRH2 variante 1 (Seq. ID No. 17), y CDHR3

variante 1 (Seq. ID No. 20). En una modalidad, el anticuerpo comprende CDRs CDRH1 variante 1 (Seq. ID No. 15) y CDRH2 variante 2 (Seq. ID No. 18). En una modalidad, el anticuerpo comprende CDRs CDRH1 variante 1 (Seq. ID No. 15), y CDRH2 variante 2 (Seq. ID No. 18), y CDRH3 variante 2 (Seq. ID No. 21). En una modalidad, las secuencias de CDR identificadas anteriormente son injertadas en un armazón de inmunoglobulina humana. En una modalidad, el armazón de inmunoglobulina humana es además modificado o alterado, por ejemplo dentro de la zona Vernier, para mantener la especificidad de afinidad de unión de la región CDR injertada. En una modalidad, el anticuerpo o agente de unión al antígeno comprende una, dos, o tres CDRs seleccionadas a partir de una secuencia de aminoácido que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, o 4) sutituciones, adiciones, o supresiones de aminoácido como se compara con CDRH1 (Seq. ID NO. 14), CDRH1 variante 1 (Seq. ID No. 15), CDRH2 (Seq. ID No. 16), CDRH2 variante 1 (Seq. ID No. 17), CDRH2 variante 2 (Seq. ID No. 18), CDRH3 (Seq. ID No. 19), CDRH3 variante 1 (Seq. ID No. 20), o CDRH3 variante 2 (Seq. ID No. 21).

En una modalidad, se proporciona un anticuerpo monoclonal anti-aP2 purificado o agente de unión al antígeno que comprende una cadena pesada en donde el dominio variable comprende una, dos, o tres CDRs seleccionadas a partir de una secuencia de aminoácido que es al menos 80%, 85%, 90%, o 95%

homóloga con CDRH1 (Seq. ID No. 14), CDRH1 variante 1 (Seq. ID No. 15), CDRH2 (Seq. ID No. 16), CDRH2 variante 1 (Seq. ID No. 17), CDRH2 variante 2 (Seq. ID No. 18), CDRH3 (Seq. ID No. 19), CDRH3 variante 1 (Seq. ID No. 20), o CDRH3 variante 2 (Seq. ID No. 21). En una modalidad, el anticuerpo o agente de unión al antígeno tiene una KD de aproximadamente $\geq 10^{-7}$ M. En una modalidad, las secuencias de CDR identificadas anteriormente son injertadas en un armazón de inmunoglobulina humana. En una modalidad, el armazón de inmunoglobulina humana es además modificado o alterado, por ejemplo dentro de la zona Vernier, para mantener la especificidad de afinidad de unión de la región CDR injertada.

Las CDRs pueden ser alteradas o modificadas para proporcionar afinidad de unión mejorada, minimizar la pérdida de afinidad de unión cuando se injerta en un esqueleto diferente, o reducir las interacciones indeseadas entre las CDR y el armazón híbrido como se describe además abajo.

Anticuerpos Humanizados y Agentes de Unión al Antígeno

En un aspecto de la presente invención, se proporcionan en la presente anticuerpos humanizados monoclonales anti-aP2 y agentes de unión al antígeno. Los anticuerpos humanizados son anticuerpos en donde la cadena pesada y/o ligera contiene una o más CDRs (que incluyen, si se desea, una o más CDRs modificadas) a partir de un

anticuerpo donador (por ejemplo, un anticuerpo no humano tal como un anticuerpo monoclonal de conejo o murino) injertado en un armazón de región variable de cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo aceptor (por ejemplo, un anticuerpo humano). Para una revisión, véase Vaughan et al, Nature Biotechnology, 16, 535-539, 1998.

En una modalidad, preferiblemente la CDR completa es transferida, solamente uno o más de los residuos determinantes de especificidad a partir de una de las CDRs descritas en la presente anteriormente, son transferidas a un armazón de anticuerpo humano (véase por ejemplo, Kashmiri et al., 2005, Methods, 36, 25-34). En una modalidad solamente los residuos determinantes de especificidad a partir de una o más de las CDRs descritas en la presente son transferidos al armazón de anticuerpo humano. En otra modalidad solamente los residuos determinantes de especificidad de cada una de las CDRs descritas en la presente son transferidas al armazón de anticuerpo humano.

Cuando las CDRs o residuos determinantes de especificidad son injertados, cualquier secuencia de armazón de región variable de aceptor apropiada puede ser usada, habiendo considerado la clase/tipo del anticuerpo donador a partir de la cual las CDR son derivadas, que incluyen regiones de armazón de ratón, conejo, primate y humana.

De manera adecuada, el anticuerpo humanizado de

conformidad con la presente invención tiene un dominio variable que comprende regiones de armazón aceptoras humanas así como también una o más de las CDRs proporcionadas específicamente en la presenten. De este modo, en una modalidad se proporciona un anticuerpo humanizado monoclonal el cual se une a aP2 humana en donde el dominio variable comprende regiones de armazón aceptoras humanas y CDRs donadoras no humanas.

La construcción de anticuerpos injertados a CDR es en general, descrita en la Solicitud de Patente Europea EP-A-0239400, la cual describe un proceso en el cual las CDR de un anticuerpo monoclonal de ratón son injertadas sobre las regiones de armazón de los dominios variables de una inmunoglobulina humana por mutagénesis de sitio dirigido usando oligonucléotidos largos, y son incorporadas en la presente. Las CDRs determinan la especificidad de unión al antígeno de anticuerpos y son relativamente secuencias peptídicas cortas llevadas en las regiones de armazón de los dominios variables.

El trabajo anterior en anticuerpos humanizantes monoclonales injertando la CDR se llevó a cabo en anticuerpos monoclonales que reconocen antígenos sintéticos, tales como NP. Sin embargo, ejemplos en los cuales un anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce la lisozima y un anticuerpo monoclonal de rata que reconoce un antígeno en células T

humana fueron humanizados injertando CDR que han sido descritas por Verhoeyen et al. (Science, 239, 1534-1536, 1988) y Riechmann et al (Nature, 332, 323-324, 1988), respectivamente. La humanización del anticuerpo se logra injertando CDRs de un anticuerpo no humano, tal como un anticuerpo de ratón, rata, cabra o conejo, sobre un armazón humana "similar" (aceptor) y seleccionado el número mínimo de residuos de armazón claves (retromutaciones) que son manualmente seleccionados a partir del anticuerpo donador monoclonal e incorporados en el armazón aceptor humano con el fin de mantener la conformación de CDR original. Tales métodos se conocen en la técnica, e incluyen aquellos descritos en Jones et al., Nature 321:522 (1986); Verhoeyen et al., Science 239:1534 (1988)), Sims et al., J. Immunol. 151: 2296 (1993); Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901 (1987), Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:4285 (1992); Presta et al., J. Immunol. 151:2623 (1993), Padlan, Molecular Immunology 28(4/5):489-498 (1991); Studnicka et al., Proteína Engineering 7(6):805-814 (1994); Roguska. et al., PNAS 91:969-973 (1994); Publicación de PCT WO 91/09967, PCT/: US98/16280, US96/18978, US91/09630, US91/05939, US94/01234, GB89/01334, GB91/01134, GB92/01755; WO90/14443, WO90/14424, WO90/14430, EP 229246, EP 592,106; EP 519,596, EP 239,400, Patentes Estadounidenses Nos. 5,565,332, 5,723,323, 5,976,862, 5,824,514, 5,817,483, 5,814,476, 5,763,192,

5,723,323, 5,766,886, 5,714,352, 6,204,023, 6,180,370, 5,693,762, 5,530,101, 5,585,089, 5,225,539; 4,816,567, las cuales son incorporadas en la presente.

La clasificación de la subfamilia de la línea germinal de cadena ligera y pesada variable humana puede ser derivada a partir de las designaciones del subgrupo de línea germinal de Kabat: VH1, VH2, VH3, VH4, VH5, VH6 o VH7 para una secuencia VH particular y JH1, JH2, JH3, JH4, JH5, y JH6 para un grupo de unión pesada variable particular para el armazón 4; VK1, VK2, VK3, VK4, VK5 o VK6 para una secuencia kappa VL particular para el armazón 1, 2, y 3, y JK1, JK2, JK3, JK4, o JK5 para un grupo de unión kappa particular para el armazón 4; o VL1, VL2, VL3, VL4, VL5, VL6, VL7, VL8, VL9, o VL10 para una secuencia lambda VL particular para el armazón 1, 2, y 3, y JL1, JL2, JL3, o JL7 para un grupo de unión lambda particular para el armazón 4.

En una modalidad, el armazón general de la cadena ligera contemplado en la presente comprende las estructuras seleccionadas a partir de FR1-CDRL1-FR2-CDRL2-FR3-CDRL3-FR4 y FR1-CDRL1-FR2-CDRL2-FR3-CDRL3-FR4-CL, y variaciones de las mismas, en donde las regiones CDR se seleccionan a partir de al menos una CDR de cadena ligera variable seleccionada a partir de las Seq. ID Nos. 7-13, las regiones de armazón se seleccionan a partir de ya sea una región de armazón de cadena ligera variable kappa de inmunoglobulina, por ejemplo

como se proporciona en la Tabla 4 (Seq. ID Nos. 25-149), o una región de armazón de cadena ligera variable lambda de inmunoglobulina, por ejemplo como se proporciona en la Tabla 5 (Seq. ID Nos. 150-246), y una región constante de cadena ligera de inmunoglobulina a partir de ya sea una región constante de cadena ligera kappa (Seq. ID No. 247) cuando la región de armazón es una región de armazón de cadena ligera variable kappa, o una región constante de cadena ligera lambda (Seq. ID No. 248) cuando la región de armazón es una región de armazón de cadena ligera variable lambda.

En una modalidad, el armazón general de las regiones de cadena pesada contemplado en la presente comprende las estructuras seleccionadas a partir de FR1-CDRH1-FR2-CDRH2-FR3-CDRH3-FR4, FR1-CDRH1-FR2-CDRH2-FR3-CDRH3-FR4-CH1, FR1-CDRH1-FR2-CDRH2-FR3-CDRH3-FR4-CH1-Bisagra-CH2 for IgG, IgD, y casetes de inmunoglobulina IgA y FR1-CDRH1-FR2-CDRH2-FR3-CDRH3-FR4-CH1-CH2 para clases de inmunoglobulina IgM e IgE, FR1-CDRH1-FR2-CDRH2-FR3-CDRH3-FR4-CH1-Bisagra-CH2-CH3 for IgG, IgD, y clases de inmunoglobulina IgA, FR1-CDRH1-FR2-CDRH2-FR3-CDRH3-FR4-CH1-CH2-CH3 para clases de inmunoglobulina IgM e IgE, y FR1-CDRH1-FR2-CDRH2-FR3-CDRH3-FR4-CH1-CH2-CH3-CH4 para clases de inmunoglobulina IgM e IgE, y variaciones de las mismas, en donde las regiones CDR se seleccionan a partir de al menos una CDR de cadena pesada variable seleccionada a partir de las Seq. ID Nos. 14-

21, y las regiones de armazón se seleccionan a partir de las regiones de armazón de cadenas pesadas variables descritas en la Tabla 7 (Seq. ID Nos. 249-407), y las regiones constantes de cadena pesada se seleccionan a partir de, por ejemplo, aquellas proporcionadas en la TablA 8 (Seq. ID Nos. 408-443). Las clases IgA e IgM pueden comprender además, un polipéptido de unión (Seq. ID No. 444) proporcionado en la Tabla 9 que sirve para enlazar dos unidades monoméricas de IgM o IgA en conjunto, respectivametne. En el caso de IgM, el dímero unido a la cadena J es una unidad de nucleación para el pentámero IgM, y en el caso de IgA induce polímeros más grandes.

Los dominios de región constante de la molécula de anticuerpo de la presente invención, si se presentan, pueden ser seleccionados habiendo considerado la función propuesta de la molécula de anticuerpo, y en particular las funciones aceptoras las cuales pueden ser requeridas. Por ejemplo, los dominios de región constante pueden ser dominios humanos IgA, IgD, IgE, IgG o IgM. En modalidades particulares, se requieren los dominios de la región constante IgG humana pueden ser usados, especialmente los isotipos IgG1 e IgG3 cuando la molécula de anticuerpo está propuesta para usos terapéuticos y funciones efectoras de anticuerpo. Alternativamente, los isotipos IgG2 e IgG4 pueden ser usados cuando la molécula de anticuerpo está propuesta para propósitos terapéuticos y las funciones efectoras del

anticuerpo no se requieren. Se apreciará que las variantes de secuencia de estos dominios de región constante pueden también ser usados. Por ejemplo pueden ser usadas moléculas IgG4 en las cuales la serina en la posición 241 ha sido cambiada a prolina como se describe en Angal et al., Molecular Immunology, 1993, 30 (1), 105-108. También se entenderá por un experto en la técnica que los anticuerpos pueden someterse a una variedad de modificaciones post-traduccionales. El tipo y extensión de estas modificaciones a menudo dependen de la línea de células hospederas usadas para expresar el anticuerpo así como también las condiciones de cultivo. Tales modificaciones pueden incluir variaciones en glicosilación, oxidación de metionina, formación de dicetopiperazina, isomerización de aspartato y desamidación de asparagina. Una modificación frecuente es la pérdida de un residuo básico carboxi-terminal (tal como lisina o arginina) debido a la acción de carboxipeptidasas (como se describe en Harris, RJ. Journal de Chromatography 705:129-134, 1995). Por consiguiente, la lisina C-terminal de la cadena pesada del anticuerpo puede estar ausente.

En una modalidad, el anticuerpo monoclonal anti-aP2 comprende al menos una CDR de cadena ligera seleccionada a partir de CDRL1 (Seq. ID No. 7), CDRL2 (Seq. ID No. 8), CDRL3 (Seq. ID No. 9), o CDRL3 variante 1 (Seq. ID No. 10), CDRL3 variante 2 (Seq. ID No. 11), CDRL3 variante 3 (Seq. ID NO.

12), y CDRL3 variante 4 (Seq. ID No. 13), y/o al menos una CDR de cadena pesada seleccionada de CDRH1 (Seq. ID No. 14), CDRH1 variante 1 (Seq. ID No. 15), CDRH2 (Seq. ID No. 16), CDRH2 variante 1 (Seq. ID No. 17), CDRH2 variante 2 (Seq. ID No. 18), CDRH3 (Seq. ID No. 19), CDRH3 variante 1 (Seq. ID No 20), o CDRH3 variante 2 (Seq. ID No. 21), o una combinación o variante de las mismas, en donde la CDR es injertada en un armazón variable de cadena pesada o ligera humana, respectivamente.

En una modalidad, el anticuerpo monoclonal anti-aP2 comprende una, dos, o tres CDRs de cadena ligera seleccionadas a partir de CDRL1 (Seq. ID No. 7), CDRL2 (Seq. ID No. 8), CDRL3 (Seq. ID No. 9), CDRL3 variante 1 (Seq. ID No. 10), CDRL3 variante 2 (Seq. ID No. 11), CDRL3 variante 3 (Seq. ID NO. 12), y CDRL3 variante 4 (Seq. ID No. 13), o una combinación o variante de las mismas, injertadas en un armazón de cadena ligera aceptora humana. En una modalidad, el anticuerpo monoclonal anti-aP2 comprende una cadena ligera variable que comprende CDRL1 (Seq. ID No. 7), CDRL2 (Seq. ID No. 8), y CDRL3 (Seq. ID No. 9) o CDRL3 variante 1 (Seq. ID No. 10) o CDRL3 variante 2 (Seq. ID No. 11) o CDRL3 variante 3 (Seq. ID No. 12), o una combinación o variante de las mismas, ingertadas en un armazón de cadena ligera aceptora humana. En una modalidad, el armazón de cadena ligera aceptora humana se deriva a partir de una secuencia de

aminoácido codificada por un gen IGKV humano (VL kappa) por el armazón 1, 2, y 3, y un gen IGKJ para el armazón 4. En una modalidad, el armazón de cadena ligera aceptora humana se deriva a partir de una secuencia de aminoácido codificada por un gen IGLV humano (VL lambda) para el armazón 1, 2, y 3, y un gen IGLJ para el armazón 4. Se proporcionan ejemplos no limitantes de regiones de armazón aceptoras IGKV e IGKJ de cadena ligera humana, por ejemplo, en la Tabla 4, y se proporcionan ejemplos no limitantes de regiones de armazón aceptoras IGLV e IGLJ de cadena ligera humana, por ejemplo, Tabla 5.

Tabla 4. Regiones de armazón IGKV e IGKJ humanas

Región FR de cadena κ ligera variable	**Seq. ID No.**	**Secuencia**
O12 FR1	25	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC
O12 FR2	26	WYQQKPGKAPKLLIY
O12 FR3	27	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC
O2 FR1	28	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC
O2 FR2	29	WYQQKPGKAPKLLIY
O2 FR3	30	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC
O18 FR1	31	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC
O18 FR2	32	WYQQKPGKAPKLLIY
O18 FR3	33	GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYC
O8 FR1	34	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC
O8 FR2	35	WYQQKPGKAPKLLIY

Región FR de cadena κ ligera variable	**Seq. ID No.**	**Secuencia**
O8 FR3	36	GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYC
A20 FR1	37	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC
A20 FR2	38	WYQQKPGKVPKLLIY
A20 FR3	39	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYC
A30 FR1	40	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC
A30 FR2	41	WYQQKPGKAPKRLIY
A30 FR3	42	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYC
L14 FR1	43	NIQMTQSPSAMSASVGDRVTITC
L14 FR2	44	WFQQKPGKVPKHLIY
L14 FR3	45	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYC
L1 FR1	46	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC
L1 FR2	47	WFQQKPGKAPKSLIY
L1 FR3	48	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC
L15 FR1	49	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC
L15 FR2	50	WYQQKPEKAPKSLIY
L15 FR3	51	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC
L4 FR1	52	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITC
L4 FR2	53	WYQQKPGKAPKLLIY
L4 FR3	54	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC
L18 FR1	55	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITC
L18 FR2	56	WYQQKPGKAPKLLIY
L18 FR3	57	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC
L5 FR1	58	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITC
L5 FR2	59	WYQQKPGKAPKLLIY
L5 FR3	60	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC

Región FR de cadena κ ligera variable	**Seq. ID No.**	**Secuencia**
L19 FR1	61	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITC
L19 FR2	62	WYQQKPGKAPKLLIY
L19 FR3	63	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC
L8 FR1	64	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITC
L8 FR2	65	WYQQKPGKAPKLLIY
L8 FR3	66	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYC
L23 FR1	67	AIRMTQSPFSLSASVGDRVTITC
L23 FR2	68	WYQQKPAKAPKLFIY
L23 FR3	69	GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYC
L9 FR1	70	AIRMTQSPSSFSASTGDRVTITC
L9 FR2	71	WYQQKPGKAPKLLIY
L9 FR3	72	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISCLQSEDFATYYC
L24 FR1	73	VIWMTQSPSLLSASTGDRVTISC
L24 FR2	74	WYQQKPGKAPELLIY
L24 FR3	75	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISCLQSEDFATYYC
L11 FR1	76	AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC
L11 FR2	77	WYQQKPGKAPKLLIY
L11 FR3	78	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC
L12 FR1	79	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC
L12 FR2	80	WYQQKPGKAPKLLIY
L12 FR3	81	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC
O11 FR1	82	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISC
O11 FR2	83	WYLQKPGQSPQLLIY
O11 FR3	84	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC
O1 FR1	85	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISC

Región FR de cadena κ ligera variable	**Seq. ID No.**	**Secuencia**
O1 FR2	86	WYLQKPGQSPQLLIY
O1 FR3	87	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC
A17 FR1	88	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISC
A17 FR2	89	WFQQRPGQSPRRLIY
A17 FR3	90	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC
A1 FR1	91	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISC
A1 FR2	92	WFQQRPGQSPRRLIY
A1 FR3	93	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC
A18 FR1	94	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISC
A18 FR2	95	WYLQKPGQSPQLLIY
A18 FR3	96	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC
A2 FR1	97	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISC
A2 FR2	98	WYLQKPGQPPQLLIY
A2 FR3	99	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC
A19 FR1	100	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC
A19 FR2	101	WYLQKPGQSPQLLIY
A19 FR3	102	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC
A3 FR1	103	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC
A3 FR2	104	WYLQKPGQSPQLLIY
A3 FR3	105	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC
A23 FR1	106	DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISC
A23 FR2	107	WLQQRPGQPPRLLIY
A23 FR3	108	GVPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC
A27 FR1	109	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC
A27 FR2	110	WYQQKPGQAPRLLIY

Región FR de cadena κ ligera variable	**Seq. ID No.**	**Secuencia**
A27 FR3	111	GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC
A11 FR1	112	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC
A11 FR2	113	WYQQKPGLAPRLLIY
A11 FR3	114	GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC
L2 FR1	115	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC
L2 FR2	116	WYQQKPGQAPRLLIY
L2 FR3	117	GIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYC
L16 FR1	118	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC
L16 FR2	119	WYQQKPGQAPRLLIY
L16 FR3	120	GIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYC
L6 FR1	121	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC
L6 FR2	122	WYQQKPGQAPRLLIY
L6 FR3	123	GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC
L20 FR1	124	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC
L20 FR2	125	WYQQKPGQAPRLLIY
L20 FR3	126	GIPARFSGSGPGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC
L25 FR1	127	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSC
L25 FR2	128	WYQQKPGQAPRLLIY
L25 FR3	129	GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYC
B3 FR1	130	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC
B3 FR2	131	WYQQKPGQPPKLLIY
B3 FR3	132	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC
B2 FR1	133	ETTLTQSPAFMSATPGDKVNISC
B2 FR2	134	WYQQKPGEAAIFIIQ
B2 FR3	135	GIPPRFSGSGYGTDFTLTINNIESEDAAYYFC

Región FR de cadena κ ligera variable	**Seq. ID No.**	**Secuencia**
A26 FR1	136	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITC
A26 FR2	137	WYQQKPDQSPKLLIK
A26 FR3	138	GVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYC
A10 FR1	139	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITC
A10 FR2	140	WYQQKPDQSPKLLIK
A10 FR3	141	GVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYC
A14 FR1	142	DVVMTQSPAFLSVTPGEKVTITC
A14 FR2	143	WYQQKPDQAPKLLIK
A14 FR3	144	GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEAEDAATYYC
JK1 FR4	145	FGQGTKVEIK
JK2 FR4	146	FGQGTKLEIK
JK3 FR4	147	FGPGTKVDIK
JK4 FR4	148	FGGGTKVEIK
JK5 FR4	149	FGQGTRLEIK

Tabla 5. Regiones de Armazón IGLV e IGLJ humanas

Región FR de cadena λ ligera variable	**Seq. ID No.**	**Secuencia**
1a FR1	150	QSVLTQPPSVSEAPRQRVTISC
1a FR2	151	WYQQLPGKAPKLLIY
1a FR3	152	GVSDRFSGSKSG—TSASLAISGLQSEDEADYYC
1e FR1	153	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISC
1e FR2	154	WYQQLPGTAPKLLIY

Región FR de cadena λ ligera variable	**Seq. ID No.**	**Secuencia**
1e FR3	155	GVPDRFSGSKSG—TSASLAITGLQAEDEADYYC
1c FR1	156	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISC
1c FR2	157	WYQQLPGTAPKLLIY
1c FR3	158	GVPDRFSGSKSG—TSASLAISGLQSEDEADYYC
1g FR1	159	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISC
1g FR2	160	WYQQLPGTAPKLLIY
1g FR3	161	GVPDRFSGSKSG—TSASLAISGLRSEDEADYYC
1b FR1	162	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISC
1b FR2	163	WYQQLPGTAPKLLIY
1b FR3	164	GIPDRFSGSKSG—TSATLGITGLQTGDEADYYC
2c FR1	165	QSALTQPPSASGSPGQSVTISC
2c FR2	166	WYQQHPGKAPKLMIY
2c FR3	167	GVPDRFSGSKSG—NTASLTVSGLQAEDEADYYC
2e FR1	168	QSALTQPRSVSGSPGQSVTISC
2e FR2	169	WYQQHPGKAPKLMIY
2e FR3	170	GVPDRFSGSKSG—NTASLTISGLQAEDEADYYC
2a2 FR1	171	QSALTQPASVSGSPGQSITISC
2a2 FR2	172	WYQQHPGKAPKLMIY
2a2 FR3	173	GVSNRFSGSKSG—NTASLTISGLQAEDEADYYC
2d FR1	174	QSALTQPPSVSGSPGQSVTISC
2d FR2	175	WYQQPPGTAPKLMIY
2d FR3	176	GVPDRFSGSKSG—NTASLTISGLQAEDEADYYC
2b2 FR1	177	QSALTQPASVSGSPGQSITISC
2b2 FR2	178	WYQQHPGKAPKLMIY
2b2 FR3	179	GVSNRFSGSKSG—NTASLTISGLQAEDEADYYC

Región FR de cadena λ ligera variable	**Seq. ID No.**	**Secuencia**
3r FR1	180	SYELTQPPSVSVSPGQTASITC
3r FR2	181	WYQQKPGQSPVLVIY
3r FR3	182	GIPERFSGSNSG—NTATLTISGTQAMDEADYYC
3j FR1	183	SYELTQPLSVSVALGQTARITC
3j FR2	184	WYQQKPGQAPVLVIY
3j FR3	185	GIPERFSGSNSG—NTATLTISRAQAGDEADYYC
3p FR1	186	SYELTQPPSVSVSPGQTARITC
3p FR2	187	WYQQKSGQAPVLVIY
3p FR3	188	GIPERFSGSSSG—TMATLTISGAQVEDEADYYC
3a FR1	189	SYELTQPPSVSVSLGQMARITC
3a FR2	190	WYQQKPGQFPVLVIY
3a FR3	191	GIPERFSGSSSG—TIVTLTISGVQAEDEADYYC
3l FR1	192	SSELTQDPAVSVALGQTVRITC
3l FR2	193	WYQQKPGQAPVLVIY
3l FR3	194	GIPDRFSGSSSG—NTASLTITGAQAEDEADYYC
3h FR1	195	SYVLTQPPSVSVAPGKTARITC
3h FR2	196	WYQQKPGQAPVLVIY
3h FR3	197	GIPERFSGSNSG—NTATLTISRVEAGDEADYYC
3e FR1	198	SYELTQLPSVSVSPGQTARITC
3e FR2	199	WYQQKPGQAPELVIY
3e FR3	200	GIPERFSGSTSG—NTTTLTISRVLTEDEADYYC
3m FR1	201	SYELMQPPSVSVSPGQTARITC
3m FR2	202	WYQQKPGQAPVLVIY
3m FR3	203	GIPERFSGSSSG—TTVTLTISGVQAEDEADYYC
2-19 FR1	204	SYELTQPSSVSVSPGQTARITC

Región FR de cadena λ ligera variable	**Seq. ID No.**	**Secuencia**
2-19 FR2	205	WFQQKPGQAPVLVIY
2-19 FR3	206	GIPERFSGSSSG—TTVTLTISGAQVEDEADYYC
4c FR1	207	LPVLTQPPSASALLGASIKLTC
4c FR2	208	WYQQRPGRSPQYIMK
4c FR3	209	GIPDRFMGSSSG—ADRYLTFSNLQSDDEAEYHC
4a FR1	210	QPVLTQSSSASASLGSSVKLTC
4a FR2	211	WHQQQPGKAPRYLMK
4a FR3	212	GVPDRFSGSSSG—ADRYLTISNLQLEDEADYYC
4b FR1	213	QLVLTQSPSASASLGASVKLTC
4b FR2	214	WHQQQPEKGPRYLMK
4b FR3	215	GIPDRFSGSSSG—AERYLTISSLQSEDEADYYC
5e FR1	216	QPVLTQPPSSSASPGESARLTC
5e FR2	217	WYQQKPGSPPRYLLY
5e FR3	218	GVPSRFSGSKDASANTGILLISGLQSEDEADYYC
5c FR1	219	QAVLTQPASLSASPGASASLTC
5c FR2	220	WYQQKPGSPPQYLLR
5c FR3	221	GVPSRFSGSKDASANAGILLISGLQSEDEADYYC
5b FR1	222	QPVLTQPSSHSASSGASVRLTC
5b FR2	223	WYQQKPGNPPRYLLY
5b FR3	224	GVPSRFSGSNDASANAGILRISGLQPEDEADYYC
6a FR1	225	NFMLTQPHSVSESPGKTVTISC
6a FR2	226	WYQQRPGSSPTTVIY
6a FR3	227	GVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEADYYC
7a FR1	228	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC
7a FR2	229	WFQQKPGQAPRALIY

Región FR de cadena λ ligera variable	**Seq. ID No.**	**Secuencia**
7a FR3	230	WTPARFSGSLLG—GKAALTLSGVQPEDEAEYYC
7b FR1	231	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC
7b FR2	232	WFQQKPGQAPRTLIY
7b FR3	233	WTPARFSGSLLG—GKAALTLSGAQPEDEAEYYC
8a FR1	234	QTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTC
8a FR2	235	WYQQTPGQAPRTLIY
8a FR3	236	GVPDRFSGSILG—NKAALTITGAQADDESDYYC
9a FR1	237	QPVLTQPPSASASLGASVTLTC
9a FR2	238	WYQQRPGKGPRFVMR
9a FR3	239	GIPDRFSVLGSG—LNRYLTIKNIQEEDESDYHC
10a FR1	240	QAGLTQPPSVSKGLRQTATLTC
10a FR2	241	WLQQHQGHPPKLLSY
10a FR3	242	GISERLSASRSG—NTASLTITGLQPEDEADYYC
JL1 FR4	243	FGTGTKVTVL
JL2 FR4	244	FGGGTKLTVL
JL3 FR4	245	FGGGTKLTVL
JL7 FR4	246	FGGGTQLTVL

La región constante de cadena ligera de inmunoglobulina para uso en la presente invención es determinada por la cadena ligera variable de las CDRs que son injertadas en estas. Por ejemplo, si las regiones FR de cadena ligera variables son derivadas a partir de la región varaible de cadena ligera kappa de inmunoglobulina, entonces

una región constante de cadena ligera a partir de una región constante de cadena ligera kappa de inmunoglobulina (IGKC) puede ser usadas para producir una cadena ligera VL-cadena CL. Una IGKC que puede ser usada en la presente invención incluye Seq. ID No. 247 en la Tabla 6 abajo. Contrariamente, cuando la región de armazón es una región variable de cadena ligera lambda de inmunoglobulina, entonces una región constante de cadena ligera lambda de inmunoglobulina (IGLC) puede ser usada para producir una cadena ligera VL-CL lambda. Una región constante de cadena ligera lambda de inmunoglobulina que puede ser usada en la presente invención incluye (Seq. ID No. 248) en la Tabla 6 abajo, y variantes alélicas de la misma, las cuales en general se conocen en la técnica, por ejemplo, como se identifica en la entrada OMIM 147200 para variantes IGKC y 147220 para variantes IGLC.

Tabla 6. Secuencia de Regiones constantes de cadena ligera humana de inmunoglobulinas

Región constante de cadena ligera Ig	**Seq. ID No.**	**Secuencia**
Región constante kappa Ig (IGKC)	247	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
Región constante	248	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLIS DFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQ

Región constante de cadena ligera Ig	**Seq. ID No.**	**Secuencia**
lambda Ig (IGLC)		SNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTH EGSTVEKTVAPTECS

En una modalidad, el anticuerpo monoclonal anti-aP2 tiene al menos una CDR de cadena pesada seleccionada de CDRH1 (Seq. ID No. 14), CDRH1 variante 1 (Seq. ID No. 15), CDRH2 (Seq. ID No. 16), CDRH2 variante 1 (Seq. ID No. 17), CDRH2 variante 2 (Seq. ID No. 18), CDRH3 (Seq. ID No 19), CDRH3 variante 1 (Seq. ID No. 20), CHRH3 variante 2 (Seq. ID No. 21), o una combinación o variante de las mismas, injertada en un armazón de cadena pesada aceptora humana. En una modalidad, el anticuerpo monoclonal anti-aP2 comprende CDRs CDRH1 (Seq. ID No. 14), CDRH2 (Seq. ID No. 16), CDRH3 (Seq. ID No. 19), o variante de la misma, injertada en un armazón de cadena pesada aceptora humana. En una modalidad, el anticuerpo monoclonal anti-aP2 comprende CDRs CDRH1 (Seq. ID No. 14), CDRH2 variante 1 (Seq. ID No. 17), o CDRH3 variante 1 (Seq. ID No 20), o una variante de la misma, injertada en un armazón de cadena pesada aceptora humana. En una modalidad, el anticuerpo monoclonal anti-aP2 comprende CDRs CDRH1 variante 1 (Seq. ID No. 15) y CDRH2 variante 2 (Seq. ID No. 18), o una variante de la misma, injertada en un armazón

de cadena pesada aceptora humana. En una modalidad, el anticuerpo monoclonal anti-aP2 comprende CDRs CDRH1 variante 1 (Seq. ID No. 15), CDRH2 variante 2 (Seq. ID No. 18), o CDRH3 variante 2 (Seq. ID No 21), o una variante de la misma, injertada en un armazón de cadena pesada aceptora humana. En una modalidad, el armazón de cadena pesada aceptora humana se deriva a partir de una secuencia de aminoácido codificada por un gen IGHV humano para el armazón 1, 2, y 3, y un gen IGHJ para el armazón 4. Ejemplos no limitantes de las regiones de armazón aceptoras IGHV e IGHV de cadena pesada humana, se proporcionan, por ejemplo, en la Tabla 7.

Tabla 7: Secuencias de Regiones Variables de Cadena Pesada de Inmunoglobulina Humana

Rgiones FR variables de cadena pesada	**Seq. ID No.**	**Secuencia**
1-02 FR1	249	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS
1-02 FR2	250	WVRQAPGQGLEWMG
1-02 FR3	251	RVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCAR
1-03 FR1	252	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS
1-03 FR2	253	WVRQAPGQRLEWMG
1-03 FR3	254	RVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR
1-08 FR1	255	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS
1-08 FR2	256	WVRQATGQGLEWMG
1-08 FR3	257	RVTMTRNTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR
1-18 FR1	258	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS

Rgiones FR variables de cadena pesada	**Seq. ID No.**	**Secuencia**
1-18 FR2	259	WVRQAPGQGLEWMG
1-18 FR3	260	RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR
1-24 FR1	261	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVS
1-24 FR2	262	WVRQAPGKGLEWMG
1-24 FR3	263	RVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCAT
1-45 FR1	264	QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKAS
1-45 FR2	265	WVRQAPGQALEWMG
1-45 FR3	266	RVTITRDRSMSTAYMELSSLRSEDTAMYYCAR
1-46 FR1	267	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS
1-46 FR2	268	WVRQAPGQGLEWMG
1-46 FR3	269	RVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR
1-58 FR1	270	QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCKAS
1-58 FR2	271	WVRQARGQRLEWIG
1-58 FR3	272	RVTITRDMSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAA
1-69 FR1	273	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS
1-69 FR2	274	WVRQAPGQGLEWMG
1-69 FR3	275	RVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR
1-e FR1	276	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS
1-e FR2	277	WVRQAPGQGLEWMG
1-e FR3	278	RVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR
1-f FR1	279	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVS
1-f FR2	280	WVQQAPGKGLEWMG
1-f FR3	281	RVTITADTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCAT
2-05 FR1	282	QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFS
2-05 FR2	283	WIRQPPGKALEWLA

Rgiones FR variables de cadena pesada	**Seq. ID No.**	**Secuencia**
2-05 FR3	284	RLTITKDTSKNQVVLTMTNMDPVDTATYYCAHR
2-26 FR1	285	QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVS
2-26 FR2	286	WIRQPPGKALEWLA
2-26 FR3	287	RLTISKDTSKSQVVLTMTNMDPVDTATYYCARI
2-70 FR1	288	QVTLKESGPALVKPTQTLTLTCTFS
2-70 FR2	289	WIRQPPGKALEWLA
2-70 FR3	290	RLTISKDTSKNQVVLTMTNMDPVDTATYYCARI
3-07 FR1	291	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
3-07 FR2	292	WVRQAPGKGLEWVA
3-07 FR3	293	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
3-09 FR1	294	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAAS
3-09 FR2	295	WVRQAPGKGLEWVS
3-09 FR3	296	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKD
3-11 FR1	297	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS
3-11 FR2	298	WIRQAPGKGLEWVS
3-11 FR3	299	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
3-13 FR1	300	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
3-13 FR2	301	WVRQATGKGLEWVS
3-13 FR3	302	RFTISRENAKNSLYLQMNSLRAGDTAVYYCAR
3-15 FR1	303	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS
3-15 FR2	304	WVRQAPGKGLEWVG
3-15 FR3	305	RFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTT
3-20 FR1	306	EVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCAAS
3-20 FR2	307	WVRQAPGKGLEWVS
3-20 FR3	308	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYHCAR

Rgiones FR variables de cadena pesada	**Seq. ID No.**	**Secuencia**
3-21 FR1	309	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS
3-21 FR2	310	WVRQAPGKGLEWVS
3-21 FR3	311	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
3-23 FR1	312	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
3-23 FR2	313	WVRQAPGKGLEWVS
3-23 FR3	314	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK
3-30 FR1	315	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS
3-30 FR2	316	WVRQAPGKGLEWVA
3-30 FR3	317	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK
3-30.3 FR1	318	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS
3-30.3 FR2	319	WVRQAPGKGLEWVA
3-30.3 FR3	320	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
3-3 FR1	321	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS
3-30.5 FR2	322	WVRQAPGKGLEWVA
3-30.5 FR3	323	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK
3-3 FR13	324	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS
3-33 FR2	325	WVRQAPGKGLEWVA
3-33 FR3	326	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
3-43 FR1	327	EVQLVESGGVVVQPGGSLRLSCAAS
3-43 FR2	328	WVRQAPGKGLEWVS
3-43 FR3	329	RFTISRDNSKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCAKD
3-48 FR1	330	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
3-48 FR2	331	WVRQAPGKGLEWVS
3-48 FR3	332	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCAR
3-49 FR1	333	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTAS

Rgiones FR variables de cadena pesada	**Seq. ID No.**	**Secuencia**
3-49 FR2	334	WFRQAPGKGLEWVG
3-49 FR3	335	RFTISRDGSKSIAYLQMNSLKTEDTAVYYCTR
3-53 FR1	336	EVQLVETGGGLIQPGGSLRLSCAAS
3-53 FR2	337	WVRQAPGKGLEWVS
3-53 FR3	338	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
3-64 FR1	339	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
3-64 FR2	340	WVRQAPGKGLEYVS
3-64 FR3	341	RFTISRDNSKNTLYLQMGSLRAEDMAVYYCAR
3-66 FR1	342	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
3-66 FR2	343	WVRQAPGKGLEWVS
3-66 FR3	344	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
3-72 FR1	345	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
3-72 FR2	346	WVRQAPGKGLEWVG
3-72 FR3	347	RFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCAR
3-73 FR1	348	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS
3-73 FR2	349	WVRQASGKGLEWVG
3-73 FR3	350	RFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTR
3-74 FR1	351	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
3-74 FR2	352	WVRQAPGKGLVWVS
3-74 FR3	353	RFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
3-d FR1	354	EVQLVESRGVLVQPGGSLRLSCAAS
3-d FR2	355	WVRQAPGKGLEWVS
3-d FR3	356	RFTISRDNSKNTLHLQMNSLRAEDTAVYYCKK
4-04 FR1	357	QVQLQESGPGLVKPSGTLSLTCAVS
4-04 FR2	358	WVRQPPGKGLEWIG

Rgiones FR variables de cadena pesada	**Seq. ID No.**	**Secuencia**
4-04 FR3	359	RVTISVDKSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR
4-28 FR1	360	QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVS
4-28 FR2	361	WIRQPPGKGLEWIG
4-28 FR3	362	RVTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAVDTAVYYCAR
4-30.1 FR1	363	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVS
4-30.1 FR2	364	WIRQHPGKGLEWIG
4-30.1 FR3	365	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR
4-3 FR1	366	QLQLQESGSGLVKPSQTLSLTCAVS
4-30.2 FR2	367	WIRQPPGKGLEWIG
4-30.2 FR3	368	RVTISVDRSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR
4-3 FR10.4	369	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVS
4-30.4 FR2	370	WIRQPPGKGLEWIG
4-30.4 FR3	371	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR
4-3 FR1	372	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVS
4-31 FR2	373	WIRQHPGKGLEWIG
4-31 FR3	374	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR
4-34 FR1	375	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY
4-34 FR2	376	WIRQPPGKGLEWIG
4-34 FR3	377	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR
4-39 FR1	378	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS
4-39 FR2	379	WIRQPPGKGLEWIG
4-39 FR3	380	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR
4-59 FR1	381	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS
4-59 FR2	382	WIRQPPGKGLEWIG
4-59 FR3	383	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR

Rgiones FR variables de cadena pesada	**Seq. ID No.**	**Secuencia**
4-61 FR1	384	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS
4-61 FR2	385	WIRQPPGKGLEWIG
4-61 FR3	386	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR
4-b FR1	387	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAVS
4-b FR2	388	WIRQPPGKGLEWIG
4-b FR3	389	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR
5-51 FR1	390	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGS
5-51 FR2	391	WVRQMPGKGLEWMG
5-51 FR3	392	QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR
5-a FR1	393	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGS
5-a FR2	394	WVRQMPGKGLEWMG
5-a FR3	395	HVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR
6-01 FR1	396	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAIS
6-01 FR2	397	WIRQSPSRGLEWLG
6-01 FR3	398	RITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAR
7-4.1 FR1	399	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKAS
7-4.1 FR2	400	WVRQAPGQGLEWMG
7-4.1 FR3	401	RFVFSLDTSVSTAYLQICSLKAEDTAVYYCAR
JH1 FR4	402	WGQGTLVTVSS
JH2 FR4	403	WGRGTLVTVSS
JH3 FR4	404	WGQGTMVTVSS
JH4 FR4	405	WGQGTLVTVSS
JH5 FR4	406	WGQGTLVTVSS

Rgiones FR variables de cadena pesada	**Seq. ID No.**	**Secuencia**
JH6 FR4	407	WGQGTTVTVSS

La región constante de cadena pesada de inmunoglobulina para uso en la presente invención es determinante en la clase de inmunoglobulina deseada. Todas las clases de inmunoglobulinas—IgG, IgD, IgA, IgM e IgE—están en la presente contemplada. Por ejemplo, si la inmunoglobulina deseada es IgG, entonces la secuencia de aminoácido que codifica la región constante de cadena pesada IgG (IGGH), puede ser usada. Las regiones constantes de cadena pesada de inmunoglobulina que pueden ser usadas en la presente invención incluyen aquellas de IGGH, IGDH, IGAH, IGMH, e IGEH (Seq. ID Nos. 408-443) proporcionadas en la Tabla 8 abajo, y variantes alélicas de las mismas, las cuales se conocen en general en la técnica, por ejemplo, como se identifica en la entrada OMIM 147100 para variantes IGGH1, 147110 para variantes IGGH2, 147120 para variantes IGGH3, 147130 para variantes IGGH4, 146900 para variantes IGAH1, 147000 para variantes IGAH2, 147180 para variantes IGEH, 147020 para variantes IGMH, 147170 para variantes IGDH, todas las cuales están incorporadas por referencia en la presente. En ciertas modalidades, la región bisagra de una clase de inmunoglobulina particular puede ser usada para construir el

anticeurpo contemplado en la presente. En una modalidad, la región bisagra puede ser derivada a partir de una secuencia de aminoácido de la región bisagra natural como se describe en la Tabla 8 (Seq. ID Nos. 409, 413, 417, 425, 429, 433, y 437), o una variante de la misma. En una modalidad, la región bisagra puede ser sintéticamente generada. Se contemplan además en la presente anticuerpos de inmunoglobulina clase IgA e IgM, la cual, en una modalidad, puede ser formada en complejo con un polipéptido de unión descrito en la Tabla 9, o una variante del misma.

Tabla 8. Región Constante de Cadena Pesada de Inmunoglobulina

Región constante de cadena pesada	**Seq. ID No.**	**Secuencia**
IGAH1 CH1	408	ASPTSPKVFPLSLCSTQPDGNVVIACLVQGFFPQEPLSV TWSESGQGVTARNFPPSQDASGDLYTTSSQLTLPATQCL AGKSVTCHVKHYTNPSQDVTVPCP
IGAH1 Bisagra	409	PSTPPTPSPSTPPTPSPS
IGAH1 CH2	410	CCHPRLSLHRPALEDLLLGSEANLTCTLTGLRDASGVTF TWTPSSGKSAVQGPPERDLCGCYSVSSVLPGCAEPWNHG KTFTCTAAYPESKTPLTATLSKS
IGAH1 CH3	411	GNTFRPEVHLLPPPSEELALNELVTLTCLARGFSPKDVL VRWLQGSQELPREKYLTWASRQEPSQGTTTFAVTSILRV AAEDWKKGDTFSCMVGHEALPLAFTQKTIDRLA
IGAH2 CH1	412	ASPTSPKVFPLSLDSTPQDGNVVVACLVQGFFPQEPLSV

Región constante de cadena pesada	**Seq. ID No.**	**Secuencia**
		TWSESGQNVTARNFPPSQDASGDLYTTSSQLTLPATQCP DGKSVTCHVKHYTNPSQDVTVPCP
IGAH2 Bisagra	413	PPPPP
IGAH2 CH2	414	CCHPRLSLHRPALEDLLLGSEANLTCTLTGLRDASGATF TWTPSSGKSAVQGPPERDLCGCYSVSSVLPGCAQPWNHG ETFTCTAAHPELKTPLTANITKS
IGAH2 CH3	415	GNTFRPEVHLLPPPSEELALNELVTLTCLARGFSPKDVL VRWLQGSQELPREKYLTWASRQEPSQGTTTFAVTSILRV AAEDWKKGDTFSCMVGHEALPLAFTQKTIDRLA
IGDH CH1	416	APTKAPDVFPIISGCRHPKDNSPVVLACLITGYHPTSVT VTWYMGTQSQPQRTFPEIQRRDSYYMTSSQLSTPLQQWR QGEYKCVVQHTASKSKKEIFRWP
IGDH Bisagra	417	ESPKAQASSVPTAQPQAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGE EKKKEKEKEEQEERETKTP
IGDH CH2	418	ECPSHTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLK DAHLTWEVAGKVPTGGVEEGLLERHSNGSQSQHSRLTLP RSLWNAGTSVTCTLNHPSLPPQRLMALREP
IGDH CH3	419	AAQAPVKLSLNLLASSDPPEAASWLLCEVSGFSPPNILL MWLEDQREVNTSGFAPARPPPQPRSTTFWAWSVLRVPAP PSPQPATYTCVVSHEDSRTLLNASRSLEVS
IGEH CH1	420	ASTQSPSVFPLTRCCKNIPSNATSVTLGCLATGYFPEPV MVTCDTGSLNGTTMTLPATTLTLSGHYATISLLTVSGAW AKQMFTCRVAHTPSSTDWVDNKTFS
IGEH CH2	421	VCSRDFTPPTVKILQSSCDGGGHFPPTIQLLCLVSGYTP GTINITWLEDGQVMDVDLSTASTTQEGELASTQSELTLS QKHWLSDRTYTCQVTYQGHTFEDSTKKCA

Región constante de cadena pesada	**Seq. ID No.**	**Secuencia**
IGEH CH3	422	DSNPRGVSAYLSRPSPFDLFIRKSPTITCLVVDLAPSKG TVNLTWSRASGKPVNHSTRKEEKQRNGTLTVTSTLPVGT RDWIEGETYQCRVTHPHLPRALMRSTTKTS
IGEH CH4	423	GPRAAPEVYAFATPEWPGSRDKRTLACLIQNFMPEDISV QWLHNEVQLPDARHSTTQPRKTKGSGFFVFSRLEVTRAE WEQKDEFICRAVHEAASPSQTVQRAVSVNP
IGGH1 CH1	424	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKV
IGGH1 Bisagra	425	EPKSCDKTHTCPPCP
IGGH1 CH2	426	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
IGGH1 CH3	427	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
IGGH2 CH1	428	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGT QTYTCNVDHKPSNTKVDKTV
IGGH2 Bisagra	429	ERKCCVECPPCP
IGGH2 CH2	430	APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVV HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTK
IGGH2 CH3	431	GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV

Región constante de cadena pesada	**Seq. ID No.**	**Secuencia**
		EWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
IGGH3 CH1	432	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYTCNVNHKPSNTKVDKRV
IGGH3 Bisagra	433	ELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDT PPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCP
IGGH3 CH2	434	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTK
IGGH3 CH3	435	GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESSGQPENNYNTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNIFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSP
IGGH4 CH1	436	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT KTYTCNVDHKPSNTKVDKRV
IGGH4 Bisagra	437	ESKYGPPCPSCP
IGGH4 CH2	438	APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQE DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK
IGGH4 CH3	439	GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSL
IGMH CH1	440	GSASAPTLFPLVSCENSPSDTSSVAVGCLAQDFLPDSIT LSWKYKNNSDISSTRGFPSVLRGGKYAATSQVLLPSKDV MQGTDEHVVCKVQHPNGNKEKNVPLP

Región constante de cadena pesada	**Seq. ID No.**	**Secuencia**
IGMH CH2	441	VIAELPPKVSVFVPPRDGFFGNPRKSKLICQATGFSPRQ IQVSWLREGKQVGSGVTTDQVQAEAKESGPTTYKVTSTL TIKESDWLGQSMFTCRVDHRGLTFQQNASSMCVP
IGMH CH3	442	DQDTAIRVFAIPPSFASIFLTKSTKLTCLVTDLTTYDSV TISWTRQNGEAVKTHTNISESHPNATFSAVGEASICEDD WNSGERFTCTVTHTDLPSPLKQTISRPK
IGMH CH4	443	GVALHRPDVYLLPPAREQLNLRESATITCLVTGFSPADV FVQWMQRGQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYFAHSILTV SEEEWNTGETYTCVAHEALPNRVTERTVDKST

Tabla 9. Polipéptido de Unión para Anticuerpos Clase IgA e IgM

Proteína Ig	**Seq. ID No.**	**Secuencia**
Polipéptido de unión	444	QEDERIVLVDNKCKCARITSRIIRSSEDPNEDIVERNIRIIVP LNNRENISDPTSPLRTRFVYHLSDLCKKCDPTEVELDNQIVTA TQSNICDEDSATETCYTYDRNKCYTAVVPLVYGGETKMVETAL TPDACYPD

Modificaciones de Armazón Humana y CDR

Riechmann et al., encontró que la transferencia de las CDRs solas (como se define por Kabat (Kabat et al. (supra) y Wu et al., J. Exp. Med., 132, 211-250, 1970)) no fue suficiente para proporcionar la actividad de unión

satisfactoria al antígeno en el producto injertado con CDR. Se encontró que un número de residuos de armazón tienen que ser alterados de manera que corresponden a aquellos de la región de armazón donadora. El criterio propuesto para selección en el cual los residuos de armazón necesitan alterados se decribe en la Solicitud de Patente Internacional WO 90/07861, la cual es incorporada en la presente.

La sustitución de CDRs no humanas en un armazón de dominio variable humano es más probable que resulte en la retención de la orientación espacial correcta de las CDRs si el armazón de dominio variable humano adopta la misma o similar conformación al armazón variable no humano a partir del cual se originaron las CDRs. Esto se logra obteniendo los dominios variables humanos a partir de anticuerpos humanos cuyas secuencias de armazón presentan un alto grado de identidad de secuencia con los dominios de armazón variable no humanos a partir de las cuales las CDRs fueron derivadas. Como se describe anteriormente, las regiones variables de armazón de cadena pesada y ligera pueden ser derivadas a partir de las mismas o diferentes secuencias de anticuerpo humano. Las secuencias de anticuerpo humano pueden ser las secuencias de anticuerpos humanos que se originan naturalmente o pueden ser secuencias consenso de varios anticuerpos humanos. Véase Kettleborough et al, Protein Engineering 4:773 (1991); Kolbinger et al., Protein

Engineering 6:971 (1993) y Carter et al, WO 92/22653.

Habiendo identificado las regiones determinantes de complementariedad de la inmunoglobulina donadora no humana e inmunoglobulinas aceptoras humanas apropiadas, la siguiente etapa es determinar cuales, si los hay, residuos de estos componentes deben ser sustituidos para optimizar las propiedades del anticuerpo humanizado resultante. En general, la sustitución de residuos humanos de aminoácido con residuos no humanos de aminoácido debe ser minimizada, debido a que la introducción de residuos no humanos incrementa el riesgo del anticuerpo provocando una respuesta de anticuerpo antidonador humano (HADA) en humanos. Los métodos reconocidos en la técnica para determinar respuestas inmunes pueden ser realizados para monitorear una respuesta HADA en un hospedero particular o durante ensayos clínicos. Los anticuerpos humanizados administrados a los hospederos pueden ser porporcionados con una evaluación de inmunogenicidad al comienzo y a través de la administración de tal terapia. La respuesta HADA es medida, por ejemplo, detectando anticuerpos con el reactivo terapéutico humanizado, en muestras de suero a partir del hospedero usando un método conocido por un experto en la técnica, que incluye tecnología de resonancia de plasmón de superficie (BIACORE) y/o análisis de ELISA de fase sólida.

La selección de residuos de aminoácido para

sustitución se determina, en parte, por modelado por ordenador. El software y hardware de ordenador son descritos en la presente para producir imágenes tri-dimensionales de moléculas de inmunoglobulinas. En general, se producen modelos moleculares iniciando a partir de estructuras resueltas a partir de cadenas de inmunoglobulinas o dominios de las mismas. Las cadenas que serán modeladas son comapradas por similitud de secuencia de aminoácido con cadenas o dominios de estructuras tri-dimensionales resueltas, y las cadenas o dominios que muestran las similitudes de secuencia más grande es/son seleccionados como puntos de inicio para construcción del modelo molecular. Las cadenas o dominios que portan al menos 50% de identidad de secuencia son seleccionados para modelación, y preferiblemente aquellos que comparten al menos 60%, 70%, 80%, 90%, de identidad de secuencia o más se seleccionan para modelación. Las estructuras iniciadoras resueltas son modificadas para permitir las diferencias entre los aminoácidos actuales en las cadenas o dominios de inmunoglobulinas siendo modelados, y aquellos en la estructura iniciadora. Las estructuras modificadas son entonces ensambladas en una inmunoglobulina compuesta. Finalmente, el modelo es refinado por minimización de energía y verificando que todos los átomos estén dentro de las distancias apropiadas de entre sí y que las longitudes de unión y ángulos estén dentro de los límites químicamente

aceptables.

La selección de residuos de aminoácido para sustitución también puede ser determinada, en parte, por examinación de las características de los aminoácidos en ubicaciones particulares, u observación empírica de los efectos de sustitución o mutagénesis de aminoácidos particulares. Por ejemplo, cuando un amino ácido difiere entre un residuo de la región de armazón variable donadora y un residuo de armazón de región variable humana seleccionado, el aminoácido de armazón humana debe ser usualmente sustituido por el aminoácido de armazón equivalente a partir del anticuerpo donador cuando se espera razonablemente que el aminoácido:

(1) se une de manera no covalente a un antígeno directamente,

(2) es adyacente a una región CD,

(3) interactúa de otro modo con una región CDR (por ejemplo, está dentro de aproximadamente 3-6 Angströms de una región CDR como se determina por modelación por computadora), o

(4) participa en la interfaz VL-VH.

Los residuos los cuales "se unen de manera no covalente al antígeno directamente" incluyen aminoácidos en las posiciones en las regiones de armazón, las cuales tienen una buena probabilidad de interacturar directamente con

aminoácidos en el antígeno de conformidad con las fuerzas químicas establecidas, por ejemplo, or unión de hidrógeno, fuerzas Van der Waals, interacciones hidrofóbicas, y similares. Las regiones de armazón y CDR son como se definen por Kabat et al. o Chothia et al., *supra*. Cuando los residuos de armazón, como se define por Kabat et al., *supra*, constituyen residuos de bucle esdtructural como se define por Chothia et al., *supra*, los aminoácidos presentes en el anticuerpo donador pueden ser seleccionados para sustitución en el anticuerpo humanizado. Los residuos los cuales son "adyacentes a una región CDR" incluyen residuos de aminoácido en las posiciones inmediatamente adyacentes a una o más de las CDRs en la secuencia primaria de la cadena de inmunoglobulina humanizada, por ejemplo, en las posiciones inmediatamente adyacentes a una CDR como se define por Kabat, o una CDR como se define por Chothia (Véase por ejemplo, Chothia and Lesk 1MB 196:901 (1987)). Estos aminoácidos son particularmente probable que interactúan con los aminoácidos en las CDRs y, si se eligen a partir del aceptor, distorsionan las CDRs del donador y reducen la afinidad. Sin embargo, los aminoácidos adyacentes pueden interactuar directamente con el antígeno (Amit et al, Science, 233:747 (1986), la cual es incorporada en la presente por referencia) y puede ser desado seleccionar estos aminoácidos a partir del donador para mantener todos los contactos del antígeno que

proporcionan afinidad en el anticuerpo original.

Los residuos que "interactúan de otro modo con una región CDR" incluyen aquellos que son determinados por análisis estructural secundario por estar en una orientación espacial suficiente para efectuar una región CDR. En una modalidad, los residuos que "interactúan de otro modo con una región CDR" son identificados analizando un modelo tri-dimensional de la inmunoglobulina donadora (por ejemplo, un modelo generado por ordenador). Un modelo tri-dimensional, típicamente del anticuerpo donador original, muestra que ciertos aminoácidos fuera de las CDRs son cercanos a las CDRs y tienen una buena probabilidad para interactuar con aminoácidos en las CDRs por unión de hidrógeno, fuerzas Van der Waals, interacciones hidrofóbicas, etc. En estas posiciones de aminoácido, el aminoácido de inmunoglobulina del donador en lugar del aminoácido de inmunoglobulina del aceptor, también puede ser seleccionado. Los aminoácidos de conformidad con este criterio en general tendrán un átomo de cadena lateral dentro de aproximadamente 3 unidades de angström (A) de algún átomo en las CDRs y debe contener un átomo que podría interactuar con los átomos de CDR de conformidad con las fuerzas químicas establecidas, tales como aquellas listadas anteriormente. En el caso de que los átomos que pueden formar un enlace hidrógeno, el 3 **Å** es medido entre sus núcleos, pero para átomos que no forman un enlace; el 3 **Å**

es medido entre sus fuerzas Van der Waals. Por lo tanto, en el último caso, los núcleos deben estar dentro de aproximadamente 6 **Å** (3 **Å** más la suma del radio de Van der Waals) para los átomos considerados por ser capaces de interactuar. En muchos casos, los núcleos serán desde 4 o 5 hasta 6 **Å** aparte. En la determinación de si un aminoácido puede interactuar con las CDR, se prefiere no considerar los últimos 8 aminoácidos de las CDR 2 de cadena pesada como parte de las CDRs, debido a que desde el punto de vista de la estructura, estos 8 aminoácidos se comportan más como parte del armazón armazón.

Los aminoácidos que son capaces de interactuar con aminoácidos en las CDRs, pueden ser identificados en aún otra forma. El área de superficie accesible al solvente de cada aminoácido de armazón es calculada en dos formas: (1) en el anticuerpo intacto, y (2) en una molécula hipotética que consiste de anticuerpo con sus CDRs removidas. Una diferencia significante entre estos números de aproximadamente 10 angströms cuadrados o más, muestra que el acceso del aminoácido de armazón al solvente es al menos parcialmente bloqueado por las CDRs, y por lo tanto que el aminoácido está haciendo contacto con las CDRs. El área de superficie accesible al solvente de un aminoácido puede ser calculada con base en un modelo tri-dimensional de un anticuerpo, usando algoritmos conocidos enla técnica (por ejemplo,

Connolly, J. Appl. Cryst. 16:548 (1983) y Lee and Richards, J. Mol. Biol. 55:379 (1971), ambos de los cuales son incorporados en la presente por referencia). Los aminoácidos de armazón también interactúan ocasionalmente con las CDRs indirectamente, afectando la conformación de otro aminoácido de armazón que a su vez, contacta las CDRs.

Los aminoácidos particulares en varias posiciones en el armazón se conocen por ser capaces de interactuar con las CDRs en muchos anticuerpos (Chothia and Lesk, *supra*, Chothia et al., *supra* y Tramontano et al., J. Mol. Biol. 215:175 (1990), todas las cuales son incorpordas en la presente por referencia). Notablemente, los aminoácidos en las posiciones 2, 48, 64, y 71 de la cadena ligera y 71 y 94 de la cadena pesada (numeración de conformidad con Kabat) se conocen por ser capaces de interactuar con las CDRs en muchos anticuerpos. Los aminoácidos en las posiciones 35 en la cadena ligera y 93 y 103 en la cadena pesada también son probables que interactúen con las CDRs. En todas estas posiciones numeradas, se prefiere la elección del aminoácido donador en lugar del aminoácido aceptor (cuando difieren) para estar en la inmunoglobulina humanizada. Por otro lado, ciertos residuos capaces de interactuar con la región CDR, tal como los primeros 5 aminoácidos de la cadena ligera, pueden algunas veces ser elegidos a partir de la inmunoglobulina del aceptor sin la pérdida de afinidad en la

inmunoglobulina humanizada.

En una modalidad, se proporciona un anticuerpo humanizado a aP2 que comprende al menos una CDR de cadena ligera seleccionada a partir de las Seq. ID Nos. 7-13, al menos una CDR de cadena pesada seleccionada de las Seq. ID Nos. 14-21, y al menos una sustitución dentro de un armazón aceptora humana, en donde la sustitución se deriva a partir de un residuo donador.

En un ejemplo se proporciona un anticuerpo humanizado, en donde al menos los residuos en una de las posiciones 23, 67, 71, 72, 73, 74, 76, 77, 78, 79, 88, 89, 91, 93 y 94 del dominio variable de la cadena pesada (numeración Kabat) son residuos donadores. En una modalidad, al menos los residuos en una de las posiciones 23, 67, 71, 72, 73, 74, 77, 78, 79, 89, y 91 del dominio variable de la cadena pesada (numeración Kabat) son residuos donadores. En una modalidad, al menos los residuos en una de las posiciones 23, 67, 71, 72, 73, 74, 77, 78, 79, 88, 89, 91, 93, y 94 del dominio variable de la cadena pesada (numeración Kabat) son residuos donadores, pero opcionalmente (y en cualquier permutación) uno o más de los residuos en las posiciones 23, 67, 71, 72, 73, 74, 77, 78, 79, 88, 89, 91, 93, y 94 pueden usar la secuencia aceptora humana. Véase por ejemplo las secuencias proporcionadas en las Seq. ID Nos. 455, 457, 459, 461, y 463.

En una modalidad, las CDRs son Seq. ID No. 14, Seq. ID No. 16 o Seq. ID No. 17, y Seq. ID No. 19 o Seq. ID No. 20, y el residuo 1 del dominio variable de cadena pesada son reemplazados con un aminoácido alternativo, por ejemplo, ácido glutámico.

En una modalidad, las CDRs son Seq. ID No. 14, Seq. ID No. 16 o Seq. ID No. 17, y Seq. ID No. 19 o Seq. ID No. 20, y el residuo 23 del dominio variable de cadena pesada son reemplazados con un aminoácido alternativo, por ejemplo, treonina.

En una modalidad, las CDRs son Seq. ID No. 14, Seq. ID No. 16 o Seq. ID No. 17, y Seq. ID No. 19 o Seq. ID No. 20, y el residuo 23 de la cadena pesada es alanina.

En una modalidad, las CDRs son Seq. ID No. 14, Seq. ID No. 16 o Seq. ID No. 17, y Seq. ID No. 19 o Seq. ID No. 20, y el residuo 67 del dominio variable de cadena pesada son reemplazados con un aminoácido alternativo, por ejemplo, fenilalanina.

En una modalidad, las CDRs son Seq. ID No. 14, Seq. ID No. 16 o Seq. ID No. 17, y Seq. ID No. 19 o Seq. ID No. 20, y el residuo 67 del dominio variable de cadena pesada es valina.

En una modalidad, las CDRs son Seq. ID No. 14, Seq. ID No. 16 o Seq. ID No. 17, y Seq. ID No. 19 o Seq. ID No. 20, y el residuo 71 del dominio variable de cadena pesada son

reemplazados con un aminoácido alternativo, por ejemplo, lisina.

En una modalidad, las CDRs son Seq. ID No. 14, Seq. ID No. 16 o Seq. ID No. 17, y Seq. ID No. 19 o Seq. ID No. 20, y el residuo 71 del dominio variable de cadena pesada es valina.

En una modalidad, las CDRs son Seq. ID No. 14, Seq. ID No. 16 o Seq. ID No. 17, y Seq. ID. No 19 o Seq. ID No. 20, y el residuo 72 del dominio variable de cadena pesada son reemplazados con un aminoácido alternativo, por ejemplo, alanina.

En una modalidad, las CDRs son Seq. ID No. 14, Seq. ID No. 16 o Seq. ID No. 17, y Seq. ID. No 19 o Seq. ID No. 20, y el residuo 72 del dominio variable de cadena pesada es ácido aspártico.

En una modalidad, las CDRs son Seq. ID No. 14, Seq. ID No. 16 o Seq. ID No. 17, y Seq. ID No. 19 o Seq. ID No. 20, y el residuo 73 del dominio variable de cadena pesada son reemplazados con un aminoácido alternativo, por ejemplo, serina.

En una modalidad, las CDRs son Seq. ID No. 14, Seq. ID No. 16 o Seq. ID No. 17, y Seq. ID No. 19 o Seq. ID No. 20, y el residuo 73 del dominio variable de cadena pesada es lisina.

En una modalidad, las CDRs son Seq. ID No. 14, Seq.

ID No. 16 o Seq. ID No. 17, y Seq. ID No. 19 o Seq. ID No. 20, y el residuo 74 del dominio variable de cadena pesada son reemplazados con un aminoácido alternativo, por ejemplo, treonina.

En una modalidad, las CDRs son Seq. ID No. 14, Seq. ID No. 16 o Seq. ID No. 17, y Seq. ID No. 19 o Seq. ID No. 20, y el residuo 74 del dominio variable de cadena pesada es serina.

En una modalidad, las CDRs son Seq. ID No. 14, Seq. ID No. 16 o Seq. ID No. 17, y Seq. ID No. 19 o Seq. ID No. 20, y el residuo 77 del dominio variable de cadena pesada son reemplazados con un aminoácido alternativo, por ejemplo, treonina.

En una modalidad, las CDRs son Seq. ID No. 14, Seq. ID No. 16 o Seq. ID No. 17, y Seq. ID No. 19 o Seq. ID No. 20, y el residuo 77 del dominio variable de cadena pesada es glutamina.

En una modalidad, las CDRs son Seq. ID No. 14, Seq. ID No. 16 o Seq. ID No. 17, y Seq. ID No. 19 o Seq. ID No. 20, y el residuo 78 del dominio variable de cadena pesada son reemplazados con un aminoácido alternativo, por ejemplo, valina.

En una modalidad, las CDRs son Seq. ID No. 14, Seq. ID No. 16 o Seq. ID No. 17, y Seq. ID No. 19 o Seq. ID No. 20, y el residuo 78 del dominio variable de cadena pesada es

fenilalanina.

En una modalidad, las CDRs son Seq. ID No. 14, Seq. ID No. 16 o Seq. ID No. 17, y Seq. ID No. 19 o Seq. ID No. 20, y el residuo 79 del dominio variable de cadena pesada son reemplazados con un aminoácido alternativo, por ejemplo, ácido aspártico.

En una modalidad, las CDRs son Seq. ID No. 14, Seq. ID No. 16 o Seq. ID No. 17, y Seq. ID No. 19 o Seq. ID No. 20, y el residuo 79 del dominio variable de cadena pesada es serina.

En una modalidad, las CDRs son Seq. ID No. 14, Seq. ID No. 16 o Seq. ID No. 17, y Seq. ID No. 19 o Seq. ID No. 20, y el residuo 89 del dominio variable de cadena pesada son reemplazados con un aminoácido alternativo, por ejemplo, treonina.

En una modalidad, las CDRs son Seq. ID No. 14, Seq. ID No. 16 o Seq. ID No. 17, y Seq. ID No. 19 o Seq. ID No. 20, y el residuo 89 del dominio variable de cadena pesada es valina.

En una modalidad, las CDRs son Seq. ID No. 14, Seq. ID No. 16 o Seq. ID No. 17, y Seq. ID No. 19 o Seq. ID No. 20, y el residuo 91 del dominio variable de cadena pesada son reemplazados con un aminoácido alternativo, por ejemplo, fenilalanina.

En una modalidad, las CDRs son Seq. ID No. 14, Seq.

ID No. 16 o Seq. ID No. 17, y Seq. ID No. 19 o Seq. ID No. 20, y el residuo 91 del dominio variable de cadena pesada es tirosina.

En una modalidad, las CDRs son Seq. ID No. 14, Seq. ID No. 16 o Seq. ID No. 17, y Seq. ID No. 19 o Seq. ID No. 20, y el residuo 23 es alanina, el residuo 67 es valina, el residuo 71 es valina, el residuo 72 es ácido aspártico, reside 73 es lisina, el residuo 74 es serina, el residuo 77 es glutamina, el residuo 78 es fenilalanina, el residuo 79 es serina, el residuo 89 es valina, y el residuo 91 es tirosina.

Por consiguiente, en un ejemplo se proporciona un anticuerpo humanizado, en donde al menos los residuos en una de las posiciones 2, 3, 36, 37, 58, 63, o 70 del dominio variable de la cadena ligera (numeración Kabat) son residuos donadores. En una modalidad, al menos los residuos en una de las posiciones 2, 3, 63, o 70 del dominio variable de la cadena ligera (numeración Kabat) son residuos donadores. Véase por ejemplo las secuencias proporcionadas en las Seq. ID Nos. 446, 448, 450, y 452.

En una modalidad, las CDRs son Seq. ID No. 7, Seq. ID No. 8, y Seq. ID No. 9, Seq. ID No. 10, Seq. ID No. 11, o Seq. ID No. 12, y el residuo 2 del dominio variable de cadena ligera son reemplazados con un aminoácido alternativo, por ejemplo, valina.

En una modalidad, las CDRs son Seq. ID No. 7, Seq.

ID No. 8, y Seq. ID No. 9, Seq. ID No. 10, Seq. ID No. 11, o Seq. ID No. 12, y el residuo 2 del dominio variable de cadena ligera es isoleucina.

En una modalidad, las CDRs son Seq. ID No. 7, Seq. ID No. 8, y Seq. ID No. 9, Seq. ID No. 10, Seq. ID No. 11, o Seq. ID No. 12, y el residuo 3 del dominio variable de cadena ligera son reemplazados con un aminoácido alternativo, por ejemplo, valina.

En una modalidad, las CDRs son Seq. ID No. 7, Seq. ID No. 8, y Seq. ID No. 9, Seq. ID No. 10, Seq. ID No. 11, o Seq. ID No. 12, y el residuo 3 del dominio variable de cadena ligera es glutamina.

En una modalidad, las CDRs son Seq. ID No. 7, Seq. ID No. 8, y Seq. ID No. 9, Seq. ID No. 10, Seq. ID No. 11, o Seq. ID No. 12, y el residuo 63 del dominio variable de cadena ligera son reemplazados con un aminoácido alternativo, por ejemplo, lisina.

En una modalidad, las CDRs son Seq. ID No. 7, Seq. ID No. 8, y Seq. ID No. 9, Seq. ID No. 10, Seq. ID No. 11, o Seq. ID No. 12, y el residuo 63 del dominio variable de cadena ligera es serina.

En una modalidad, las CDRs son Seq. ID No. 7, Seq. ID No. 8, y Seq. ID No. 9, Seq. ID No. 10, Seq. ID No. 11, o Seq. ID No. 12, y el residuo 70 del dominio variable de cadena ligera son reemplazados con un aminoácido alternativo,

por ejemplo, ácido aspártico.

En una modalidad, las CDRs son Seq. ID No. 7, Seq. ID No. 8, y Seq. ID No. 9, Seq. ID No. 10, Seq. ID No. 11, o Seq. ID No. 12, y el residuo 70 del dominio variable de cadena ligera es ácido glutámico.

En una modalidad, las CDRs son Seq. ID No. 7, Seq. ID No. 8, y Seq. ID No. 9, Seq. ID No. 10, Seq. ID No. 11, o Seq. ID No. 12, y el residuo 2 es isoleucina, el residuo 3 es glutamina, el residuo 63 es serina, el residuo 70 es ácido glutámico.

Los residuos los cuales "participan en la interfaz VL-VH" o "residuos empacados" incluyen aquellos residuos en la interfaz entre VL y VH como se define, por ejemplo, por Novotny and Haber, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:4592-66 (1985) o Chothia et al, supra. En general, los residuos de empacado inusuales deben ser retenidos en el anticuerpo humanizado si difieren de aquellos en las armazones humanas.

En general, uno o más de los aminoácidos que cubren completamente el criterio anterior es sustituido. En algunas modalidades, toda o la mayoría de los aminoácidos que cubren completamente el criterio anterior son sustituidos. Ocasionalmente, existe alguna ambiguedad alrededor de si un aminoácido particular cubre el criterio anterior, y se producen inmunoglobulinas variantes alternativas, una de las cuales tiene tal sustitución particular, la otra de las

cuales no. Las inmunoglobulinas variantes alternativas así producidas pueden ser probadas en cualquiera de los ensayos descritos en la presente para la actividad deseada, y la inmunoglobulina preferida seleccionada.

Usualmente, las regiones CDR en anticuerpo humanizados son sustancialmente idénticas, y más usualmente, idénticas a regiones CDR correspondientes del anticuerpo donador. Aunque no es usualmente deseable, algunas veces es posible hacer una o más sustituciones conservativas de aminoácido de residuos CDR sin afectar apreciablemente la afinidad de unión de la inmunoglobulina humanizada resultante. Por sustituciones similares o conservativas se pretenden combinaciones tales como, por ejemplo, leucina siendo sustituida por isoleucina o valina. Otros aminoácidos, los cuales pueden a menudo ser sustituidos por otros, incluyen pero no se limitan a:

fenilalanina, tirosina y triptofano (aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas);

lisina, arginina e histidina (aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas);

aspartato y glutamato (aminoácidos que tienen cadenas laterales acídicas);

asparagina y glutamina (aminoácidos que tienen cadenas laterales amida); y,

cisteína y metionina (aminoácidos que tienen

cadenas laterales que contienen azufre).

Los candidatos adicionales para sustitución son aminoácidos de armazón humana aceptora que son inusuales o "raros" para una inmunoglobulina humana en tal posición. Estos aminoácidos pueden ser sustituidos con aminoácidos a partir de la posición equivalente del anticuerpo donador o a partir de las oosiciones equivalentes de inmunoglobulinas humanas más típicas. Por ejemplo, la sustitución puede ser deseable cuando el aminoácido en una región de armazón humana de la inmunoglobulina aceptora es rara para tal posición y el aminoácido correspondiente en la inmunoglobulina donadora es común para tal posición en las secuencias de inmunoglobulina humana; o cuando el aminoácido en la inmunoglobulina aceptora es raro para tal posición y el aminoácido correspondiente en la inmunoglobulina donadora también es raro, con relación a otras secuencias humanas. Este criterio ayuda a segurar que un aminoácido atípico en el armazón humana no altera la estructura del antígeno. Sin embargo, reemplazando un aminoácido aceptor humano inusual con un aminoácido a partir del anticuerpo donador que ocurre por ser típico para anticuerpos humanos, el anticuerpo humanizado puede ser elaborado menos inmunogénico.

El término "raro", como se usa en la presente, indica un aminoácido que se origina en tal posición en menos de aproximadamente 20% pero usualmente menos de

aproximadamente 10% de secuencias en una muestra de secuencias representativas, y el término "común", como se usa en la presente, indica un aminoácido que se origina en más de aproximadamente 25% pero usualmente más de aproximadamente 50% de secuencias en una muestra representativa. Por ejemplo, todas las secuencias de región variable de cadena pesada y ligera humanas, son respectivamente agrupadas en "subgrupos" de secuencias que son especialmente homólogas entre sí y tienen los mismos aminoácidos en ciertas posiciones críticas (Kabat et al, supra). Cuando se decide si un aminoácido en una secuencia aceptora humana es "raro" o "común" entre secuencias humanas, a menudo es preferible considerar solamente aquellas secuencias humanas en el mismo subgrupo como la secuencia aceptora.

Los candidatos adicionales para sustitución son aminoácidos de armazón humana aceptora que podrían ser identificados como parte de una región CDR bajo la definición alternativa propuesta por Chothia et al., *supra*. Los candidatos adicionales para sustitución son aminoácidos de armazón humana aceptora que podrían ser identificados como parte de una región CDR bajo las CDRs de las Seq. ID Nos. 7-21 como se describe en la presente y/o las definiciones de contacto descritas en la presente.

Los candidatos adicionales para sustitución son residuos de armazón aceptores que corresponden a un residuo

de armazón donador raro o inusual. Los residuos donadores de armazón raros o inusuales son aquellos que son raros o insuales (como se define en la presente) para anticuerpos donadores en tal posición. Para donadores de anticuerpo, el subgrupo puede ser determinado de conformidad con Kabat y las posiciones del residuo identificadas, las cuales difieren de las consenso. Estas diferencias específicas del donador pueden indicar mutaciones somáticas en la secuencia donadora, lo cual mejora la actividad. Los residuso inusuales que se predicen afectan la unión son retenidos, donde los residuos que se predice son no importantes para unión podrían ser sustituidos.

Los candidatos adicionales para sustitución son residuos no de líneas germinales que se origina en una región de armazón aceptora. Por ejemplo, cuando una caden aceptora de anticuerpo (es decir, una cadena humana de anticuerpo que comparte identidad de secuencia significante con la cadena donadora de anticuerpo) es alineada a una cadena de anticuerpo de línea germinal (del mismo modo que comparte significante identidad de secuencia con la cadena donadora), los residuos no se aparean entre el armazón de cadena aceptora y el armazón de cadena de línea germinal, pueden ser sustituidos con residuos correspondientes a partir de la secuencia de línea germinal.

Distinto de las sustituciones específicas de

aminoácido discutido anteriormente, las regiones de armazón de inmunoglobulinas humanizadas son usualmente idénticas, y más usualmente, idénticas a las regiones de armazón de los anticuerpos humanos a partir de los cuales fueron derivados. Por supuesto, muchos de los aminoácidos en la región de armazón hacen pocoa o ninguna contribución directa a la especificidad o afinidad de un anticuerpo. De este modo, muchas sustituciones conservativas de residuos de armazón pueden ser toleradas sin cambio apreciable de la especificidad o afinidad de la inmunoglobulina humanizada resultante. De este modo, en una modalidad la región variable de armazón de la inmunoglobulina humanizada comparte al menos 85% de similitud o identidad de secuencia con una secuencia o consenso de región de armazón variable humana de tales secuencias. En otra modalidad, la región variable de armazón de la inmunoglobulina humanizada comparte al menos 90%, preferiblemente 95%, más preferiblemente 96%, 97%, 98%, o 99%, de similitud o identidad de secuencia con una secuencia o consenso de región de armazón variable humana de tales secuencias. En general, sin embargo, cada una de las sustituciones son indeseables.

Como se usa en la presente, los grados de identidad y similitud pueden ser fácilmente calculados, por ejemplo, como se describe en Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988;

Biocomputing. Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Secuence Data, Part 1, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Secuence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987, Secuence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991, el software BLAST™ disponible de NCBI (Altschul, S.F. et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410; Gish, W. & States, D.J. 1993, Nature Genet. 3:266-272. Madden, T.L. et al., 1996, Meth. Enzymol. 266:131-141; Altschul, S.F. et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; Zhang, J. & Madden, T.L. 1997, Genome Res. 7:649-656, las cuales son incorporadas en la presente por referencia.

Un número de revisiones que discute anticuerpos injertados con CDR han sido publicados, que incluyen Vaughan et al. (Nature Biotechnology, 16, 535-539, 1998), el cual es incorporado por referencia en la presente.

El anticuerpos anti-aP2 de la presente invención pueden incluir dominios de unión adicionales agregados por ejemplo, como por la molécula DVD-Ig como se describe en el documento WO 2007/024715, o el así llamado (FabFv)2Fc descrito en el documento WO2011/030107. De este modo el anticuerpo como se emplea en la presente incluye anticuerpos bi, tri, o tetra-valentes de longitud completa.

Agentes de Unión al Antígeno

Los agentes de unión al antígeno incluyen anticuerpos de cadena única (es decir, una cadena ligera y cadena pesada de longitud completa); Fab, Fab modificado, Fab', Fab' modificado, F(ab')2, Fv, Fab-Fv, Fab-dsFv, anticuerpos de dominio único (por ejemplo, VH o VL o VHH) por ejemplo, como se describe en el documento WO 2001090190, scFv, anticuerpos bi, tri o tetra-valente, Bis-scFv, diacuerpos, tricuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y agentes de unón al antígeno-epítopo de cualquiera de los anteriores (véase por ejemplo Holliger and Hudson, 2005, Nature Biotech. 23(9):1126-1136; Adair and Lawson, 2005, Drug Design Reviews - Online 2(3), 209-217). Los métodos para crear y manufactuar estos fragmentos de anticuerpo son bien conocidos en la técnica (véase por ejemplo Verma et al., 1998, Journal de Immunological Methods, 216, 165-181). El formato Fab-Fv fue descrito primero en el documento WO2009/040562 y las verions de disulfuro estabilizadas del mismo, el Fab-dsFv fue descrito primero en el documento WO2010/035012. Otros fragmentos de anticuerpo para uso en la presente invención incluyen los fragmentos Fab y Fab' descritos en las solicitudes de patente Internacional WO2005/003169, WO2005/003170, y WO2005/003171. Los anticuerpos multi-valentes pueden comrprender especificdades múltiples, por ejemplo, biespecíficos o pueden ser monoespecíficos (véase

por ejemplo WO 92/22583 y WO05/113605). Uno de tal ejemplo del último es un Tri-Fab (o TFM) como se describe en el documento WO92/22583.

Una molécula Fab' típica comprende un par de cadena ligera y pesada en la cual la cadena pesada comprende una región variable VH, un dominio constante CH1 y una región bisagra modificada o natural y la cadena ligera comprende una región variable VL y un dominio constante CL.

En una modalidad, se proporciona un dímero de un Fab' de conformidad con la presente descripción para crear un F(ab')2 por ejemplo, la dimerización puede ser a través de una secuencia bisagra natural descrita en la presente, o derivado de la misma, o una secuencia bisagra sintética.

Un dominio de unión al anticuerpo en general comprende 6 CDRs, tres de una cadena pesada y tres de una cadena ligera. En una modalidad, las CDRs están en un armazón y en conjunto forman una región variable. De este modo en una modalidad, el agente de unión al antígeno incluye un dominio de unión específico para aP2 que comprende una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada.

Se apreciará que una o más (por ejemplo 1, 2, 3 o 4) sustituciones, adiciones y/o supresiones de aminoácido pueden hacerse para las CDRs u otras secuencias (por ejemplo, dominios variables) proporcionados por la presente invención,

como se describe anteriormente o posteriormente, sin alterar significantemente la capacidad del anticuerpo para unirse a aP2. El efecto de algunas sustituciones, adiciones y/o supresiones de aminoácido puede ser probado fácilmente por un experto en la materia, por ejemplo al usar los métodos descritos en la presente, en particular en los ejemplos.

En una modalidad, uno o más (por ejemplo 1, 2, 3 o 4) sustituciones, adiciones y/o supresiones de aminoácido pueden ser elaboradas a las CDRs o región de armazón empleadas en el fragmento de anticuerpo proporcionado por la presente invención de manera que la afinidad de unión a aP2 es retenida, incrementada, o disminuida a una afinidad de aproximadamente $\geq 10^{-7}$ M. En una modalidad, se proporciona un anticuerpo humanizado modificado en donde se han hecho las modificaciones a ya sea las CDRs, regiones de armazón, o ambas, con el fin de incrementar la afinidad de unión, por ejemplo, hasta aproximadamente $\geq 10^{-7}$ M.

Anticuerpos Monoclonales Anti-aP2 de Armazón Aceptora Humana/CDR Donadora de Conejo

En un aspecto de la presente invención se proporciona un anticuerpo monoclonal anti-aP2 humanizado derivado a partir de un anticuerpo monoclonal donador híbrido de armazón de ratón/CDR de conejo anti-aP2, en donde las CDRs a partir del anticuerpo monoclonal de proteína aP2 anti-humana son injertados en regiones de armazón de cadena pesada

y cadena ligera humana.

En una modalidad, la cadena ligera variable Ab 909 VL (Seq. ID No. 445 (Tabla 10, abajo y Figura 27)) es la secuencia de cadena ligera donadora usada para el injerto subsecuente en un armazón humana, en donde las modificaciones de armazón y CDR subsecuentes pueden ser opcionalmente realizadas. En una modalidad, las CDRs proporcionadas para las Seq. ID Nos. 7, 8, y 9 derivadas a partir de la cadena ligera variable proporcionada en la Seq. ID No. 445, son injertadas en el dominio variable de cadena ligera kappa de inmunoglobulina humana de la inmunoglobulina humana IGKVA30-JK4, que resulta en una región variable de cadena ligera humanizada que comprende A30 FR1 (Seq. ID No. 40)-CDRL1 (Seq. ID. No. 7)-A30 FR2 (Seq. ID No. 41)-CDRL2 (Seq. ID No. 8)-A30 FR3 (Seq. ID No. 41)-CDRL3 (Seq. ID. No. 9)-JK4 (Seq. ID No. 148).

En una modalidad, las CDRs proporcionadas en las Seq. ID Nos. 7, 8, y 10 derivadas a partir de la cadena ligera variable proporcionadas en la Seq. ID No. 445, son injertadas en el dominio variable de cadena ligera kappa de inmunoglobulina humana de inmunoglobulina humana IGKVA30-JK4, resultando en una región variable de cadena ligera humanizada que comprende A30 FR1 (Seq. ID No. 40)-CDRL1 (Seq. ID. No. 7)-A30 FR2 (Seq. ID No. 41)-CDRL2 (Seq. ID No. 8)-A30 FR3 (Seq. ID No. 41)-CDRL3 (Seq. ID. No. 10)-JK4 (Seq. ID No.

148), resultando en Ab 909 gL13 (Seq. ID No. 487).

En una modalidad, se proporciona la región variable de cadena ligera kappa humanizada 909 gL1 (Seq. ID No. 446 (Tabla 10, abajo y Figura 27)) en donde los residuos donadores de la región variable de cadena ligera 2V, 3V, 63K, y 70D a partir de Ab 909 VL (Seq. ID No. 445) son usados para sustitutos de aminoácido para los aminoácidos de IGKV30-JK4 2I, 3Q, 63S, 70E, resultando en la cadena ligera kappa humanizada 909 gL1 (Seq. ID No. 446 (Tabla 10, abajo y Figura 27)).

En una modalidad, se proporciona la cadena ligera kappa humanizada 909 gL1 VL+CL (Seq. ID No. 447 (Tabla 10, abajo)), en donde la región variable de cadena ligera kappa humanizada 909 gL1 (Seq. ID No. 446 (Tabla 10, abajo y Figura 27)) comprende además una región constante de cadena ligera kappa humana.

En una modalidad, se proporciona la cadena ligera kappa humanizada 909 gL10 (Seq. ID No. 448 (Tabla 10, abajo y Figura 27)) en donde los residuos donadores de la región variable de cadena ligera 2V, 3V, 63K, y 70D a partir de Ab 909 VL (Seq. ID No. 445) son usados para sustitutos de aminoácido para los aminoácidos IGKV30-JK4 2I, 3Q, 63S, 70E, y se proporciona una sustitución de una alanina en lugar de cisteína en la segunda posición de CDRL3 (CDRL3 variante 1 (Seq. ID No. 10)), resultando en la cadena ligera kappa

humanizada 909 gL10 (Seq. ID No. 448 (Tabla 10, abajo y Figura 27)). Alternativamente, se proporciona una sustitución adicional que comprende C88A en FR3, resultando en Ab 909 gL50 (Seq. ID No. 488).

En una modalidad, se proporciona la cadena ligera kappa humanizada 909 gL10 VL+CL (Seq. ID No. 449 (Tabla 10, abajo)), en donde la región variable de cadena ligera kappa humanizada 909 gL10 (Seq. ID No. 448 (Tabla 10, abajo y Figura 27)) comprende además una región constante de cadena ligera kappa humana. Alternativamente, una sustitución adicional que comprende C88A en FR3 se proporciona, resultando en Ab909 gL50VL + CL (Seq. ID. No. 490).

En una modalidad, se proporciona la cadena ligera kappa humanizada 909 gL54 (Seq. ID No. 450 (Tabla 10, abajo)) en donde los residuos donadores de la región variable de cadena ligera 2V, 3V, 63K, y 70D a partir de Ab 909 VL (Seq. ID No. 445) son usados para sustitutos de aminoácido para los aminoácidos IGKV30-JK4 2I, 3Q, 63S, 70E, y se proporciona una sustitución de na glutamina en lugar de cisteína en la segunda posición de CDRL3 (CDRL3 variante 2 (Seq. ID No. 11)), resultando en la cadena ligera kappa humanizada 909 gL54 (Seq. ID No. 450 (Tabla 10, abajo)).

En una modalidad, se proporciona la cadena ligera kappa humanizada 909 gL54 VL+CL (Seq. ID No. 451 (Tabla 10, abajo)), en donde la región variable de cadena ligera kappa

humanizada 909 gL54 (Seq. ID No. 450 (Tabla 10, abajo)) comprende además una región constante de cadena ligera kappa humana.

En una modalidad, se proporciona la cadena ligera kappa humanizada 909 gL55 (Seq. ID No. 452 (Tabla 10, abajo)) en donde los residuos donadores de la región variable de cadena ligera 2V, 3V, 63K, y 70D a partir de Ab 909 VL (Seq. ID No. 445) son usados para sustitutos de aminoácido para los aminoácidos IGKV30-JK4 2I, 3Q, 63S, 70E, y se proporciona una sustitución de na histidina en lugar de cisteína en la segunda posición de CDRL3 (CDRL3 variante 2 (Seq. ID No. 12)), resultando en la cadena ligera kappa humanizada 909 gL55 (Seq. ID No. 452 (Tabla 10, abajo)).

En una modalidad, se proporciona la cadena ligera kappa humanizada 909 gL55 VL+CL (Seq. ID No. 453 (Tabla 10, abajo)), en donde la región variable de cadena ligera kappa humanizada 909 gL55 (Seq. ID No. 452 (Tabla 10, abajo)) comprende además una región constante de cadena ligera kappa humana.

Tabla 10. Secuencias de Regiones de Cadena Ligera aP2 Humanizadas

Proteína	**Seq. ID No.**	**Secuencia**

Proteína	**Seq. ID No.**	**Secuencia**
Región VL Ab 909 de conejo	445	DVVMTQTPASVSEPVGGTVTIKCQASEDISRYLVWYQQK PGQPPKRLIYKASTLASGVPSRFKGSGSGTDFTLTISDL ECDDAATYYCQCTYGTYAGSFFYSFGGGTEVVVE
región VL 909 gL1	446	DVVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASEDISRYLVWYQQK PGKAPKRLIYKASTLASGVPSRFKGSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQCTYGTYAGSFFYSFGGGTKVEIK
región VL +CL 909 gL1	447	DVVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASEDISRYLVWYQQK PGKAPKRLIYKASTLASGVPSRFKGSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQCTYGTYAGSFFYSFGGGTKVEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
región VL 909 gL	448	DVVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASEDISRYLVWYQQK PGKAPKRLIYKASTLASGVPSRFKGSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQATYGTYAGSFFYSFGGGTKVEIK
región VL + CL 909 gL10	449	DVVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASEDISRYLVWYQQK PGKAPKRLIYKASTLASGVPSRFKGSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQATYGTYAGSFFYSFGGGTKVEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
región VL 909 gL54	450	DVVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASEDISRYLVWYQQK PGKAPKRLIYKASTLASGVPSRFKGSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQQTYGTYAGSFFYSFGGGTKVEIK
región VL + CL 909 gL54	451	DVVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASEDISRYLVWYQQK PGKAPKRLIYKASTLASGVPSRFKGSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQQTYGTYAGSFFYSFGGGTKVEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Proteína	**Seq. ID No.**	**Secuencia**
región VL 909 gL55	452	DVVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASEDISRYLVWYQQK PGKAPKRLIYKASTLASGVPSRFKGSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQHTYGTYAGSFFYSFGGGTKVEIK
región VL + CL 909 gL55	453	DVVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASEDISRYLVWYQQK PGKAPKRLIYKASTLASGVPSRFKGSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQHTYGTYAGSFFYSFGGGTKVEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
región VL gL13 909	487	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASEDISRYLVWYQQK PGKAPKRLIYKASTLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSL QPEDFATYYCQATYGTYAGSFFYSFGGGTKVEIK
región VL + CL 909 gL	489	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASEDISRYLVWYQQK PGKAPKRLIYKASTLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSL QPEDFATYYCQATYGTYAGSFFYSFGGGTKVEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
región VL 909 gL50	488	DVVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASEDISRYLVWYQQK PGKAPKRLIYKASTLASGVPSRFKGSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYAQATYGTYAGSFFYSFGGGTKVEIK
región VL + CL 909 gL50	490	DVVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASEDISRYLVWYQQK PGKAPKRLIYKASTLASGVPSRFKGSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYAQATYGTYAGSFFYSFGGGTKVEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Por ejemplo, la cadena pesada variable Ab 909 VH (Seq. ID No. 454 (Tabla 11, abajo y Figura 28)) es la

secuencia de cadena pesada donadora usada para el injerto subsecuente en un armazón humana, en donde las modificaciones de armazón y CDR subsecuentes pueden ser opcionalmente realizadas. En una modalidad, las CDRs pesadas variables proporcionadas en las Seq. ID. Nos. 14, 16, y 19 derivadas a partir de la cadena pesada variable proporcionada en la Seq. ID No. 454, son injertadas en el dominio variable de cadena pesada humana de inmunoglobulina de inmunoglobulina humana IGHV4-04-JH4 (Seq. ID No. 481 (Figura 28)), resultando en una región variable de cadena pesada humanizada que comprende 4-04 FR1 (Seq. ID No. 357)-CDRH1 (Seq. ID No. 14)-4-04 FR2 (Seq. ID No. 358)-CDRH2 (Seq. ID No. 16)-4-04 FR3 (Seq. ID No. 359)-CDRH3 (Seq. ID No. 19)-JH4 (Seq. ID No. 405).

En una modalidad, se proporciona la región variable de cadena pesada humanizada de región variable 909 gH1 (Seq. ID No. 455 (Tabla 11, abajo y Figura 28)) en donde los residuos donadores de cadena pesada de región variable 23T, 67F, 71K, 72A, 73S, 74T, 77T, 78V, 79D, 89T, 91F a partir de Ab 909 VH (Seq. ID No. 454) son usados para sustitutos de aminoácido para los aminoácidos IGHV4-04-JK4 23A, 67V, 71V, 72D, 73K, 74S, 77Q, 78F, 79S, 89V, 91Y, y 1E es sustituido para el aminoácido IGHV4-04-JK4 1Q, y se mantiene un hueco de aminoácido de dos residuos de aminoácido en el armazón 3, en el bucle entre las hebras de lámina beta D y E en los aminoácidos 75 y 76, resultando en la cadena pesada

humanizada 909 gH1 (Seq. ID No. 455 (Tabla 11, abajo y Figura 28)).

En una modalidad, se proporciona la cadena pesada IgG4 humanizada 909 gH1 VH + constante IgG4P (Seq. ID No. 456 (Tabla 11, abajo)), en donde la región variable de cadena pesada humanizada 909 gH1 (Seq. ID No. 455 (Tabla 11, abajo y Figura 28)) comprende además una región constante IgG4P humana. IgG4P como se emplea en la presente es una mutación del isotipo IgG4 de tipo silvestre donde el aminoácido 241 es reemplazado por prolina véase por ejemplo donde serina en la posición 241 ha sido cambiada a prolina como se describe en Angal et al., Molecular Immunology, 1993, 30 (1), 105-108.

En una modalidad, se proporciona la región variable de cadena pesada humanizada de región variable 909 gH14 (Seq. ID No. 457 (Tabla 11, abajo y Figura 28)) en donde los residuos donadores de cadena pesada de región variable 67F, 71K, 72A, 73S, 74T, 77T, 78V, 79D, 89T, 91F a partir de Ab 909 VH (Seq. ID No. 454) son usados para sustitutos de aminoácido para los aminoácidos IGHV4-04-JK4 67V, 71V, 72D, 73K, 74S, 77Q, 78F, 79S, 89V, 91Y, y 1E es sustituido para el aminoácido IGHV4-04-JK4 1Q, resultando en la cadena pesada humanizada 909 gH14 (Seq. ID No. 457 (Tabla 11, abajo y Figura 28)).

En una modalidad, se proporciona la cadena pesada IgG4 humanizada 909 gH14 VH + Constante IgG4P (Seq. ID No.

458 (Tabla 11, abajo)), en donde la región variable de cadena pesada humanizada 909 gH14 (Seq. ID No. 457 (Tabla 11, abajo y Figura 28)) comprende además una región constante IgG4P humana. IgG4P como se emplea en la presente es una mutación del isotipo IgG4 de tipo silvestre donde el aminoácido 241 es reemplazado por prolina véase por ejemplo donde serina en la posición 241 ha sido cambiada a prolina como se describe en Angal et al., Molecular Immunology, 1993, 30 (1), 105-108.

En una modalidad, se proporciona la región variable de cadena pesada humanizada de región variable 909 gH15 (Seq. ID No. 459 (Tabla 11, abajo y Figura 28)) en donde los residuos donadores de cadena pesada de región variable 23T, 67F, 71K, 72A, 73S, 74T, 77T, 78V, 79D, 89T, 91F a partir de VH Ab 909 de Conejo (Seq. ID No. 454) son usados para sustitutos de aminoácido para los aminoácidos IGHV4-04-JK4 23A, 67V, 71V, 72D, 73K, 74S, 77Q, 78F, 79S, 89V, 91Y, y 1E es sustituido para el aminoácido IGHV4-04-JK4 1Q, y existe una sustitución de una serina en lugar de cisteína en la décima posición de CDRH2 (CDRH2 variante 1 (Seq. ID No. 17)) y una sustitución de un ácido glutámico en lugar de ácido aspártico en la cuarta posición de CDRH3 (CDRH3 variante 1 (Seq. ID No. 20), resultando en la región de cadena pesada humanizada 909 gH15 VH (Seq. ID No. 459 (Tabla 11, abajo y Figura 28)).

En una modalidad, se proporciona la cadena pesada

IgG4 humanizada 909 gH15 VH + Constante IgG4P (Seq. ID No. 460 (Tabla 11, abajo)), en donde la región variable de cadena pesada humanizada 909 gH15 VH (Seq. ID No. 459 (Tabla 11, abajo y Figura 28)) comprende además una región constante IgG4P humana. IgG4P como se emplea en la presente es una mutación del isotipo IgG4 de tipo silvestre donde el aminoácido 241 es reemplazado por prolina véase por ejemplo donde serina en la posición 241 ha sido cambiada a prolina como se describe en Angal et al., Molecular Immunology, 1993, 30 (1), 105-108.

En una modalidad, se proporciona la región variable de cadena pesada humanizada de región variable 909 gH61 (Seq. ID No. 461 (Tabla 11, abajo y Figura 28)) en donde los residuos donadores de cadena pesada de región variable 71K, 73S, 78V a partir de VH Ab 909 de Conejo (Seq. ID No. 454) son usados para sustitutos de aminoácido para los aminoácidos IGHV4-04-JK4 71V, 73K, 78F, y 1E es sustituido para el aminoácido IGHV4-04-JK4 1Q, resultando en la región de cadena pesada humanizada 909 gH61 VH (Seq. ID No. 461 (Tabla 11, abajo y Figura 28)).

En una modalidad, la cadena pesada IgG4 humanizada 909 gH61 VH + Constante IgG4P (Seq. ID No. 462 (Tabla 11, abajo)) se proporciona, en donde la región variable de cadena pesada humanizada 909 gH61 VH (Seq. ID No. 461 (Tabla 11, abajo y Figura 28)) comprende además una región constante

IgG4P humana. IgG4P como se emplea en la presente es una mutación del isotipo IgG4 de tipo silvestre donde el aminoácido 241 es reemplazado por prolina véase por ejemplo donde serina en la posición 241 ha sido cambiada a prolina como se describe en Angal et al., Molecular Immunology, 1993, 30 (1), 105-108.

En una modalidad, se proporciona la región variable de cadena pesada humanizada de región variable 909 gH62 (Seq. ID No. 463 (Tabla 11, abajo y Figura 28)) en donde los residuos donadores de cadena pesada de región variable 71K, 73S, 78V a partir de VH Ab 909 de Conejo (Seq. ID No. 454) son usados para sustitutos de aminoácido para los aminoácidos IGHV4-04-JK4 71V, 73K, 78F, y 1E es sustituido para el aminoácido IGHV4-04-JK4 1Q, y existe una sustitución de una serina en lugar de cisteína en la décima posición de CDRH2 (CDRH2 variante 1 (Seq. ID No. 17)) y una sustitución de un ácido glutámico en lugar de ácido aspártico en la cuarta posición de CDRH3 (CDRH3 variante 1 (Seq. ID No. 20), resultando en la región de cadena pesada humanizada 909 gH62 VH (Seq. ID No. 463 (Tabla 11, abajo y Figura 28)).

En una modalidad, se proporciona la cadena pesada IgG4 humanizada 909 gH62 VH + Constante IgG4P (Seq. ID No. 464 (Tabla 11, abajo)), en donde la región variable de cadena pesada humanizada 909 gH62 VH (Seq. ID No. 463 (Tabla 11, abajo y Figura 28)) comprende además una región constante

IgG4P humana. IgG4P como se emplea en la presente es una mutación del isotipo IgG4 de tipo silvestre donde el aminoácido 241 es reemplazado por prolina véase por ejemplo donde serina en la posición 241 ha sido cambiada a prolina como se describe en Angal et al., Molecular Immunology, 1993, 30 (1), 105-108.

Tabla 11. Secuencias de Regiones de Cadena Pesada aP2 Humanizada

Proteína	**Seq. ID No.**	**Secuencia**
Región VH Ab 909 de Conejo	454	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSLSTYYMSWVRQA PGKGLEWIGIIYPSGSTYCASWAKGRFTISKASTTVDLK ITSPTTEDTATYFCARPDNDGTSGYLSGFGLWGQGTLVT VSS
Región VH 909gH1	455	EVQLQESGPGLVKPSGTLSLTCTVSGFSLSTYYMSWVRQ PPGKGLEWIGIIYPSGSTYCASWAKGRFTISKASTTVDL KLSSVTAADTATYFCARPDNDGTSGYLSGFGLWGQGTLV TVSS
909gH1 IgG4 VH + constante γ-4P humana	456	EVQLQESGPGLVKPSGTLSLTCTVSGFSLSTYYMSWVRQ PPGKGLEWIGIIYPSGSTYCASWAKGRFTISKASTTVDL KLSSVTAADTATYFCARPDNDGTSGYLSGFGLWGQGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPE FLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ

Proteína	**Seq. ID No.**	**Secuencia**
		DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM HEALHNHYTQK SLSLSLGK
región VH 909gH14	457	EVQLQESGPG LVKPSGTLSLTCAVSGFSLSTYYMSWVRQP PGKGLEWIGIIYPSGSTYCASWAKGRFTISKASTKNTVD LKLSSVTAADTATYFCARPDNDGTSGYLSGFGLWGQGTL VTVSS
909gH14 IgG4 VH + constante γ-4P humana	458	EVQLQESGPGLVKPSGTLSLTCAVSGFSLSTYYMSWVRQ PPGKGLEWIGIIYPSGSTYCASWAKGRFTISKASTKNTV DLKLSSVTAADTATYFCARPDNDGTSGYLSGFGLWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPA PEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
región VH 909 gH15	459	EVQLQESGPGLVKPSGTLSLTCTVSGFSLSTYYMSWVRQ PPGKGLEWIGIIYPSGSTYSASWAKGRFTISKASTKNTV DLKLSSVTAADTATYFCARPDNEGTSGYLSGFGLWGQGT LVTVSS

Proteína	**Seq. ID No.**	**Secuencia**
909gH15 IgG4 VH + constante γ-4P humana	460	EVQLQESGPGLVKPSGTLSLTCTVSGFSLSTYYMSWVRQ PPGKGLEWIGIIYPSGSTYSASWAKGRFTISKASTKNTV DLKLSSVTAADTATYFCARPDNEGTSGYLSGFGLWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPA PEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
región VH 909 gH61	461	EVQLQESGPGLVKPSGTLSLTCAVSGFSLSTYYMSWVRQ PPGKGLEWIGIIYPSGSTYCASWAKGRVTISKDSSKNQV SLKLSSVTAADTAVYYCARPDNDGTSGYLSGFGLWGQGT LVTVSS
909gH61 IgG4 VH + constante γ-4P humana	462	EVQLQESGPGLVKPSGTLSLTCAVSGFSLSTYYMSWVRQ PPGKGLEWIGIIYPSGSTYCASWAKGRVTISKDSSKNQV SLKLSSVTAADTAVYYCARPDNDGTSGYLSGFGLWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPA PEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
región VH	463	EVQLQESGPGLVKPSGTLSLTCAVSGFSLSTYYMSWVRQ

Proteína	**Seq. ID No.**	**Secuencia**
909 gH62		PPGKGLEWIGIIYPSGSTYSASWAKGRVTISKDSSKNQV SLKLSSVTAADTAVYYCARPDNEGTSGYLSGFGLWGQGT LVTVSS
909gH62 IgG4 VH + constante γ-4P humana	464	EVQLQESGPGLVKPSGTLSLTCAVSGFSLSTYYMSWVRQ PPGKGLEWIGIIYPSGSTYSASWAKGRVTISKDSSKNQV SLKLSSVTAADTAVYYCARPDNEGTSGYLSGFGLWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPA PEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

En una modalidad la descripción proporciona una secuencia de anticuerpo la cual es 80% similar o idéntica a una secuencia descrita en la presente, por ejemplo 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% 96%, 97%, 98% o 99% sobre parte o toda la secuencia relevante, por ejemplo una secuencia de dominio variable, una secuencia CDR o una secuencia de dominio variable excluyendo las CDRs. En una modalidad la secuencia relevante se selecciona a partir de las Seq. ID Nos. 446, 447, 448, 487, 488, 489, 490, 449, 450, 451, 452, 453, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, o 464. En una modalidad la descripción proporciona una secuencia de

anticuerpo la cual tiene una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, o 4) sutituciones, adiciones, o supresiones de aminoácido en la secuencia relevante, por ejemplo una secuencia de dominio variable, una secuencia CDR o una secuencia de dominio variable excluyendo las CDRs seleccionadas a partir de las Seq. ID Nos. 446, 447, 448, 487, 488, 489, 490, 449, 450, 451, 452, 453, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, o 464.

En una modalidad, la presente invención proporciona una molécula de anticuerpo la cual se une a aP2 humana que comprende una cadena ligera, en donde el dominio variable de la cadena ligera comprende una secuencia que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% 96%, 97%, 98% o 99% de identidad o similitud con una secuencia seleccionada a partir de las Seq. ID Nos. 446, 448, 487, 488,450, o 452. En una modalidad, la presente invención proporciona una molécula de anticuerpo la cual se une a aP2 humana que comprende una cadena ligera, en donde el dominio variable de la cadena ligera comprende una secuencia que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, o 4) sutituciones, adiciones, o supresiones de aminoácido en su secuencia comparada con las Seq. ID Nos. 446, 448, 487, 488,450, o 452.

En una modalidad la presente invención proporciona una molécula de anticuerpo la cual se une a aP2 humana en donde el anticuerpo tiene un dominio variable de cadena

pesada el cual es al menos 80% 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% 96%, 97%, 98% o 99% similar o idéntico con una secuencia seleccionada a partir de las Seq. ID Nos. 455, 457, 459, 461 o 463. En una modalidad la presente invención proporciona una molécula de anticuerpo la cual se une a aP2 humana en donde el anticuerpo tiene un dominio variable de cadena pesada el cual tiene una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, o 4) sutituciones, adiciones, o supresiones de aminoácido en su secuencia comparada con las Seq. ID Nos. 455, 467, 459, 461 o 463.

Una región de armazón adecuada para la cadena ligera del anticuerpo humanizado de la presente invención se deriva a partir del sub-grupo de línea germinal humana IgKV1-17 (A30) (Seq. ID Nos. 40-42) junto con JK4 (Seq. ID No. 148). Por consiguiente, en un ejemplo se proporciona un anticuerpo humanizado que comprende la secuencia proporcionada en la Seq. ID No. 7 para CDR-L1, la secuencia proporcionada en la Seq. ID No. 8 para CDR-L2 y la secuencia seleccionada a partir de las Seq. ID Nos. 9, 10, 11, o 12 para CDRL3, en donde la cadena ligera región de armazón se deriva a partir del subgrupo humano IGKV1-17 (A30) (Seq. ID Nos. 40-42) junto con JK4 (Seq. ID No. 148). La secuencia JK4 es como sigue: FGGGTKVEIK (Seq. ID No. 148). En un ejemplo el dominio variable de cadena ligera del anticuerpo comprende la secuencia seleccionada a partir de las Seq. ID Nos. 446, 448,

487, 488, 450, y 452.

Una región de armazón adecuada para la región variable de cadena pesada del anticuerpo humanizado de la presente invención se deriva a partir del sub-grupo de línea germinal humana IGHV 4-04 (Seq. ID Nos. 357, 358, y 359) junto con JH4 (Seq. ID No. 405). Por consiguiente, en un ejemplo se proporciona un anticuerpo humanizado que comprende la secuencia proporcionada en la Seq. ID No. 14 para CDR-H1, una secuencia seleccionada a partir de las Seq. ID. Nos. 16 o 17 para CDR-H2 y la secuencia seleccionada a partir de las Seq. ID Nos. 19 o 20 para CDR-H3, en donde la cadena pesada región de armazón se deriva a partir del subgrupo humano IGHV 4-04 (Seq. ID Nos. 357, 358, y 359) junto con JH4 (Seq. ID No. 405). La secuencia JH4 es como sigue: WGQGTLVTVSS (Seq. ID No. 405).

En una modalidad la molécula de anticuerpo de la presente descripción es un fragmento de anticuerpo Fab, Fab', o F(ab')2 que comprende una región variable de cadena ligera seleccionada a partir de las Seq. ID Nos. 446, 448, 487, 488, 450, o 452, y una región variable de cadena pesada seleccionada a partir de las Seq. ID Nos. 455, 457, 459, 461, o 463. En una modalidad la molécula de anticuerpo de la presente descripción es un fragmento de anticuerpo Fab, Fab', o F(ab')2 que comprende una región variable de cadena ligera proporcionada en la Seq. ID No. 446, y una región variable de

cadena pesada proporcionada en la Seq. ID No. 455. En una modalidad la molécula de anticuerpo de la presente descripción es un fragmento de anticuerpo Fab, Fab', o F(ab')2 que comprende una región variable de cadena ligera proporcionada en la Seq. ID No. 448, y una región variable de cadena pesada proporcionada en la Seq. ID No. 455. En una modalidad la molécula de anticuerpo de la presente descripción es un fragmento de anticuerpo Fab, Fab', o F(ab')2 que comprende una región variable de cadena ligera proporcionada en la Seq. ID No. 450, y una región variable de cadena pesada proporcionada en la Seq. ID No. 455. En una modalidad la molécula de anticuerpo de la presente descripción es un fragmento de anticuerpo Fab, Fab', o F(ab')2 que comprende una región variable de cadena ligera proporcionada en la Seq. ID No. 452, y una región variable de cadena pesada proporcionada en la Seq. ID No. 455. En una modalidad la molécula de anticuerpo de la presente descripción es un fragmento de anticuerpo Fab, Fab', o F(ab')2 que comprende una región variable de cadena ligera proporcionada en la Seq. ID No. 487, y una región variable de cadena pesada proporcionada en la Seq. ID No. 455. En una modalidad la molécula de anticuerpo de la presente descripción es un fragmento de anticuerpo Fab, Fab', o F(ab')2 que comprende una región variable de cadena ligera proporcionada en la Seq. ID No. 488, y una región variable de

cadena pesada proporcionada en la Seq. ID No. 455. En una modalidad, la molécula de anticuerpo de la presente descripción es un fragmento de anticuerpo Fab, Fab', o F(ab')2 que comprende una región variable de cadena ligera proporcionada en la Seq. ID No. 446 y una región variable de cadena pesada proporcionada en la Seq. ID No. 459. En una modalidad la molécula de anticuerpo de la presente descripción es un fragmento de anticuerpo Fab, Fab', o F(ab')2 que comprende una región variable de cadena ligera proporcionada en la Seq. ID No. 448, y una región variable de cadena pesada proporcionada en la Seq. ID No. 459. En una modalidad, la molécula de anticuerpo de la presente descripción es un fragmento de anticuerpo Fab, Fab', o F(ab')2 que comprende una región variable de cadena ligera proporcionada en la Seq. ID No. 450 y una región variable de cadena pesada proporcionada en la Seq. ID No. 459. En una modalidad, la molécula de anticuerpo de la presente descripción es un fragmento de anticuerpo Fab, Fab', o F(ab')2 que comprende una región variable de cadena ligera proporcionada en la Seq. ID No. 452 y una región variable de cadena pesada proporcionada en la Seq. ID No. 459. En una modalidad, la molécula de anticuerpo de la presente descripción es un fragmento de anticuerpo Fab, Fab', o F(ab')2 que comprende una región variable de cadena ligera proporcionada en la Seq. ID No. 487 y una región variable de

cadena pesada proporcionada en la Seq. ID No. 459. En una modalidad, la molécula de anticuerpo de la presente descripción es un fragmento de anticuerpo Fab, Fab', o F(ab')2 que comprende una región variable de cadena ligera proporcionada en la Seq. ID No. 488 y una región variable de cadena pesada proporcionada en la Seq. ID No. 459. En una modalidad, la molécula de anticuerpo de la presente descripción es un fragmento de anticuerpo Fab, Fab', o F(ab')2 que comprende una región variable de cadena ligera proporcionada en la Seq. ID No. 446 y una región variable de cadena pesada proporcionada en la Seq. ID No. 457. En una modalidad la molécula de anticuerpo de la presente descripción es un fragmento de anticuerpo Fab, Fab', o F(ab')2 que comprende una región variable de cadena ligera proporcionada en la Seq. ID No. 448, y una región variable de cadena pesada proporcionada en la Seq. ID No. 457. En una modalidad, la molécula de anticuerpo de la presente descripción es un fragmento de anticuerpo Fab, Fab', o F(ab')2 que comprende una región variable de cadena ligera proporcionada en la Seq. ID No. 450 y una región variable de cadena pesada proporcionada en la Seq. ID No. 457. En una modalidad, la molécula de anticuerpo de la presente descripción es un fragmento de anticuerpo Fab, Fab', o F(ab')2 que comprende una región variable de cadena ligera proporcionada en la Seq. ID No. 452 y una región variable de

cadena pesada proporcionada en la Seq. ID No. 457. En una modalidad, la molécula de anticuerpo de la presente descripción es un fragmento de anticuerpo Fab, Fab', o F(ab')2 que comprende una región variable de cadena ligera proporcionada en la Seq. ID No. 487 y una región variable de cadena pesada proporcionada en la Seq. ID No. 457. En una modalidad, la molécula de anticuerpo de la presente descripción es un fragmento de anticuerpo Fab, Fab', o F(ab')2 que comprende una región variable de cadena ligera proporcionada en la Seq. ID No. 488 y una región variable de cadena pesada proporcionada en la Seq. ID No. 457. En una modalidad, la molécula de anticuerpo de la presente descripción es un fragmento de anticuerpo Fab, Fab', o F(ab')2 que comprende una región variable de cadena ligera proporcionada en la Seq. ID No. 446 y una región variable de cadena pesada proporcionada en la Seq. ID No. 461. En una modalidad la molécula de anticuerpo de la presente descripción es un fragmento de anticuerpo Fab, Fab', o F(ab')2 que comprende una región variable de cadena ligera proporcionada en la Seq. ID No. 448, y una región variable de cadena pesada proporcionada en la Seq. ID No. 461. En una modalidad, la molécula de anticuerpo de la presente descripción es un fragmento de anticuerpo Fab, Fab', o F(ab')2 que comprende una región variable de cadena ligera proporcionada en la Seq. ID No. 450 y una región variable de

cadena pesada proporcionada en la Seq. ID No. 461. En una modalidad, la molécula de anticuerpo de la presente descripción es un fragmento de anticuerpo Fab, Fab', o F(ab')2 que comprende una región variable de cadena ligera proporcionada en la Seq. ID No. 452 y una región variable de cadena pesada proporcionada en la Seq. ID No. 461. En una modalidad, la molécula de anticuerpo de la presente descripción es un fragmento de anticuerpo Fab, Fab', o F(ab')2 que comprende una región variable de cadena ligera proporcionada en la Seq. ID No. 487 y una región variable de cadena pesada proporcionada en la Seq. ID No. 461. En una modalidad, la molécula de anticuerpo de la presente descripción es un fragmento de anticuerpo Fab, Fab', o F(ab')2 que comprende una región variable de cadena ligera proporcionada en la Seq. ID No. 488 y una región variable de cadena pesada proporcionada en la Seq. ID No. 461. En una modalidad, la molécula de anticuerpo de la presente descripción es un fragmento de anticuerpo Fab, Fab', o F(ab')2 que comprende una región variable de cadena ligera proporcionada en la Seq. ID No. 446 y una región variable de cadena pesada proporcionada en la Seq. ID No. 463. En una modalidad la molécula de anticuerpo de la presente descripción es un fragmento de anticuerpo Fab, Fab', o F(ab')2 que comprende una región variable de cadena ligera proporcionada en la Seq. ID No. 448, y una región variable de

cadena pesada proporcionada en la Seq. ID No. 463. En una modalidad, la molécula de anticuerpo de la presente descripción es un fragmento de anticuerpo Fab, Fab', o F(ab')2 que comprende una región variable de cadena ligera proporcionada en la Seq. ID No. 450 y una región variable de cadena pesada proporcionada en la Seq. ID No. 463. En una modalidad, la molécula de anticuerpo de la presente descripción es un fragmento de anticuerpo Fab, Fab', o F(ab')2 que comprende una región variable de cadena ligera proporcionada en la Seq. ID No. 452 y una región variable de cadena pesada proporcionada en la Seq. ID No. 463. En una modalidad, la molécula de anticuerpo de la presente descripción es un fragmento de anticuerpo Fab, Fab', o F(ab')2 que comprende una región variable de cadena ligera proporcionada en la Seq. ID No. 487 y una región variable de cadena pesada proporcionada en la Seq. ID No. 463. En una modalidad, la molécula de anticuerpo de la presente descripción es un fragmento de anticuerpo Fab, Fab', o F(ab')2 que comprende una región variable de cadena ligera proporcionada en la Seq. ID No. 488 y una región variable de cadena pesada proporcionada en la Seq. ID No. 463.

En una modalidad la molécula de anticuerpo de la presente descripción is a full length IgG1 anticuerpo que comprende las regiones variables shown in Seq. ID Nos. 446, 448, 487, 488, 450, o 452 para la cadena ligera y Seq. ID

Nos. 455, 457, 459, 461, o 463 para la cadena pesada.

En una modalidad la molécula de anticuerpo de la presente descripción es un anticuerpo IgG4 de longitud completa que comprende las regiones variables mostradas en las Seq. ID Nos. 446, 448, 487, 488, 450, o 452 para la cadena ligera y Seq. ID Nos. 455, 457, 459, 461, o 463 para la cadena pesada.

En una modalidad la molécula de anticuerpo de la presente descripción es un anticuerpo IgG4p de longitud completa que comprende las regiones variables mostradas en las Seq. ID Nos. 446, 448, 487, 488, 450, o 452 para la cadena ligera y Seq. ID Nos. 455, 457, 459, 461, o 463 para la cadena pesada. En una modalidad la molécula de anticuerpo tiene una cadena ligera que comprende una secuencia seleccionada a partir de las Seq. ID. Nos. 447, 449, 489, 490, 451, o 453 para la cadena ligera y a secuencia seleccionada a partir de las Seq. ID Nos. 456, 458, 460, 462, o 464 para la cadena pesada. En una modalidad el anticuerpo de conformidad con la presente descripción se proporciona como proteína de fusión de anticuerpo de unión a aP2 la cual comprende una porción de inmunoglobulina, por ejemplo un fragmento Fab o Fab', y uno o dos anticuerpos de dominio único (dAb) ligados directamente o indirectamente a estos, por ejemplo, como se describe en los documentos WO2009/040562, WO2010035012, WO2011/030107, WO2011/061492 y

WO2011/086091 todos incorporados en la presente por referencia.

En una modalidad la proteína de fusión comprende dos dominios de anticuerpo, por ejemplo como un apareamiento ligero variable (VL) y pesado variable (VH), opcionalmente ligado por un enlace disulfuro.

El fragmento de anticuerpo de la presente invención incluye Fab, Fab', F(ab')2, scFv, diacuerpo, scFAb, dFv, anticuerpos de cadena ligera de dominio único, dsFv, un péptido que comprende CDR, y similares.

Un Fab es un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente 50,000 y actividad de unión al antígeno, en el cual aproximadamente una mitad del lado N-terminal de la cadena y la caden L completa, entre los fragmentos obtenidos por tratamiento de IgG con una proteasa, papaína (corte en un residuo de aminoácido en la posición 224 de la cadena H), están unidos en conjunto a través de un enlace disulfuro.

El Fab de la presente invención se puede obtener por tratamiento de un anticuerpo injertado con CDR humana de la presente invención, el cual específicamente reacciona con aP2, con una proteasa, papaína. También, el Fab puede ser producido insertando ADN que codifica el Fab del anticuerpo en un vector de expresión para procariota o un vector de expresión para eucariota, e introducir el vector en un

procariota o eucariota para expresar el Fab.

Un F(ab')2 es un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente 100,000 y actividad de unión al antígeno, la cual es ligeramente mayor que el Fab unido mediante un enlace disulfuro de la región bisagra, entre fragmentos obtenidos por tratamiento de IgG con una proteasa, peptina.

El F(ab')2 de la presente invención se puede obtener por tratamiento de un anticuerpo injertado con CDR humana, el cual reacciona específicamente con aP2, con una proteasa, pepsina. También, el F(ab')2 puede ser producido mediante unión de Fab' descrita posteriormente mediante un enlace tioéter o un enlace disulfuro.

Un Fab' es un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente 50,000 y actividad de unión al antígeno, la cual se obtiene cortando un enlace disulfuro de la región bisagra del F(ab')2.

El Fab' de la presente invención se puede obtener por tratamiento del F(ab')2 el cual reacciona específicamente con aP2, con un agente reductor, ditiotreitol. También, el Fab' de la presente invención puede ser producido insertando ADN que codifica un Fab' de un anticuerpo injertado con CDR humana de la presente invención el cual reacciona específicamente con aP2 en un vector de expresión para para procariota o un vector de expresión para eucariota, e

introducir el vector en un procariota o eucariota para expresar el Fab'.

Un scFv es un polipéptido VH-P-VL o VL-P-VH en el cual una cadena VH y una cadena VL están ligadas usando un enlazador peptídico apropiado (P) de 12 o más residuos y el cual tiene una actividad de unión al antígeno.

El scFv de la presente invención puede ser producido obteniendo cADNs que codifican VH y VL de un anticuerpo injertado a CDR humana el cual reacciona específicamente con aP2 de la presente invención, construyendo ADN que codifica a scFv, insertando el ADN en un vector de expresión para procariota o un vector de expresión para eucariota, y después introducir el vector de expresión en un procariota o eucariota para expresar el scFv.

Un diacuerpo es an fragmento de anticuerpo en el cual las scFv que tienen la misma o diferente especificidad de unión al antígeno forman un dímero, y tiene una actividad divalente de unión al antígeno al mismo antígeno o dos actividades de unión al antígeno específicas para antígenos diferentes.

El diacuerpo de la presente invención, por ejemplo, un diacuerpo divalente el cual reacciona específicamente con aP2, puede ser producido obteniendo cADNs que codifican VH y VL de un anticuerpo el cual reacciona específicamente con aP2, construyendo ADN que codifica scFv que tiene un

enlazador de polipéptido de 3 hasta 10 residuos, insertar el ADN en un vector de expresión para procariota o un vector de expresión para eucariota, y después introducir el vector de expresión en un procariota o eucariota para expresar el diacuerpo.

Se obtiene un dsFv por unión de polipéptidos en los cuales un residuo de aminoácido de cada una de la VH y VL es sustituido con un residuo de cisteína mediante un enlace disulfuro entre los residuos de cisteína. El residuo de aminoácido, el cual es sustituido con un residuo de cisteína, puede ser seleccionado con base en una estimación de estructura tri-dimensional del anticuerpo de conformidad con el método mostrado por Reiter et al. (Protein Engineering, 7, 697 (1994)).

El dsFv de la presente invención puede ser producido obteniendo cADNs que codifican la VH y VL de un anticuerpo injertado a CDR humana el cual reacciona específicamente con aP2 de la presente invención, construyendo ADN que codifica dsFv, insertando el ADN en un vector de expresión para procariota o un vector de expresión para eucariota, y después introducir el vector de expresión en un procariota o eucariota para expresar el dsFv.

Un péptido que comprende CDR es constituido para incluir al menos CDRs de una región de cadena H y cadena L. Las CDRs plurales se pueden unir directamente o mediante un

enlazador peptídico apropiado.

El péptido que comprende CDR de la presente invención puede ser producido obteniendo cADN que codifica CDR de VH y VL de un anticuerpo injertado a CDR humana el cual reacciona específicamente con aP2, construyendo ADN que codifica CDR, insertando el ADN en un vector de expresión para procariota o un vector de expresión para eucariota, y después introduciendo el vector de expresión en un procariota o eucariota para expresar el péptido. También, el péptido que comprende CDR también puede ser producido por un método de síntesis química tal como un método Fmoc (método de fluorenilmetoxicarbonilo), un método tBoc (método de t-butiloxicarbonilo), o similares.

El anticuerpo de la presente invención incluye derivados de anticuerpo en los cuales un radioisótopo, una proteína, un agente o similar, es químicamente o genéticamente conjugado al anticuerpo de la presente invención.

Los derivados de anticuerpo de la presente invención pueden ser producidos conjugando químicamente un radioisótopo, una proteína o un agente al lado N-terminal o lado C-terminal de una cadena H o una cadena L de an anticuerpo o fragmento de anticuerpo el cual reacciona específicamente con aP2, a un grupo sustituyente apropiado o cadena lateral del anticuerpo o fragmento de anticuerpo o a

una cadena de azúcar en el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (Antibody Engineering Handbook, editado por Osamu Kanemitsu, publicado por Chijin Shokan (1994)).

También, puede ser producido genéticamente enlazando un ADN que codifica el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de la presente invención el cual reacciona específicamente con aP2 con otro DNA que codifica una proteína que será unida, insertando el ADN en un vector de expresión, e introduciendo el vector de expresión en una célula hospedera.

El radioisótopo incluye 131I, 125I y similares, y puede ser conjugado con el anticuerpo mediante, por ejemplo, un método T de cloramina.

El agente es preferiblemente un compuesto de bajo peso molecular. Ejemplos incluyen agentes anticancerígenos tales como agentes de alquilación (por ejemplo, mostaza de nitrógeno, ciclofosfamida), antagonistas metabólicos (por ejemplo, 5-fluorouracilo, metotrexato), antibióticos (por ejemplo, daunomicina, bleomicina, mitomicina C, daunorubicina, doxorubicina), alcaloides vegetales (por ejemplo, vincristina, vinblastina, vindesina), fármacos hormonales (por ejemplo, tamoxifeno, dexametasona), y similares (Clinical Oncology, editado por Japanese Society de Clinical Oncology, publicado por Cancer and Chemotherapy (1996)); agentes anti-inflamatorios tales como agentes

esteroides (por ejemplo, hidrocortisona, prednisona), fármacos no esteroideos (por ejemplo, aspirina, indometacina), inmunomoduladores (por ejemplo, aurotiomalato, penicilamina), agentes inmunosupresores (por ejemplo, ciclofosfamida, azatioprina) y agentes antihistamínicos (por ejemplo, maleato de clorfeniramina, clemastina) (Inflammation and Anti-inflammatory Therapy, Ishiyaku Shuppan (1982)); y similares. El método para conjugar daunomicina a un anticuerpo incluye un método en el cual la daunomicina y un grupo aminao de un anticuerpo son conjugado mediante glutaraldehído, un método en el cual un grupo amino de daunomicina y un grupo carboxilo de un anticuerpo son conjugados mediante una carbodiimida soluble en agua, y similares.

También, con el fin de inhibir células de cáncer directamente, una toxina tal como ricina, difteria toxina y similares, pueden ser usadas. Por ejemplo, un anticuerpo de fusión con una proteína puede ser producido uniendo un cADN que codifica an anticuerpo o fragmento de anticuerpo a otro cADN que codifica la proteína, construyendo ADN que codifica el anticuerpo de fusión, insertando el ADN en un vector de expresión para procariota o un vector de expresión para eucariota, y después introduciéndolo en un procariota o eucariota para expresar el anticuerpo de fusión.

Contemplados además en la presente están fragmentos

de anticuerpos o agentes de unión al antígeno que incluyen fusiones de agentes de unión, por ejemplo fragmentos similares a la inmunoglobulina y agentes tales como diacuerpos, scAbs, fragmentos específicos, triacuerpos, Fab-Fv-Fv, Fab-Fv, tricuerpo, (Fab-Fv)2-Fc, y fragmentos de anticuerpo o porciones, tales como CDRs o bucles de anticuerpo que incluyen CDRs, los cuales son injertados en armazones no Ig tales como fibronectina o cierres de leucina, como se describe en Binz et al., (2005) Nat. Biotech. 23:1257-1268, incorporada en su totalidad en la presente.

Anticuerpos Monoclonales Conjugados anti-aP2 y Agentes de Unión al Antígeno

Si se desea, un anticuerpo o agente de unión al antígeno para uso en la presente invención puede ser conjugado a una o más molécula(s) efectora(s). Se apreciará que la molécula efectora puede comprender una molécula efectora única o dos o más de tales moléculas así ligadas para formar una porción única que puede ser unida a los anticuerpos de la presente invención. Donde se desea obtener un fragmento de anticuerpo ligado a una molécula efectora, este puede ser preparado por procedimientos de ADN recombinante o químicos estándares en los cuales, el fragmento de anticuerpo está ligado ya sea directamente o mediante un agente de acoplamiento a la molécula efectora. Las técnicas para conjugar tales moléculas efectoras a

anticuerpos son bien conocidas en el arte (véase, Hellstrom et al., Controlled Drug Delivery, 2nd Ed., Robinson et al., eds., 1987, pp. 623-53; Thorpe et al., 1982, Immunol. Rev., 62:119-58 y Dubowchik et al., 1999, Pharmacology and Therapeutics, 83, 67-123). Procedimientos químicos particulares incluyen, por ejemplo, aquellos descritos en los documentos WO 93/06231, WO 92/22583, WO 89/00195, WO 89/01476 y WO 03/031581. Alternativamente, donde la molécula efectora es una proteína o polipéptido, el enlace se puede lograr usando procedimientos de ADN recombinantes, por ejemplo, como se describe en los documentos WO 86/01533 y EP0392745.

El término molécula efectora como se usa en la presente incluye, por ejemplo, agentes antineoplásicos, fármacos, toxinas, proteínas biológicamente activas, por ejemplo, enzimas, otros anticuerpos o fragmentos de anticuerpo, agentes de unión al antígeno, polímeros sintéticos (que incluyen PEG) o que se originan naturalmente, ácidos nucleicos y fragmentos de los mismos por ejemplo, ADN, ARN y fragmentos de los mismos, radionúclidos, particularmente radioyoduro, radioisótopos, metales quelados, nanopartículas y grupos reporteros tales como compuestos fluorescentes o compuestos los cuales pueden ser dirigidos por espectroscopia de NMR o ESR.

Ejemplos de moléculas efectora pueden incluir citotoxinas o agentes citoxóticos que incluyen cualquier

agente que es perjudicial a (por ejemplo, elimina) células. Ejemplos incluyen combrestatinas, dolastatinas, epotilonas, estaurosporina, maitansinoides, espongistatinas, rizoxina, halicondrinas, roridinas, hemiasterlinas, taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colquicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi antracindiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propanolol, y puromicina y análogos u homólogos de los mismos. Las moléculas efectoras también incluyen, pero no se limitan a, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo decarbazina), agentes de alquilación (por ejemplo, mecloretamina, clorambucil tiotepa, melfalano, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclotosfamida, busulfano, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C, y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina, antramicina (AMC), calicamicinas o duocarmicinas), y agentes anti-mitóticos (por ejemplo, vincristina y vinblastina).

Otras moléculas efectoras pueden incluir radionúclidos quelados tales como 111In y 90Y, Lu177,

Bismuto213, Californio252, Iridio192 y Tungsteno188/Rhenio188; o fármacos tales como pero no limitados a alquilfosfocolinas, inhibidores de topoisomerasa I, taxoides y suramina.

Otras moléculas efectoras incluyen proteínas, péptidos y enzimas. Las enzimas de interés incluyen, pero no se limitan a, enzimas proteolíticas, hidrolasas, liasasa, isomerasas, transferasas. Proteínas, polipéptidos y péptidos de interés incluyen, pero no se limitan a, inmunoglobulinas, toxinas tales como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas, o difteria toxina, una proteína tal como insulina, factor necrosis del tumor, α-interferón, β-interferón, factor de crecimiento del nervio, factor de crecimiento derivado de plaquetas o activador del plasminógeno tisular, un agente trombótico o un agente anti-angiogénico, por ejemplo, angiostatina o endostatina, o, un modificador de respuesta biológica tal como una linfocina, interleucina-1 (IL-1), interleucina-2 (IL-2), factor de estimulación de la colonia de macrófagos del granulocito (GM-CSF), factor de estimulación de la colonia del granulocito (G-CSF), factor de crecimiento del nervio (NGF) u otro factor de crecimiento e inmunoglobulinas.

Otras moléculas efectoras pueden incluir sustancias detectables útiles por ejemplo, en diagnóstico. Ejemplos de sustancias detectables incluyen varios enzimas, grupos

prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, núclidos radioactivos, metales que emiten positrón (para uso en tomografía de emisión de positrón), e iones de metal paramagnético no radioactivo. Véase en general la Patente Estadounidense No. 4,741,900 para iones de metal, los cuales pueden ser conjugados a anticuerpos para uso como diagnósticos. Las enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, o acetilcolinesterasa; grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina, avidina y biotina; los materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, fluoresceína de diclorotriazinilamina, cloruro de dansilo, y ficoeritrina; los materiales luminiscentes adecuados incluyen luminol; los materiales bioluminiscentes adecuados incluyen luciferasa, luciferina, y aequorina; y los núclidos radioactivos adecuados incluyen 125I, 131I, 111In y 99Tc.

En otro ejemplo la molécula efectora puede incrementar la vida útil del anticuerpo *in vivo*, y/o reducir la inmunogenicidad del anticuerpo y/o mejorar el suministro de un anticuerpo a través de una barrera epitelial al sistema inmune. Ejemplos de moléculas efectoras adecuadas de este tipo incluyen polímeros, albúmina, proteínas de unión a albúmina o compuestos de unión a albúmina tales como aquellos

descritos en el documento WO05/117984.

En una modalidad una vida útil proporcionada por una molécula efectora la cual es independiente de aP2 o un anticuerpo anti-aP2 humano, es ventajosa.

Donde la molécula efectora es un polímero puede, en general, ser un polímero que se origina naturalmente o sintético, por ejemplo, un polímero de polialquileno, polialquenileno o polioxialquileno de cadena ramificada o recta opcionalmente sustituido o un polisacárido ramificado o no ramificado, por ejemplo, un homo- o hetero-polisacárido.

Sustituyentes opcionales específicos, los cuales pueden estar presentes en los polímeros sintéticos mencionados anteriormente, incluyen uno o más grupos hidroxi, metilo o metoxi.

Ejemplos específicos de polímeros sintéticos incluyen poli(etilenglicol), poli(propilenglicol) poli(alcohol vinílico) o derivados de los mismos de cadena recta o ramificada opcionalmente sustituidos, especialmente poli(etilenglicol) opcionalmente sustituido, tal como metoxipoli(etilenglicol) o derivados de los mismos.

Polímeros que se originan naturalmente específicos, incluyen lactosa, amilosa, dextrano, glicógeno o derivados de los mismos.

En una modalidad el polímero es albúmina o un fragmento del mismo, tal como albúmina de suero humano o un

fragmento del mismo. En una modalidad el polímero es una molécula de PEG.

"Derivados" como se usa en la presente con respecto a los conjugados, está propuesto para incluir derivados reactivos, por ejemplo grupos reactivos selectivos de tiol tales como maleimidas y similares. El grupo reactivo puede ser ligado directamente o a través de un segmento enlazador al polímero. Se apreciará que el residuo de tal grupo en algunos casos, formará parte del producto como el grupo enlazante entre el fragmento de anticuerpo y el polímero.

El tamaño del polímero natural o sintético puede ser variado como se desee, pero en general, estará en un intervalo de peso molecular promedio desde 500Da hasta 50000Da, por ejemplo desde 5000 hasta 40000Da tal como desde 20000 hasta 40000Da. El tamaño del polímero en particular es seleccionado conb ase en el uso propuesto del producto, por ejemplo, capacidad para localizar ciertos tejidos tales como tumores o vida útil de circulación extendida (para revisión véase Chapman, 2002, Advanced Drug Delivery Reviews, 54, 531-545). De este modo, por ejemplo, donde el product está propuesto para dejar la circulación y penetrar el tejido, por ejemplo para uso en el tratamiento de un tumor, puede ser ventajoso usar un polímero de peso molecular menor, por ejemplo con un peso molecular de aproximadamente 5000Da. Para aplicaciones donde el producto permanece en la circulación,

puede ser ventajoso usar un polímero de peso molecular superior, por ejemplo que tiene un peso molecular en el intervalo desde 20000Da hasta 40000Da.

Los polímeros adecuados incluyen un polímero de polialquileno, tal como un poli(etilenglicol) o, especialmente, un metoxipoli(etilenglicol) o un derivado del mismo, y especialmente con un peso molecular en el intervalo desde aproximadamente 15000Da hasta aproximadamente 40000Da.

En un ejemplo anticuerpos para uso en la presente invención están unidos a porciones de poli(etilenglicol) (PEG). En un ejemplo particular, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo y las moléculas de PEG pueden ser unidas a través de cualquier cadena lateral de aminoácido disponible o grupo funcional de aminoácido terminal localizado en el fragmento de anticuerpo, por ejemplo cualquier grupo libre amino, imino, tiol, hidroxilo o carboxilo. Tales aminoácidos pueden ocurrir naturalmente en el fragmento de anticuerpo o pueden ser diseñados por ingeniería en el fragmento usando métodos de ADN recombinante (véase por ejemplo, documento US 5,219,996; US 5,667,425; WO98/25971, WO2008/038024). En un ejemplo la molécula de anticuerpo de la presente invención es un fragmento Fab modificado en donde la modificación es la adición al extremo C-terminal de su cadena pesada a uno o más aminoácidos para permitir la unión de una molécula efectora. Adecuadamente,

los aminoácidos adicionales forman una región bisagra modificada que contiene uno o más residuos de cisteína a los cuales la molécula efectora puede estar unida. Los sitios múltiples pueden ser usados para unir dos o más moléculas PEG.

Adecuadamente las moléculas de PEG son covalentemente ligadas a través de un grupo tiol de al menos un residuo de cisteína localizado en el fragmento de anticuerpo. Cada molécula de polímero unida al fragmento de anticuerpo modificado puede ser covalentemente ligada al átomo de azufre de un residuo de cisteína localizado en el fragmento. El enlace covalente en general, será un enlace disulfuro o, en particular, un enlace azufre-carbono. Donde se usa un grupo tiol como el punto de unión de moléculas efectoras apropiadamente activadas, por ejemplo, los derivados selectivos de tiol tales como derivados de cisteína y maleimidas, pueden ser usados. Un polímero activado puede ser usado como el material iniciador en la preparación de los fragmentos de anticuerpo modificados por polímero como se describe anteriormente.

El polímero activado puede ser cualquier polímero que contiene un grupo reactivo tiol tal como un ácido α-halocarboxílico o éster, por ejemplo, yodoacetamida, una imida, por ejemplo, maleimida, una vinilsulfona o un disulfuro. Tales materiales de partida se pueden obtener

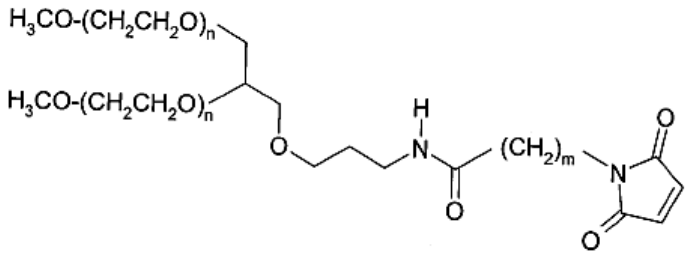
comercialmente (por ejemplo, de Nektar, anteriormente Shearwater Polymers Inc., Huntsville, AL, USA) o puede ser preparado a partir de materiales de partida comercialmente disponibles usando procedimientos químicos convencionales. Las moléculas PEG particulares incluyen 20K metoxi-PEG-amina (obtenible de Nektar, anteriormente Shearwater; Rapp Polymere; y SunBio) y M-PEG-SPA (obtenible de Nektar, anteriormente Shearwater).

En una modalidad, el anticuerpo es un fragmento Fab modificado, fragmento Fab' o diFab el cual es PEGilado, es decir, tiene PEG (poli(etilenglicol)) covalenetemente unido a este, por ejemplo, de conformidad con el método descrito en los documentos EP 0948544 o EP1090037 [véase también "Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications", 1992, J. Milton Harris (ed), Plenum Press, New York, "Poly(ethyleneglycol) Chemistry and Biological Applications", 1997, J. Milton Harris and S. Zalipsky (eds), American Chemical Society, Washington DC y "Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences", 1998, M. Aslam and A. Dent, Grove Publishers, New York; Chapman, A. 2002, Advanced Drug Delivery Reviews 2002, 54:531-545]. En un ejemplo, el PEG está unido a una cisteína en la región bisagra. En un ejemplo, un fragmento Fab modificado por PEG tiene un grupo maleimida covalentemente unido a un grupo tiol único en una región bisagra modificada.

Un residuo de lisina puede ser covalentemente ligado al grupo maleimida y a cada uno de los grupos amina en el residuo de lisina puede ser unido a un polímero de metoxipoli(etilenglicol) que tiene un peso molecular de aproximadamente 20,000Da. El peso molecular total del PEG unido al fragmento Fab puede por lo tanto, ser de aproximadamente 40,000Da.

Las moléculas PEG particulares incluyen lisima modificada con 2-[3-(N-maleimido)propionamido]etilamida de N,N'-bis(metoxipoli(etilenglicol) MW 20,000, también conocida como PEG2MAL40K (obtenible de Nektar, anteriormente Shearwater).

Las fuentes alternativas de enlazadores PEG incluyen NOF quién suministra GL2-400MA3 (en donde m en la estructura abajo es 5) y GL2-400MA (donde m is 2) y n es aproximadamente 450:



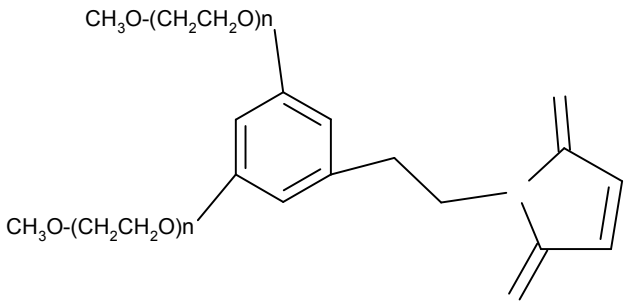
m es 2 o 5

Es decir, cada PEG es de aproximadamente 20,000Da.

De este modo en una modalidad el PEG es 2,3-Bis(metilpolioxietien-oxi)-1-{[3-(6-maleimido-1-

oxohexil)amino]propiloxi}hexano (el PEG ramificado de 2 brazos, -CH2) 3NHCO(CH2)5-MAL, Mw 40,000 conocido como SUNBRIGHT GL2-400MA3.

Moléculas efectoras PEG alterantivas adicionales del siguiente tipo:



son disponibles de Dr Reddy, NOF y Jenkem.

En una modalidad se proporciona an anticuerpo el cual es PEGilado (por ejemplo con un PEG descrito en la presente), unido a través de un residuo de aminoácido de cisteína en o aproximadamente el aminoácido 229 en la cadena, por ejemplo, el aminoácido 229 de la cadena pesada (por numeración secuencial), por ejempl, el aminoácido 229 de la Seq. ID No. 456, 460, 458, 462, o 464.

En una modalidad la presente descripción proporciona una molécula de Fab'PEG que comprende uno o más polímeros PEG, por ejemplo 1 o 2 polímeros tales como un polímero o polímeros de 40 kDa.

Las moléculas Fab'-PEG de conformidad con la presente descripción pueen ser particularmente ventajosas en

que tienen una vida útil independiente del fragmento Fc. En un ejemplo la presente invención proporciona un método para tratar una enfermedad aliviada modulando la actividad biológica de aP2 humana que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-aP2 o agente de unión al antígeno del mismo en donde el anticuerpo o agente de unión al antígeno del mismo tiene una vida útil que es independiente de la unión de Fc a aP2.

En una modalidad se proporciona un Fab' conjugado a un polímero, tal como una molécula de PEG, una molécula de almidón o una molécula de albúmina.

En una modalidad se proporciona un scFv conjugado a un polímero, tal como una molécula PEG, una molécula de almidón o una molécula de albúmina.

En una modalidad el anticuerpo o fragmento es conjugado a una molécula de almidón, por ejemplo, para incrementar la vida útil. Los métodos para conjugar almidón a una proteína son como se describe en el documento US 8,017,739 incorporado en la presente por referencia.

Polinucleótidos

La presente invención también proporciona una secuencia de ADN aislada que codifica la(s) cadena(s) pesada(s) y/o ligera(s) de una molécula de anticuerpo de la presente invención. Adecuadamente, la secuencia de ADN codifica la cadena pesada o ligera de una molécula de

anticuerpo de la presente invención. La secuencia de ADN de la presente invención puede comprender ADN sintético, por ejemplo, producido por procesamiento químico, cADN, ADN genómico o cualquier combinación de las mismas.

Las secuencias de ADN, las cuales codifican una molécula de anticuerpo de la presente invención, se pueden obtener por métodos bien conocidos por aquellos expertos en el arte. Por ejemplo, la secuencias de ADN que codifican para parte o todas las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo pueden ser sintetizadas como se desea a partir de las secuencias de ADN determinadas o con base en las secuenicas de aminoácido correspondientes.

El ADN que codifica para secuencias de armazón aceptoras es ampliamente disponible para aquellos expertos en la técnica y puede ser fácilmente sintetizado con base en sus propia secuencias de aminoácido conocidas.

Pueden ser usadas técnicas estándares de biología molecular para preparar secuencias de ADN que codifican para la molécula de anticuerpo de la presente invención. Las secuencias de ADN deseadas pueden ser sintetizadas completamente o en parte usando técnicas de síntesis de oligonucleótido. Las mutagénesis de sitio dirigido y técnicas de reacción en cadena de polimerasa (PCR) pueden ser usadas como se aparopiado.

Ejemplos de secuencias de cADN adecuadas se

proporcionan en la Tabla 12 siguiente.

Ejemplos de secuencias de cADN adecuadas que codifican una región variable de cadena ligera humanizada se proporcionan en las Seq. ID Nos. 467, 469, 491, 493, 471, y 473. Ejemplos de secuencias de ADN adecuadas que codifican la región variable de cadena pesada humanizada se proporcionan en las Seq. ID No. 475, 507, 477, 509, y 511.

Ejemplos de secuencias de cADN adecuadas que codifican la cadena ligera (variable y constante) se proporcionan en las Seq. ID Nos. 468, 470, 492, 494, 472, y 474.

Ejemplos de secuencias de cADN adecuadas que codifican la cadena pesada (variable y constante) se proporcionan en las Seq. ID Nos. 476, 508, 478, 510, y 512.

Tabla 12. Ejemplos de Secuencias de ADN Adecuadas que Codifican Fragmentos de Anticuerpo Anti-aP2

Identificador que codifica el cADN	**Seq. ID No.**	**Secuencia**

Identificador que codifica el cADN	**Seq. ID No.**	**Secuencia**
cADN de Región VL Ab 909 de conejo (Seq. ID No. 445)	465	gacgtcgtgatgacccagactccagcctc cgtgtctgaacctgtgggaggcacagtca ccatcaagtgccaggccagtgaggatatt agtaggtacttagtctggtatcagcagaa accagggcagcctcccaagcgcctgatct acaaggcatccactctggcatctggggtc ccatcgcggttcaaaggcagtggatctgg gacagatttcactctcaccatcagcgacc tggagtgtgacgatgctgccacttactac tgtcaatgcacttatggtacttatgctgg tagtttttttattctttcggcggaggga ccgaggtggtcgtcgaa
cADN de Región Ab 909 VH de Conejo (Seq. ID No. 454)	466	cagtcggtggaggagtccgggggtcgcct ggtcacgcctgggacacccctgacactca cctgcacagtctctggattctccctcagt acctactacatgagctgggtccgccaggc tccagggaaggggctggaatggatcggaa tcatttatcctagtggtagcacatactgc gcgagctgggcgaaaggccgattcaccat ctccaaagcctcaaccacggtggatctga aaatcaccagtccgacaaccgaggacacg gccacctatttctgtgccagacctgataa tgatggtacttctggttatttgagtggtt tcggcttgtggggccaaggcaccctcgtc accgtctcgagc
cADN de región V 909 gL1 (Seq. ID No. 446)	467	gacgtcgtcatgacccagtccccttcctc cctttcagccagcgtgggcgatagagtga ctatcacttgccaagcgtcggaggacatc tcgcgctacctggtgtggtatcaacagaa gccaggtaaagcgcccaagcggctgatct acaaggcctcaactttggcatccggagtg ccgtcgaggttcaagggcagcggatcggg aaccgacttcactctcaccattagctcac tgcagccggaagattttgccacttactac tgccagtgtacctacgggacctacgctgg gtcgttcttttacagcttcggaggcggaa ccaaagtggaaatcaag

Identificador que codifica el cADN	**Seq. ID No.**	**Secuencia**
cADN cadena ligera 909 gL1 (V + constante) (Seq. ID No. 447)	468	gacgtcgtcatgacccagtccccttcctc cctttcagccagcgtgggcgatagagtga ctatcacttgccaagcgtcggaggacatc tcgcgctacctggtgtggtatcaacagaa gccaggtaaagcgcccaagcggctgatct acaaggcctcaactttggcatccggagtg ccgtcgaggttcaagggcagcggatcggg aaccgacttcactctcaccattagctcac tgcagccggaagattttgccacttactac tgccagtgtacctacgggacctacgctgg gtcgttcttttacagcttcggaggcggaa ccaaagtggaaatcaagcgtacggtggcc gctccctccgtgttcatcttcccaccctc cgacgagcagctgaagtccggcaccgcct ccgtcgtgtgcctgctgaacaacttctac ccccgcgaggccaaggtgcagtggaaggt ggacaacgccctgcagtccggcaactccc aggaatccgtcaccgagcaggactccaag gacagcacctactccctgtcctccaccct gaccctgtccaaggccgactacgagaagc acaaggtgtacgcctgcgaagtgacccac cagggcctgtccagccccgtgaccaagtc cttcaaccggggcgagtgc
cADN de región V 909 gL10 (Seq. ID No. 448)	469	gacgtcgtcatgacccagtccccttcctc cctttcagccagcgtgggcgatagagtga ctatcacttgccaagcgtcggaggacatc tcgcgctacctggtgtggtatcaacagaa gccaggtaaagcgcccaagcggctgatct acaaggcctcaactttggcatccggagtg ccgtcgaggttcaagggcagcggatcggg aaccgacttcactctcaccattagctcac tgcagccggaagattttgccacttactac tgccaggctacctacgggacctacgctgg gtcgttcttttacagcttcggaggcggaa ccaaagtggaaatcaag

Identificador que codifica el cADN	**Seq. ID No.**	**Secuencia**
cADN de cadena ligera 909 gL10 (V + constante) (Seq. ID No. 449)	470	gacgtcgtcatgacccagtccccttcctc cctttcagccagcgtgggcgatagagtga ctatcacttgccaagcgtcggaggacatc tcgcgctacctggtgtggtatcaacagaa gccaggtaaagcgcccaagcggctgatct acaaggcctcaactttggcatccggagtg ccgtcgaggttcaagggcagcggatcggg aaccgacttcactctcaccattagctcac tgcagccggaagattttgccacttactac tgccaggctacctacgggacctacgctgg gtcgttcttttacagcttcggaggcggaa ccaaagtggaaatcaagcgtacggtggcc gctccctccgtgttcatcttcccaccctc cgacgagcagctgaagtccggcaccgcct ccgtcgtgtgcctgctgaacaacttctac ccccgcgaggccaaggtgcagtggaaggt ggacaacgccctgcagtccggcaactccc aggaatccgtcaccgagcaggactccaag gacagcacctactccctgtcctccaccct gaccctgtccaaggccgactacgagaagc acaaggtgtacgcctgcgaagtgacccac cagggcctgtccagccccgtgaccaagtc cttcaaccggggcgagtgc
cADN de región V 909 gL13 (Seq. ID No. 487)	491	gacatccaaatgacccagtccccttcctc cctttcagccagcgtgggcgatagagtga ctatcacttgccaagcgtcggaggacatc tcgcgctacctggtgtggtatcaacagaa gccaggtaaagcgcccaagcggctgatct acaaggcctcaactttggcatccggagtg ccgtcgaggttctccggcagcggatcggg aaccgagttcactctcaccattagctcac tgcagccggaagattttgccacttactac tgccaggctacctacgggacctacgctgg gtcgttcttttacagcttcggaggcggaa ccaaagtggaaatcaag

Identificador que codifica el cADN	**Seq. ID No.**	**Secuencia**
cADN de cadena ligera 909 gL13 (V + constante) (Seq. ID No. 489)	492	gacatccaaatgacccagtccccttcctc cctttcagccagcgtgggcgatagagtga ctatcacttgccaagcgtcggaggacatc tcgcgctacctggtgtggtatcaacagaa gccaggtaaagcgcccaagcggctgatct acaaggcctcaactttggcatccggagtg ccgtcgaggttctccggcagcggatcggg aaccgagttcactctcaccattagctcac tgcagccggaagattttgccacttactac tgccaggctacctacgggacctacgctgg gtcgttcttttacagcttcggaggcggaa ccaaagtggaaatcaagcgtacggtggcc gctccctccgtgttcatcttcccaccctc cgacgagcagctgaagtccggcaccgcct ccgtcgtgtgcctgctgaacaacttctac ccccgcgaggccaaggtgcagtggaaggt ggacaacgccctgcagtccggcaactccc aggaatccgtcaccgagcaggactccaag gacagcacctactccctgtcctccaccct gaccctgtccaaggccgactacgagaagc acaaggtgtacgcctgcgaagtgacccac cagggcctgtccagccccgtgaccaagtc cttcaaccggggcgagtgc
cADN de Región V 909 gL50 (Seq. ID No. 488)	493	gacgtcgtcatgacccagtccccttcctc cctttcagccagcgtgggcgatagagtga ctatcacttgccaagcgtcggaggacatc tcgcgctacctggtgtggtatcaacagaa gccaggtaaagcgcccaagcggctgatct acaaggcctcaactttggcatccggagtg ccgtcgaggttcaagggcagcggatcggg aaccgacttcactctcaccattagctcac tgcagccggaagattttgccacttactac gcccaggctacctacgggacctacgctgg gtcgttcttttacagcttcggaggcggaa ccaaagtggaaatcaag

Identificador que codifica el cADN	**Seq. ID No.**	**Secuencia**
cADN de cadena ligera 909 gL50 (V + constante) (Seq. ID No. 490)	494	gacgtcgtcatgacccagtccccttcctc cctttcagccagcgtgggcgatagagtga ctatcacttgccaagcgtcggaggacatc tcgcgctacctggtgtggtatcaacagaa gccaggtaaagcgcccaagcggctgatct acaaggcctcaactttggcatccggagtg ccgtcgaggttcaagggcagcggatcggg aaccgacttcactctcaccattagctcac tgcagccggaagattttgccacttactac gcccaggctacctacgggacctacgctgg gtcgttcttttacagcttcggaggcggaa ccaaagtggaaatcaagcgtacggtggcc gctccctccgtgttcatcttcccaccctc cgacgagcagctgaagtccggcaccgcct ccgtcgtgtgcctgctgaacaacttctac ccccgcgaggccaaggtgcagtggaaggt ggacaacgccctgcagtccggcaactccc aggaatccgtcaccgagcaggactccaag gacagcacctactccctgtcctccaccct gaccctgtccaaggccgactacgagaagc acaaggtgtacgcctgcgaagtgacccac cagggcctgtccagccccgtgaccaagtc cttcaaccggggcgagtgc
cADN de Región V 909 gL54 (Seq. ID No. 450)	471	gacgtcgtcatgacccagtccccttcctc cctttcagccagcgtgggcgatagagtga ctatcacttgccaagcgtcggaggacatc tcgcgctacctggtgtggtatcaacagaa gccaggtaaagcgcccaagcggctgatct acaaggcctcaactttggcatccggagtg ccgtcgaggttcaagggcagcggatcggg aaccgacttcactctcaccattagctcac tgcagccggaagattttgccacttactac tgccagcagacctacgggacctacgctgg gtcgttcttttacagcttcggaggcggaa ccaaagtggaaatcaag

Identificador que codifica el cADN	**Seq. ID No.**	**Secuencia**
cADN de cadena ligera 909 gL54 (V + constante) (Seq. ID No. 451)	472	gacgtcgtcatgacccagtccccttcctc cctttcagccagcgtgggcgatagagtga ctatcacttgccaagcgtcggaggacatc tcgcgctacctggtgtggtatcaacagaa gccaggtaaagcgcccaagcggctgatct acaaggcctcaactttggcatccggagtg ccgtcgaggttcaagggcagcggatcggg aaccgacttcactctcaccattagctcac tgcagccggaagattttgccacttactac tgccagcagacctacgggacctacgctgg gtcgttcttttacagcttcggaggcggaa ccaaagtggaaatcaagcgtacggtggcc gctccctccgtgttcatcttcccaccctc cgacgagcagctgaagtccggcaccgcct ccgtcgtgtgcctgctgaacaacttctac ccccgcgaggccaaggtgcagtggaaggt ggacaacgccctgcagtccggcaactccc aggaatccgtcaccgagcaggactccaag gacagcacctactccctgtcctccaccct gaccctgtccaaggccgactacgagaagc acaaggtgtacgcctgcgaagtgacccac cagggcctgtccagccccgtgaccaagtc cttcaaccggggcgagtgc
cADN de Región V 909 gL55 (Seq. ID No. 452)	473	gacgtcgtcatgacccagtccccttcctc cctttcagccagcgtgggcgatagagtga ctatcacttgccaagcgtcggaggacatc tcgcgctacctggtgtggtatcaacagaa gccaggtaaagcgcccaagcggctgatct acaaggcctcaactttggcatccggagtg ccgtcgaggttcaagggcagcggatcggg aaccgacttcactctcaccattagctcac tgcagccggaagattttgccacttactac tgccagcatacctacgggacctacgctgg gtcgttcttttacagcttcggaggcggaa ccaaagtggaaatcaag

Identificador que codifica el cADN	**Seq. ID No.**	**Secuencia**
cADN de cadena ligera 909 gL55 (V + constante) (Seq. ID No. 453)	474	gacgtcgtcatgacccagtccccttcctc cctttcagccagcgtgggcgatagagtga ctatcacttgccaagcgtcggaggacatc tcgcgctacctggtgtggtatcaacagaa gccaggtaaagcgcccaagcggctgatct acaaggcctcaactttggcatccggagtg ccgtcgaggttcaagggcagcggatcggg aaccgacttcactctcaccattagctcac tgcagccggaagattttgccacttactac tgccagcatacctacgggacctacgctgg gtcgttcttttacagcttcggaggcggaa ccaaagtggaaatcaagcgtacggtggcc gctccctccgtgttcatcttcccaccctc cgacgagcagctgaagtccggcaccgcct ccgtcgtgtgcctgctgaacaacttctac ccccgcgaggccaaggtgcagtggaaggt ggacaacgccctgcagtccggcaactccc aggaatccgtcaccgagcaggactccaag gacagcacctactccctgtcctccaccct gaccctgtccaaggccgactacgagaagc acaaggtgtacgcctgcgaagtgacccac cagggcctgtccagccccgtgaccaagtc cttcaaccggggcgagtgc
cADN de Región V 909gH1 (Seq. ID No. 455)	475	gaagtccagctgcaagaatcaggtccagg cctcgtcaaaccatcaggaactttgtcat tgacttgcacggtgagcgggttctcgctt tcgacctactacatgtcgtgggtgcgcca gccgcctgggaagggactggagtggatcg gcatcatctacccgtccggcagcacgtac tgcgctagctgggccaaggggcggttcac catcagcaaggcgtccactactgtggacc tcaagctgtcgtcagttactgcggccgac actgcaacctacttttgtgcccgcccgga taacgatggaacctccggctacctgtccg gattcggactgtggggacagggaacccctt gtgactgtctcgagc

Identificador que codifica el cADN	**Seq. ID No.**	**Secuencia**
cADN de cadena pesada IgG4 909 gH1 (V + constante γ-4P humana) Seq. ID No. 456)	476	gaagtccagctgcaagaatcaggtccagg cctcgtcaaaccatcaggaactttgtcat tgacttgcacggtgagcgggttctcgctt tcgacctactacatgtcgtgggtgcgcca gccgcctgggaagggactggagtggatcg gcatcatctacccgtccggcagcacgtac tgcgctagctgggccaaggggcggttcac catcagcaaggcgtccactactgtggacc tcaagctgtcgtcagttactgcggccgac actgcaacctacttttgtgcccgcccgga taacgatggaacctccggctacctgtccg gattcggactgtggggacagggaacccctt gtgactgtctcgagcgcctccaccaaggg cccctccgtgttccctctggccccttgctccc ggtccacctccgagtctaccgccgctctgggc tgcctggtcaaggactacttccccgagcccgt gacagtgtcctggaactctggcgccctgacct ccggcgtgcacaccttccctgccgtgctgcag tcctccggcctgtactccctgtcctccgtcgt gaccgtgccctcctccagcctgggcaccaaga cctacacctgtaacgtggaccacaagccctcc aacaccaaggtggacaagcgggtggaatctaa gtacggccctccctgccccccctgccctgccc ctgaatttctgggcggaccttccgtgttcctg ttcccccaaagcccaaggacaccctgatgat ctcccggacccccgaagtgacctgcgtggtgg tggacgtgtcccaggaagatcccgaggtccag ttcaattggtacgtggacggcgtggaagtgca caatgccaagaccaagcccagagaggaacagt tcaactccacctaccgggtggtgtccgtgctg accgtgctgcaccaggactggctgaacggcaa agagtacaagtgcaaggtgtccaacaagggcc tgccctccagcatcgaaaagaccatctccaag gccaagggccagccccgcgagccccaggtgta caccctgccccctagccaggaagagatgacca agaaccaggtgtccctgacctgtctggtcaag ggcttctacccctccgacattgccgtggaatg ggagtccaacggccagcccgagaacaactaca agaccacccccctgtgctggacagcgacggc tccttcttcctgtactctcggctgaccgtgg acaagtcccggtggcaggaaggcaacgtc ttctcctgctccgtgatgcacgaggccct gcacaaccactacacccagaagtccctgt ccctgagcctgggcaag

Identificador que codifica el cADN	**Seq. ID No.**	**Secuencia**
cADN de Región V 909gH14 (Seq. ID No. 457)	507	gaagtccagctgcaagaatcaggtccagg cctcgtcaaaccatcaggaactttgtcat tgacttgcgccgtgagcgggttctcgctt tcgacctactacatgtcgtgggtgcgcca gccgcctgggaagggactggagtggatcg gcatcatctacccgtccggcagcacgtac tgcgctagctgggccaaggggcggttcac catcagcaaggcgtccactaaaaatactg tggacctcaagctgtcgtcagttactgcg gccgacactgcaacctacttttgtgcccg cccggataacgatggaacctccggctacc tgtccggattcggactgtggggacaggga acccttgtgactgtctcgagc

Identificador que codifica el cADN	**Seq. ID No.**	**Secuencia**
cADN de cadena pesada IgG4 909 gH14 (V + constante gamma-4P humana) (Seq. ID No. 457)	508	gaagtccagctgcaagaatcaggtccagg cctcgtcaaaccatcaggaactttgtcattga cttgcgccgtgagcgggttctcgctttcgacc tactacatgtcgtgggtgcgccagccgcctgg gaagggactggagtggatcggcatcatctacc cgtccggcagcacgtactgcgctagctgggcc aaggggcggttcaccatcagcaaggcgtccac taaaaatactgtggacctcaagctgtcgtcag ttactgcggccgacactgcaacctacttttgt gcccgcccggataacgatggaacctccggcta cctgtccggattcggactgtggggacagggaa cccttgtgactgtctcgagcgcctccaccaag ggcccctccgtgttccctctggccccttgctc ccggtccacctccgagtctaccgccgctctgg gctgcctggtcaaggactacttccccgagccc gtgacagtgtcctggaactctggcgccctgac ctccggcgtgcacaccttccctgccgtgctgc agtcctccggcctgtactccctgtcctccgtc gtgaccgtgccctcctccagcctgggcaccaa gacctacacctgtaacgtggaccacaagccct ccaacaccaaggtggacaagcgggtggaatct aagtacggccctccctgccccccctgccctgc ccctgaatttctgggcggaccttccgtgttcc tgttcccccaaagcccaaggacaccctgatg atctcccggaccccgaagtgacctgcgtggt ggtggacgtgtcccaggaagatcccgaggtcc agttcaattggtacgtggacggcgtggaagtg cacaatgccaagaccaagcccagagaggaaca gttcaactccacctaccgggtggtgtccgtgc tgaccgtgctgcaccaggactggctgaacggc aaagagtacaagtgcaaggtgtccaacaaggg cctgccctccagcatcgaaaagaccatctcca aggccaagggccagccccgcgagccccagg tgtacaccctgccccctagccaggaagag atgaccaagaaccaggtgtccctgacctg tctggtcaagggcttctacccctccgaca ttgccgtggaatgggagtccaacggccag cccgagaacaactacaagaccacccccc tgtgctggacagcgacggctccttcttcc tgtactctcggctgaccgtggacaagtcc cggtggcaggaaggcaacgtcttctcctg ctccgtgatgcacgaggccctgcacaacc actacacccagaagtccctgtccctgagc ctgggcaag

Identificador que codifica el cADN	**Seq. ID No.**	**Secuencia**
cADN de Región V 909gH15 (Seq. ID. No. 459)	477	gaagtccagctgcaagaatcaggtccagg cctcgtcaaaccatcaggaactttgtcat tgacttgcacggtgagcgggttctcgctt tcgacctactacatgtcgtgggtgcgcca gccgcctgggaagggactggagtggatcg gcatcatctacccgtccggcagcacgtac tccgctagctgggccaaggggcggttcac catcagcaaggcgtccactaaaaatactg tggacctcaagctgtcgtcagttactgcg gccgacactgcaacctacttttgtgcccg cccggataacgagggaacctccggctacc tgtccggattcggactgtggggacaggga acccttgtgactgtctcgagc

Identificador que codifica el cADN	**Seq. ID No.**	**Secuencia**
cADN de cadena pesada IgG4 909 gH15 (V + constante gamma-4P humana) (Seq. ID No. 460)	478	gaagtccagctgcaagaatcaggtccaggcct cgtcaaaccatcaggaactttgtcattgactt gcacggtgagcgggttctcgctttcgacctac tacatgtcgtgggtgcgccagccgcctgggaa gggactggagtggatcggcatcatctacccgt ccggcagcacgtactccgctagctgggccaag gggcggttcaccatcagcaaggcgtccactaa aaatactgtggacctcaagctgtcgtcagtta ctgcggccgacactgcaacctacttttgtgcc cgcccggataacgagggaacctccggctacct gtccggattcggactgtggggacagggaaccc ttgtgacttctcgagcgcctccaccaagggcc cctccgtgttccctctggccccttgctcccgg tccacctccgagtctaccgccgctctgggctg cctggtcaaggactacttccccgagcccgtga cagtgtcctggaactctggcgccctgacctcc ggcgtgcacaccttccctgccgtgctgcagtc ctccggcctgtactccctgtcctccgtcgtga ccgtgccctcctccagcctgggcaccaagacc tacacctgtaacgtggaccacaagccctccaa caccaaggtggacaagcgggtggaatctaagt acggccctccctgcccccccctgccctgccct gaatttctgggcggaccttccgtgttcctgtt ccccccaaagcccaaggacaccctgatgatct cccggacccccgaagtgacctgcgtggtggtg gacgtgtcccaggaagatcccgaggtccagtt caattggtacgtggacggcgtggaagtgcaca atgccaagaccaagcccagagaggaacagttc aactccacctaccgggtggtgtccgtgctgac cgtgctgcaccaggactggctgaacggcaaag agtacaagtgcaaggtgtccaacaagggcctg ccctccagcatcgaaaagaccatctccaaggc caagggccagccccgcgagccccaggtgta caccctgccccctagccaggaagagatga ccaagaaccaggtgtccctgacctgtctg gtcaagggcttctacccctccgacattgc cgtggaatgggagtccaacggccagcccg agaacaactacaagaccacccccccctgtg ctggacagcgacggctccttcttcctgta ctctcggctgaccgtggacaagtcccggt ggcaggaaggcaacgtcttctcctgctcc gtgatgcacgaggccctgcacaaccacta cacccagaagtccctgtccctgagcctgg gcaag

Identificador que codifica el cADN	**Seq. ID No.**	**Secuencia**
cADN de Región V 909gH61 (Seq. ID. No. 461)	509	gaagtccagctgcaagaatcaggtccagg cctcgtcaaaccatcaggaactttgtcat tgacttgcgccgtgagcgggttctcgctt tcgacctactacatgtcgtgggtgcgcca gccgcctgggaagggactggagtggatcg gcatcatctacccgtccggcagcacgtac tgcgctagctgggccaaggggcgggtgac catcagcaaggactccagcaaaaatcagg tgagcctcaagctgtcgtcagttactgcg gccgacactgcagtgtactattgtgcccg cccggataacgatggaacctccggctacc tgtccggattcggactgtggggacaggga acccttgtgactgtctcgagc

Identificador que codifica el cADN	**Seq. ID No.**	**Secuencia**
cADN de cadena pesada IgG4 909 gH61 (V + constante gamma-4P humana) (Seq. ID No. 462)	510	gaagtccagctgcaagaatcaggtccaggcct cgtcaaaccatcaggaactttgtcattgactt gcgccgtgagcgggttctcgctttcgacctac tacatgtcgtgggtgcgccagccgcctgggaa gggactggagtggatcggcatcatctacccgt ccggcagcacgtactgcgctagctgggccaag gggcgggtgaccatcagcaaggactccagcaa aaatcaggtgagcctcaagctgtcgtcagtta ctgcggccgacactgcagtgtactattgtgcc cgcccggataacgatggaacctccggctacct gtccggattcgactgtggggacagggaaccct tgtgactgtctcgagcgcctccaccaagggcc cctccgtgttccctctggccccttgctcccgg tccacctccgagtctaccgccgctctgggctg cctggtcaaggactacttccccgagcccgtga cagtgtcctggaactctggcgccctgacctcc ggcgtgcacaccttccctgccgtgctgcagtc ctccggcctgtactccctgtcctccgtcgtga ccgtgccctcctccagcctgggcaccaagacc tacacctgtaacgtggaccacaagccctccaa caccaaggtggacaagcgggtggaatctaagt acggccctccctgcccccccctgccctgccct gaatttctgggcggaccttccgtgttcctgtt ccccccaaagcccaaggacaccctgatgatct cccggacccccgaagtgacctgcgtggtggtg gacgtgtcccaggaagatcccgaggtccagtt caattggtacgtggacggcgtggaagtgcaca atgccaagaccaagcccagagaggaacagttc aactccacctaccgggtggtgtccgtgctgac cgtgctgcaccaggactggctgaacggcaaag agtacaagtgcaaggtgtccaacaagggcctg ccctccagcatcgaaaagaccatctccaaggc caagggccagccccgcgagccccaggtgtaca ccctgccccctagccaggaagagatgaccaag aaccaggtgtccctgacctgtctggtcaaggg cttctacccctccgacattgccgtggaatggg agtccaacggccagcccgagaacaactacaag accacccccccctgtgctggacagcgacggctc cttcttcctgtactctcggctgaccgtggaca agtcccggtggcaggaaggcaacgtcttctcc tgctccgtgatgcacgaggccctgcacaacca ctacacccagaagtccctgtccctgagcctgg gcaag

Identificador que codifica el cADN	**Seq. ID No.**	**Secuencia**
cADN de Región V 909gH62 (Seq. ID. No. 463)	511	gaagtccagctgcaagaatcaggtccagg cctcgtcaaaccatcaggaactttgtcat tgacttgcgccgtgagcgggttctcgctt tcgacctactacatgtcgtgggtgcgcca gccgcctgggaagggactggagtggatcg gcatcatctacccgtccggcagcacgtac tccgctagctgggccaaggggcgggtgac catcagcaaggactccagcaaaaatcagg tgagcctcaagctgtcgtcagttactgcg gccgacactgcagtgtactattgtgcccg cccggataacgagggaacctccggctacc tgtccggattcggactgtggggacaggga acccttgtgactgtctcgagc

Identificador que codifica el cADN	**Seq. ID No.**	**Secuencia**
cADN de cadena pesada IgG4 909 gH62 (V + constante gamma-4P humana) (Seq. ID No. 464)	512	gaagtccagctgcaagaatcaggtccagg cctcgtcaaaccatcaggaactttgtcat tgacttgcgccgtgagcgggttctcgctt tcgacctactacatgtcgtgggtgcgcca gccgcctgggaagggactggagtggatcg gcatcatctacccgtccggcagcacgtac tccgctagctgggccaaggggcgggtgac catcagcaaggactcca gcaaaaatcaggtgagcctcaagctgtcg tcagttactgcggccgacactgcagtgta ctattgtgcccgcccggataacgagggaa cctccggctacctgtccggattc ggactgtggggacagggaacccttgtgactgt ctcgagcgcctccaccaagggcccctccgtgt tccctctggccccttgctcccggtccacctcc gagtctaccgccgctctgggctgcctggtcaa ggactacttccccgagcccgtgacagtgtcct ggaactctggcgccctgacctccggcgtgcac accttccctgccgtgctgcagtcctccggcct gtactccctgtcctccgtcgtgaccgtgccct cctccagcctgggcaccaagacctacacctgt aacgtggaccacaagccctccaacaccaaggt ggacaagcgggtggaatctaagtacggccctc cctgcccccctgccctgcccctgaatttctg ggcggaccttccgtgttcctgttcccccaaa gcccaaggacaccctgatgatctcccggaccc ccgaagtgacctgcgtggtggtggacgtgtcc caggaagatcccgaggtccagttcaattggta cgtggacggcgtggaagtgcacaatgccaaga ccaagcccagagaggaacagttcaactccacc taccgggtggtgtccgtgctgaccgtgctgca ccaggactggctgaacggcaaagagtacaagt gcaaggtgtccaacaagggc ctgccctccagcatcgaaaagaccatctccaa ggccaagggccagccccgcgagccccaggtgt acaccctgccccctagccaggaagagatgacc aagaaccaggtgtccctgacctgtctggtcaa gggcttctacccctccgacattgccgtggaat gggagtccaacggccagcccgagaacaactac aagaccaccccccctgtgctggacagcgacgg ctccttcttcctgtactctcggctgaccgtgg acaagtcccggtggcaggaaggcaacgtcttc tcctgctccgtgatgcacgaggccctgcacaa ccactacacccagaagtccctgtccctgagcc tgggcaag

Identificador que codifica el cADN	**Seq. ID No.**	**Secuencia**
cADN de armazón aceptora de IGKV1-17 (A30)-JK4 humano	479	gacatccagatgacccagtctccatcctc cctgtctgcatctgtaggagacagagtca ccatcacttgccgggcaagtcagggcatt agaaatgatttaggctggtatcagcagaa accagggaaagcccctaagcgcctgatct atgctgcatccagtttgcaaagtggggtc ccatcaaggttcagcggcagtggatctgg gacagaattcactctcacaatcagcagcc tgcagcctgaagattttgcaacttattac tgtctacagcataatagttaccctctcac tttcggcggagggaccaaggtggagatca aa
cADN de armazón aceptora IGHV4-4 JH4 humano	480	caggtgcagctgcaggagtcgggcccagg actggtgaagccttcagggaccctgtccc tcacctgcgctgtctctggtggctccatc agcagtagtaactggtggagttgggtccg ccagcccccagggaaggggctggagtgga ttggggaaatctatcatagtgggagcacc aactacaacccgtccctcaagagtcgagt caccatatcagtagacaagtccaagaacc agttctccctgaagctgagctctgtgacc gccgcggacacggccgtgtattactgtgc gagatactttgactactggggccaaggaa ccctggtcaccgtctcctca

La presente invención también se refiere a un vector de expresión o clonación que comprende uno o más DNA secuencias de la presente invención. Por consiguiente, se proporciona un vector de expresión o clonación que comprende una o más secuencias de ADN que codifican un anticuerpo de la presente invención. De manera adecuada, el vector de expresión o clonación comprende dos secuencias de ADN, que codifican la cadena ligera y la cadena pesada de la molécula de anticuerpo de la presente invención, respectivamente y

secuencias señal adecuadas. En un ejemplo el vector comprende una secuencia intergénica entre las cadenas pesada y ligera (véase WO03/048208).

Los métodos generales por los cuales los vectores pueden ser construidos, métodos de transfección y métodos de cultivo, son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica. En este sentido, se hace referencia a "Current Protocols in Molecular Biology", 1999, F. M. Ausubel (ed), Wiley Interscience, New York y the Maniatis Manual producido por Cold Spring Harbour Publishing.

Células hospederas que Expresan Anticuerpo Anti-aP2 o Fragmentos de los Mismos

También se proporciona una célula hospedera que comprende uno o más vectores de expresión o clonación que comprenden una o más secuencias de ADN que codifican un anticuerpo de la presente invención. Cualquier sistema de vector/célula hospedera adecuado puede ser usado para expresión de las secuencias de ADN que codifican la molécula de anticuerpo de la presente invención. Por ejemplo, el bcteriano y otros sistemas microbianos pueden ser usados o eucarióticos, por ejemplo, mamíferos, los sistemas de expresión de células hospederas pueden ser usados. Las células hospederas de mamífero adecuadas incluyen células CHO, melanoma o hibridoma.

Tipos adecuados de ovario de hámster Chino (células

CHO) para uso en la presente invención pueden incluir células CHO y CHO-K1 que incluyen células CHO dhfr-, tales como células CHO-DG44 y células CHO-DXB11 y las cuales pueden ser usadas con un marcador seleccionable de DHFR o células CHOK1-SV, las cuales pueden ser usadas con un marcador seleccionable de glutamina sintetasa. Otros tipos de células para uso en la expresión de anticuerpos incluyen líneas de células linfocíticas, por ejemplo, células de mieloma NSO y SP2, células COS. Otras células adecuadas pueden incluir fibroblastos de riñón embriónico humano (hek), por ejemplo células hek293F y ExpiHek, las cuales se conocen en la técnica.

En una modalidad, se proporciona una célula hospedera que comprende un vector de expresión o clonación que comprende una secuencia de ADN seleccionada a partir de las Seq. ID Nos. 467, 469, 491, 493, 471, 473, 475, 507, 477, 509, 511, 468, 470, 492, 494, 472, 474, 476, 508, 478, 510, o 512.

Production de Anticuerpos anti-aP2 o Fragmentos de los Mismos

La presente invención también proporciona un proceso para la producción de una molécula de anticuerpo de conformidad con la presente invención que comprende cultivar una célula hospedera que contiene un vector de la presente invención bajo condiciones adecuadas para conducir a la

expresión de la proteína a partir del ADN que codifica la molécula de anticuerpo de la presente invención, y aislar la molécula de anticuerpo.

La molécula de anticuerpo puede comprender solamente un polipéptido de cadena pesada o ligera, en tal caso, solamente una secuencia codificante de polipéptido de cadena pesada o cadena ligera polipéptido necesita ser usada para transferctar las células hospederas. Para producción de productos que comprenden tanto cadenas ligeras como pesada, la línea celular puede ser transfectada con dos vectores, un primer vector que codifica un polipéptido de cadena ligera y un segundo vector que codifica un polipéptido de cadena pesada. Alternativamente, un vector único puede ser usado, el vector incluye secuencias que codifican los polipéptidos de cadena pesada y cadena ligera.

Se proporciona un proceso para cultivar una célula hospedera y expresar un anticuerpo o fragmento del mismo, aislar el último y opcionalmente purificar el mismo para proporcionar un anticuerpo aislado o fragmento. En una modalidad el proceso comprende además, la etapa de conjugar una molécula efectora al anticuerpo o fragmento aislado, por ejemplo, conjugando a un polímero PEG en particular, como se describe en la presente.

En una modalidad se proporciona un proceso para purificar un anticuerpo (en particular un anticuerpo o

fragmento de conformidad con la invención) que comprende las etapas: realizar cromatografía de intercambio aniónico en modelo sin unión, de manera que las impurezas son retenidas en la columna y el anticuerpo es eluido.

En una modalidad la purificación emplea captura de afinidad en una columna de Proteína A, y después trituración. En una modalidad, la purificación emplea captura de afinidad en una columna aP2, y después trituración.

En una modalidad la purificación emplea cibacron azul o similar para purificación de moléculas conjugadas o fusión de albúmina.

Las resinas de intercambio iónico adecuadas para uso en los procesos incluyen resina Q.FF (suministrada por GE-Healthcare). La etapa puede, por ejemplo, ser realizada a un pH de aproximadamente 8.

El proceso puede comprender además, una etapa de captura inicial que emplea cromatografía de intercambio catiónico, realizado por ejemplo a un pH de aproximadamente 4 hasta 5, tal como 4.5. La cromatografía de intercambio catiónico puede, por ejemplo, emplear una resina tal como resina CaptoS o SP sefarosa FF (suministrado por GE-Healthcare). El anticuerpo o fragmento puede entonces ser eluido a partir de la resina empleando una solución de sal iónica tal como cloruro de sodio, por ejemplo, a una concentración de 200mM.

De este modo la etapa o etapas cromatográficas pueden incluir una o más etapas de lavado, como sean apropiadas.

El proceso de purificación también puede comprender una o más etapas de filtración, tales como una etapa de diafiltración o etapa de filtración de HPLC.

De este modo en una modalidad se proporciona un fragmento o anticuerpo anti-aP2 purificado, por ejemplo un fragmento o anticuerpo humanizado, en particular un fragmento o anticuerpo de conformidad con la invención, en forma sustancialmente purificada, en particular libre o sustancialmente libre de endotoxina y/o proteína o ADN de célula hospedera.

La forma purificada como se usa anteriormente, está propuesta para referirse al menos a 90% de pureza, tal como 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% en p/p o más pura.

Sustancialmente libre de endotoxina es en general propuesto para referirse a un contenido de endotoxina de 1 EU por mg de producto de anticuerpo o menos tal como 0.5 o 0.1 EU por mg de producto.

Sustancialmente libre de proteína o ADN de célula hospedera es en general propuesto para referirse a un contenido y/o ADN de proteína de célula hospedera de 400µg por mg de producto de anticuerpo o menos, tal como 100µg por mg o menos, en particular 20µg por mg, como sea apropiado.

Composiciones Farmacéuticas

Como los anticuerpos de la presente invención son útiles en el tratamiento y/o profilaxis de una condición patológica, la presente invención también proporciona una composición de diagnóstico o farmacéutica que comprende un anticuerpo o agente de unión al antígeno de la presente invención en combinación con uno o más de un excipiente, diluyente, o portador farmacéuticamente aceptable. Por consiguiente, se proporciona el uso de un anticuerpo o agente de unión al antígeno de la invención para la manufactura de un medicamento. La composición usualmente será suministrada como parte de una composición farmacéutica, estéril, que normalmente incluirá un portador farmacéuticamente aceptable. Una composición farmacéutica de la presente invención puede comprender adicionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable.

La presente invención también proporciona un proceso para la preparación de una composición de diagnótico o farmacéutica que comprende agregar y mezclar el anticuerpo o agente de unión al antígeno de la presente invención junto con uno o más de un excipiente, diluyente, o portador farmacéuticamente aceptable.

El anticuerpo o agente de unión al antígeno puede ser el único ingrediente activo en la composición de diagnóstico o farmacéutica o puede estar acompalado por otros

ingredientes activos que incluyen otros ingredientes de anticuerpo o ingredientes no anticuerpo tales como estereoides u otras moléculas de fármaco, en particular moléculas de fármacos cuya vida útil es dependiente de la unión a aP2.

Las composiciones farmacéuticas de manera adecuada comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo o agente de unión al antígeno de la invención. El término "cantidad terapéuticamente efectiva" como se usa en la presente se refiere a una cantidad de un agente terapéutico necesaria para tratar, aliviar, o prevenir una enfermedad o condición objetivo, o para presentar un efecto preventivo o terapéutico detectable. Para cualquier anticuerpo o agente de unión al antígeno descrito, la cantidad terapéuticamente efectiva puede ser estimada inicialmente ya sea en ensayos de cultivo celular o en modelos animales, usualmente en roedores, conejos, perros, cerdos o primates. El modelo animal también puede ser usado para determinar el intervalo de concentración apropiado y la ruta de administración. Tal información puede entonces ser usada para determinar las dosis útiles y rutas para administración en humanos.

La cantidad terapéuticamente efectiva precisa para un sujeto humano dependerá de la severidad del estado de enfermedad, la salud general del sujeto, la edad, peso y

género del sujeto, dieta, tiempo y frecuencia de administración, combinación(es) de fármaco, sensibilidades a la reacción y toleranci/respuesta a terapia. Esta cantidad puede ser determinada por experimentación de rutina y está dentro del juicio del especialista. En general, una cantidad terapéuticamente efectiva será desde 0.01 mg/kg hasta 500 mg/kg, por ejemplo 0.1 mg/kg hasta 200 mg/kg, tal como 100mg/Kg. Las composiciones farmacéuticas pueden ser convenientemente presentadas en formas de dosis unitarias que contienen una cantidad predeterminada de un agente activo de la invención por dosis.

Las dosis terapéuticas de los anticuerpos o agentes de unión al antígeno de conformidad con la presente descripción no muestran efectos toxicológicos aparentes *in vivo*.

Ventajosamente, los niveles de actividad de aP2 *in vivo* pueden ser mantenidos a un nivel apropiadamente reducido por administración de dosis secuenciales del anticuerpo o agente de unión de conformidad con la descripción.

Las composiciones pueden ser administradas individualmente a un paciente o pueden ser administradas en combinación (por ejemplo, simultáneamente, secuencialmente, o separadamente) con otros agentes, fármacos u hormonas.

Una composición farmacéutica también puede contener un portador farmacéuticamente aceptable para administración

del anticuerpo o agente de unión al antígeno. El portador no debe el mismo indicur la producción de anticuerpos nocivos al individuo que recibe la composición y no debe ser tóxico. Los portadores adecuados pueden ser macromoléculas lentamente metabolizadas, grandes tales como proteínas, polipéptidos, liposomas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácido y partículas de virus inactivas.

Las sales farmacéuticamente aceptables pueden ser usadas, por ejemplo sales de ácido mineral, tales como clorhidratos, bromhidratos, fosfatos y sulfatos, o sales de ácidos orgánicos, tales como acetatos, propionatos, malonatos y benzoatos.

Los portadores farmacéuticamente aceptables en composiciones terapéuticas pueden contener adicionalmente líquidos como agua, salina, glicerol y etanol. Adicionalmente, sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsificantes o sustancias amortiguadoras de pH, pueden estar presentes en tales composiciones. Tales portadores permiten a las composiciones farmacéuticas ser formulads como tabletas, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, pastas aguadas y suspensiones, para ingestión por el paciente.

Las formas preferidas para administración incluyen formas adecuadas para administración parenteral, por ejemplo,

por inyección o infusión, por ejemplo por inyección de bolo o infusión continua. Donde el producto es para inyección o infusión, puede tomar la forma de una suspensión, solución o emulsión en un vehículo acuoso o aceitoso, y puede contener agentes de formulación, tales como agentes de suspensión, preservativos, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, la molécula de anticuerpo puede estar en forma seca, para reconstitución antes de uso con un líquido estéril apropiado.

Una vez formuladas, las composiciones de la invención pueden ser administradas directamente al sujeto. Los sujetos que serán tratados pueden ser animales. Sin embargo, se prefiere que las composiciones sean adaptadas para administación a sujetos humanos.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden ser administradas por cualquier número de rutas que incluyen, pero no se limitan a, rutas oral, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdermal, transcutánea (por ejemplo, véase documento WO98/20734), subcutánea, intraperitoneal, intranasal, entérica, típica, sublingual, intravaginal o recta. Los hipoatomizadores también pueden ser usados para administrar las composiciones farmacéuticas de la invención. Típicamente, las composiciones terapéuticas pueden ser preparadas como inyectables, ya sea como soluciones o

suspensiones líquidas. Las formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en, vehículos líquidos previo a la inyección, también pueden ser preparadas. El suministro directo de las composiciones en general, será realizado por inyección, subcutáneamente, intreaperitonealmente, intravenosamente o intramuscularmente, o suministrado al espacio intersticial de un tejido. Las composiciones también pueden ser administradas en una lesión. El tratamiento de dosificación puede ser un esquema de dosis única o un esquema de dosis múltiple.

Se apreciará que el ingrediente activo en la composición será una molécula de anticuerpo. Como tal, será susceptible de degradación en el tracto gastrointestinal. De este modo, si la composición es administrada por una ruta usando el tracto gastrointestinal, la composición necesitará contener agentes los cuales protegan al anticuerpo de la degradación pero los cuales liberen el anticuerpo una vez que ha sido absorbido a partir del tracto gastrointestinal.

Una discusión completa de portadores farmacéuticamente aceptables está disponible en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, N.J. 1991).

En una modalidad, los anticuerpos monoclonales anti-aP2 descritos en la presente son administrados como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes, parches transdérmicos, y sistemas de suministro

microencapsulados. Los polímeros biocompatibles, biodegradables, pueden ser usados, tale como acetato de etilenvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de tales formulaciones se describen mediante por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978. Las composiciones farmacéuticas son preferiblemente manufacturadas bajo condiciones de GMP.

En una modalidad, los anticuerpos monoclonales anti-aP2 son administrados continuamente, por ejemplo, el anticuerpo puede ser administrado con un dispoitivo de inyección hipodérmica sin aguja, tal como los dispositivos descritos en, por ejemplo, las Patentes Estadounidenses No. 5,399,163, 5,383,851, 5,312,335, 5,064,413, 4,941,880, 4,790,824, o 4,596,556. Ejemplos de implantes y módulos útiles en la presente invención incluyen: Patente Estadounidense No. 4,487,603, la cual describe una bomba de micro-infusión implantable para dispensar medicación a una velocidad controlada; Patente Estadounidense No. 4,486,194, la cual describe un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos a través de la piel; Patente Estadounidense No. 4,447,233, la cual describe una bomba de infusión de medicación para suministrar medicación a una velocidad de infusión precisa; Patente Estadounidense No. 4,447,224, la

cual describe un aparato de infusión implantable de flujo variable para suministro continuo de fármaco; Patente Estadounidense No. 4,439,196, la cual describe un sistema de suministro de fármaco osmótico que tiene compartimientos de capa múltiple; y Patente Estadounidense No. 4,475,196, la cual describe un sistema de suministro de fármaco osmótico. Se conocen muchos otros de tales implantes, sistemas de suministro, y módulos.

Aplicaciones Terapéuticas

Los compuestos del anticuerpo monoclonal anti-aP2 descrito en la presente, que incluyen compuestos de anticuerpo humanizado anti-aP2 humana, así como también los agentes de unión al antígeno descritos, dirigen la proteína FABP4/aP2 chaperona lípida y son útiles en el tratamiento de trastornos metabólicos, que incluyen, pero no se limitan a, diabetes (por ejemplo diabetes tipo 2), obesidad y enfermedad de hígado graso, cáncer, que incluyen liposarcomas, cáncer de vejiga, y cáncer de ovario, y trastornos cardiovasculares. Se ha descubierto de manera sorprendente, que los compuestos de anticuerpo anti-aP2 descritos en la presente son capaces de unirse a aP2 secretada a una baja afinidad de unión, los cuales, cuando se administran a un hospedero en necesidad del mismo, neutralizan la actividad de aP2 y proporcionan niveles inferiores de glucosa en sangre en ayunas, metabolismo de glucosa sistémica mejorado, sensibilidad a la insulina

sistémica incrementada, masa grasa reducida, esteatosis hepática, perfiles lípidos en suero mejorados, y/o formación de placa aterogénica reducida en un hospedero cuando se compara con anticuerpos monoclonales anti-aP2 que tienen afinidades de unión superiores.

En un aspecto de la presente invención, se proporciona un método para tratar un trastorno mediado por aP2 en un hospedero administrando una cantidad efectiva de un anticuerpo monoclonal anti-aP2 o agente de unión al antígeno descrito en la presente. En una modalidad, el trastorno es un trastorno metabólico. En una modalidad, el trastorno es diabetes. En una modalidad, el trastorno es diabetes Tipo I. En una modalidad, el trastorno es diabetes Tipo II. En una modalidad, el trastorno es hiperglicemia. En una modalidad, el trastorno es obesidad. En una modalidad, el trastorno es dislipidemia. En una modalidad, el trastorno es enfermedad de hígado hepático. En una modalidad, el trastorno es un trastorno cardiovascular. En una modalidad, el trastorno es aterosclerosis. En una modalidad, el trastorno es an trastorno inflamatorio. En una modalidad, el trastorno es asma. En una modalidad, el trastorno es un trastorno proliferativo, por ejemplo, un tumor o neoplasma. En una modalidad, el tumor se selecciona a partir de cáncer de vejiga transicional, cáncer de ovario, y un liposarcoma. En una modalidad, el trastorno es síndrome de ovario

poliquístico (POS).

Trastornos Metabólicos

En un aspecto de la presente invención, se proporciona un método para tratar trastorno metabólico en un hospedero administrando una cantidad efectiva de un anticuerpo monoclonal anti-aP2 descrito en la presente. Un trastorno metabólico incluye un trastorno, enfermedad, o condición, la cual es causada o caracterizada por un metabolismo anormal (es decir, los cambios químicos en células vivas por los cuales se proporciona energía para procesos y actividades vitales) en un sujeto. Los trastornos metabólicos incluyen enfermedades, trastornos, o condiciones asociadas con hiperglicemia o fenotipo o función de células adiposas aberrantes (por ejemplo, células adiposas blancas o marones). Los trastorno metabólicos pueden afectar negativamente las funciones celulares tales como proliferación celular, crecimiento, diferenciación, o migración, regulación celular de homeostasis, comunicación inter- o intra-celular; función tisular, tal como función hepática, función renal, o función del adiposito; respuestas sistémicas en un organismo, tal como respuestas hormonales (por ejemplo, respuesta a la insulina). Ejemplos de trastornos metabólicos incluyen obesidad, diabetes, hiperfagia, anormalidades endócrinas, enfermedad de almacenamiento de triglicéridos, síndrome Bardet-Biedl,

síndrome Laurance-Moon, síndrome Prader-Labhart-Willi, y trastornos del metabolismo lípido.

Diabetes

La diabetes melitus es la enfermedad metabólica más común alrededor del mundo. Cada día, 1700 nuevos casos de diabetes son diagnosticados en los Estados Unidos, y al menos un tercio de los 16 millones de Americanos con diabetes no lo saben. La diabetes es la causa conducente de ceguera, insuficiencia renal, y amputaciones de extremidades inferiores en adultos y es un factor de riesgo mayor para enfermedad cardiovascular y apoplejíca.

En un aspecto de la presente invención, se proporciona un método para tratar diabetes administrando a un hospedero una cantidad efectiva de un anticuerpo monoclonal anti-aP2 descrito en la presente. En una modalidad, el trastorno es diabetes Tipo I. En una modalidad, el trastorno es diabetes Tipo II.

La diabetes Tipo I resulta de la destrucción autoinmune de células beta pancreáticas causando deficiencia de insulina. La diabetes mellitus no dependiente de la insulina o Tipo II (NIDDM) representa >90% de los casos y es caracterizada por una resistencia a la acción de la insulina en la absorción de glucosa en tejidos periféricos, especialmente músculo esqueleto y adipocitos, acción de insulina alterada para inhibir la producción de glucosa

hepática, y secreción de insulina mal regulada.

En una modalidad de la presente invención, se proporciona en la presente un método para tratar diabetes Tipo I en un hospedero administrando al hospedero una cantidad efectiva de un anticuerpo monoclonal anti-aP2 descrito en la presente en combinación o alteración con insulina. En una modalidad de la presente invención, se proporciona en la presente un método para tratar diabetes Tipo I en un hospedero administrando al hospedero una cantidad efectiva de un anticuerpo monoclonal anti-aP2 descrito en la presente en combinación o alteración con un análogo de insulina sintético.

Algunas personas quienes tienen diabetes Tipo II pueden lograr sus niveles de azúcar en sangre objetivo con dieta y ejercicio solo, pero muchos también necesitan medicaciones para diabetes o terapia de insulina. En una modalidad de la presente invención, se proporciona en la presente un método para tratar diabetes Tipo II en un hospedero administrando al hospedero una cantidad efectiva de un anticuerpo monoclonal anti-aP2 descrito en la presente en combinación o alteración con un compuesto seleccionado a partir de metformina (Glucofago, Glumetza); sulfonilureas, que incluyen gliburida (DiaBeta, GlinasA), glipizida (Glucotrol) y glimepirida (Amarilo); Meglitinidas, por ejemplo repaglinida (Prandina) y nateglinida (Starlix);

tiazolidindionas, por ejemplo rosiglitazona (Avandia) y pioglitazona (Actos); inhibidores de DPP-4, por ejemplo, sitagliptina (Januvia), saxagliptina (Ongliza) y linagliptina (Tradjenta); agonistas del receptor GLP-1, por ejemplo Exenátida (Byetta) y liraglutida (Victoza); inhibidores de SGLT2, por ejemplo canagliflozina (Invokana) y dapagliflozina (Farxiga); o terapia de insulina. Ejemplos no limitantes de insulina incluyen Insulina glulisina (Apidra); Insulina lispro (Humalog); Insulina aspart (Novolog); Insulina glargina (Lantus); Insulina detemir (Levemir); Insulina isofano (Humulin N, Novolin N).

En una modalidad, se proporciona en la presente un método para tratar una enfermedad o condición asociada con diabetes administrando a un hospedero una cantidad efectiva de un anticuerpo monoclonal anti-aP2 descrito en la presente. Las enfermedades y condiciones asociadas con diabetes mellitus pueden incluir, pero no se restringen a, hiperglicemia, hiperinsulinemia, hiperlipidemia, resistencia a la insulina, metabolismo de glucosa alterada, obesidad, retinopatía diabética, degeneración macular, cataratas, nefropatía diabética, glomeruloesclerosis, neuropatía diabética, disfunción eréctil, síndrome premenstrual, restenosis vascular y colitis ulcerativa. Además, las condiciones y enfermedades asociadas con la diabetes mellitus comprenden, pero no se restringen a: enfermedad cardiaca

coronaria, hipertensión, angina de pecho, infarto al miocardio, apoplejía, trastornos del tejido conectivo y piel, ulceraciones del pie, acidosis metabólica, artritis, osteoporosis y en condiciones particulares de tolerancia a la glucosa alterada.

Trastornos del Peso Corporal

En una modalidad de la presente invención, se proporciona un método para tratar obesidad en un hospedero administrando una cantidad efectiva de un anticuerpo monoclonal anti-aP2 descrito en la presente. La obesidad representa los trastornos más prevalentes de pesos corporales, afectando un estimado de 30 hasta 5% de la población de edad media en el mundo occidental.

En una modalidad de la presente invención, se proporciona un método para tratar obesidad en un hospedero administrando una cantidad efectiva de un anticuerpo monoclonal anti-aP2 o agente de unión al antígeno descrito en la presente en combinación o alteración con un segundo agente terapéutico para tratar obesidad. Examples de tratamientos parr obesidad incluyen, pero no se limitan a fentermina, Belviq (lorcaserina), dietilpropiona, tartrato de fendimetrazina, Xenical (orlistat), Contrave, orlistat, metanfetamina, Desoxina, Didrex, Bontril PDM, Suprenza, benzfetamina, Qsymia (fentermina-topiramat), Regimex, naltrexona-bupropiona, Evekeo, lorcaserina, y sulfato de

amfetamina.

En una modalidad, se proporciona un método para reducir o inhibir la ganancia de peso en un hospedero administrando una cantidad efectiva de un anticuerpo monoclonal anti-aP2 o agente de unión al antígeno descritos en la presente.

Enfermedad de Hígado Hepático

Existe una necesidad de composiciones y métodos para el tratamiento y prevención del desarrollo de hígado graso y condiciones provenientes del hígado graso, tal como esteatohepatitis no alcohólica (NASH), inflamación del hígado, cirrosis, e insuficiencia hepática. En una modalidad de la presente invención, se proporciona un método para tratar enfermedad de hígado hepático en un hospedero administrando una cantidad efectiva de un anticuerpo monoclonal anti-aP2 o agente de unión como se describe en la presente.

En una modalidad, el anticuerpo monoclonal anti-aP2 o agente de unión al antígeno descrito en la presente es administrado en combinación o alteración con ácidos grasos omega-3 o agonistas de receptores activados con el proliferador de peroxisoma (PPARs).

Los ácidos grasos omega-3 se conocen por reducir los triglicéridos en suero inhibiendo el DGAT y mediante estimulación de peroxisomal y beta-oxidación mitocondrial.

Dos ácidos grasos omega-3, ácido eicosapentanoico (EPA) y ácido docosahexanoico (DHA), se han encontrado por tener alta afinidad para tanto PPAR-alfa y PPAR-gamma. Los aceites marinos, por ejemplo, aceites de pescado, son una buena fuente de EPA y DHA, los cuales se han encontrado por regular el metabolismo lípido. Los ácidos grasos omega-3 se han encontrado por tener efectos benéficos en los factores de riesgos para enfermedades cardiovasculares, especialmente hipertensión leve, hipertrigliceridosmia y en la actividad del complejo de fosfolípido del factor de coagulación VII. Los ácidos grasos omega-3 reducen los triglicéridos en suero, incrementado en colesterol de HDL en suero, presión sanguínea diastólica y sistólica inferior y la velocidad de pulso, y reducen la actividad del complejo de fosfolípido del factor de coagulación en sangre VII. Además, los ácidos grasos omega-3 parecen ser bien tolerados, sin dar origen a algunos efectos secundarios severos. Una de tal forma de ácido graso omega-3 es un concentrado de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, omega-3, de aceite de pescado que contiene DHA y EPA y es vendido bajo la marca comercial Omacor®. Tal forma de ácido graso omega-3 se describe, por ejemplo, en las Patentes Estadounidenses Nos. 5,502,077, 5,656,667 y 5,698,594, las descripciones de las cuales se incorporan en la presente por referencia.

Los receptores activados por el proliferador de

peroxisoma (PPARs) son miembros de los factores de transcripción activados por el ligando de la superfamilia del receptor de la hormona nuclear que están relacionados con receptores retinoides, esteroides y hormonas tiroideas. Existen tres distintos subtipos de PPAR que son los productos de diferentes genes y son comúnmente designados PPAR-alfa, PPAR-beta/delta (o solamente, delta) y PPAR-gamma. Las clases generales de agentes farmacológicos que estimulan la actividad peroxisomal, se conocen como agonistas PPAR, por ejemplo, agonistas PPAR-alfa, agonistas PPAR-gamma y agonistas PPAR-delta. Algunos agentes farmacológicos son combinaciones de PPAR agonistas, tales como agonistas alfa/gamma, etc., y algunos agentes farmacológicos tienen actividad agonista/antagonista dual. Los fibratos tales como fenofibrato, bezafibrato, clofibrate y gemfibrozilo, son agonistas PPAR-alfa y son usados en pacientes para reducir las lipoproteínas ricas en triglicéridos, para incrementar el HDL y reducir el LDL aterogénico-denso. Los fibratos son típicamente oralmente administrados a tales pacientes. El fenofibrato o 1-metiletiléter del ácido 2-[4-(4-clorobenzoil)fenoxi]-2-metil-propanoico, se ha conocido por muchos años como un principio medicinalmente activo debido a su eficacia en reducir los triglicéridos en sangre y niveles de colesterol.

Enfermedad Cardiovascular

En una modalidad de la presente invención, se proporciona un método para tratar una enfermedad cardiovascular en un hospedero administrando una cantidad efectiva de un anticuerpo monoclonal anti-aP2 descrito en la presente. Los anticuerpos anti-aP2 de la presente invención son útiles en la prevención, inhibición o reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares resultando de aterosclerosis, tales como isquemia cardiaca y/o cerebral, infarto al miocardio, angina, enfermedad vascular periférica y apoplejía.

En una modalidad, se proporciona un método for prevenir, inhibir o reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares que resultan de la aterosclerosis en un hospedero administrando al hospedero una cantidad efectiva de un anticuerpo monoclonal anti-aP2 descrito en la presente en combinación o alteración con un agente anti-aterosclerótico.

Ejemplos de agentes anti-ateroscleróticos incluyen, pero no se limitan a, inhibidores de HMG CoA reductasa, inhibidores de proteína de transferencia de triglicérido microsomal (MTP), derivados de ácido fíbrico, inhibidores de escualeno sintasa y otros agentes conocidos que reducen el colesterol, inhibidores de lipoxigenasa, inhibidores de ACAT, y agonistas duales α/γ PPAR como se describe en la presente

posteriormente.

El agente anti-aterosclerótico puede ser un inhibidor de HMG CoA reductasa, el cual incluye, pero no se limita a, mevastatina y compuestos relacionados como se describe en la Patente Estadounidense No. 3,983,140, lovastatina (mevinolina) y compuestos relacionados como se describe en la Patente Estadounidense No. 4,231,938, pravastatina y compuestos relacionados tal como se describe en la Patente Estadounidense No. 4,346,227, simvastatina y compuestos relacionados como se describe en las Patentes Estadounidenses Nos. 4,448,784 y 4,450,171, con pravastatina, lovastatina o simvastatina son preferidos. Otros inhibidores de HMG CoA reductasa, los cuales pueden ser empleados en la presente, incluyen, pero no se limitan a, fluvastatina, descrita en la Patente Estadounidense No. 5,354,772, cerivastatina descritas en las Patentes Estadounidenses Nos. 5,006,530 y 5,177,080, atorvastatina descritas en las Patentes Estadounidenses Nos. 4,681,893, 5,273,995, 5,385,929 y 5,686,104, análogos de pirazol de derivados de mevalonolactona como se describe en la Patente Estadounidense No. 4,613,610, análogos de indeno de derivados de mevalonolactona como se describe en la Solicitud de PCT WO 86/03488, 6-(2-(sustituido-pirrol-1-il)-alquil)piran-2-onas y derivados del mismo como se describe en la Patente Estadounidense No. 4,647,576, dicloroacetato de SC-45355

Searle (un derivado de ácido pentandioico 3-sustituido), análogos de imidazol de mevalonolactona como se describe en la solicitud de PCT WO 86/07054, derivados de ácido 3-carboxi-2-hidroxi-propan-fosfónico como se describe en la Patente Francesa No. 2,596,393, 2,3-pirrol disustituido, derivados de furano y tiofeno como se describe en la Solicitud de Patente Europea No. 0221025, análogos de naftilo de mevalonolactona como se describe en la Patente Estadounidense No. 4,686,237, octahidronaftalenos tal como se describe en la Patente Estadounidense No. 4,499,289, análogos ceto de mevinolina (lovastatina) como se describe en la Solicitud de Patente Europea No. 0142146A2, así como también otros inhibidores de HMG CoA reductasa conocidos. En adición, los compuestos de ácido fosfínico útiles en la inhibición de HMG CoA reductasa adecuados para uso en la presente, describen en el documento GB 2205837.

Los inhibidores de escualeno sintetasa adecuados para uso en la presente incluyen, pero no se limitan a, α-fosfono-sulfonatos descritos en la Patente Estadounidense No. 5,712,396, aquellos descritos por Biller et al, J. Med. Chem., 1988, Vol. 31, No. 10, pp 1869-1871, que incluyen isoprenoide (fosfinilmetil)fosfonatos así como también otros inhibidores de escualeno sintetasa como se describe en las Patentes Estadounidenses Nos. 4,871,721 y 4,924,024. En adición, otros inhibidores de escualeno sintetasa adecuados

para uso en la presente incluyen pirofosfatos de terpenoides descritos por P. Ortiz de Montellano et al, J. Med. Chem., 1977, 20, 243-249, el análogo A de farnesil difosfato y análogos de prescualeno pirofosfato (PSQ-PP) como se describe por Corey y Volante, J. Am. Chem. Soc., 1976, 98, 1291-1293, fosfinilfosfonatos reportados por McClard, R. W. et al, J.A.C.S., 1987, 109, 5544 y ciclopropanos reportados por Capson, T. L., PhD dissertation, Junio 1987, Dept. Med. Chem. U de Utah, resumen, Tabla de Contenidos, pp 16, 17, 40-43, 48-51, Sumario.

Otros fármacos que reducen el colesterol adecuados para uso en la presente incluyen, pero no se limitan a, agentes antihiperlipoproteinémicos tales como derivados de ácido fíbrico, tales como fenofibrato, gemfibrozilo, clofibrato, bezafibrato, ciprofibrato, clinofibrato y similares, probucol, y compuestos relacionados como se describen en las Patente Estadounidense No. 3,674,836, probucol y gemfibrozil siendo secuestrantes de ácido biliar preferidos tales como colestiramina, colestipol y DEAE-Sephadex (Secholex®, Polidexide®), así como también clofibrato, lipostabil (Rhone-Poulenc), Eisal E-5050 (un derivado de etanolamina N-sustituido, imanixii (HOE-402), tetrahidrolipstatina (THL), istigmastanilfosforilcolina (SPC, Roche), aminociclodextrina (Tanabe Seiyoku), Ajinomoto AJ-814 (derivado de azuleno), melinamida (Sumitomo), Sandoz 58-035.

American Cyanamid CL-277,082 y CL-283,546 (derivados de urea disustituidos), ácido nicotínico, acipimox, acifran, neomicina, ácido p-aminosalicílico, aspirina, derivados de poli(dialilmetilamina) tales como se describe en la Patente Estadounidense No. 4,759,923, amina cuaternaria poli(cloruro de dialilmetilarmonio) e ionenos tales como aquellos descritos en la Patente Estadounidense No. 4,027,009, y otros agentes reductores del colesterol en suero conocidos.

El agente antiaterosclerótico también puede ser un agonista dual α/γ PPAR tal como se describe por Murakami et al, "A Novel Insulin Sensitizer Acts As a Coligand for Peroxisome Proliferator—Activated Receptor Alpha (PPAR alpha) and PPAR gamma. Effect on PPAR alpha Activation on Abnormal Lipid Metabolism in Liver de Zucker Fatty Rats", Diabetes 47, 1841-1847 (1998).

El agente anti-aterosclerótico puede ser un inhibidor de ACAT tal como se describe en, "The ACAT inhibitor, Cl-1011 is effective in the prevention and regression of aortic fatty streak area in hamsters", Nicolosi et al, Atherosclerosis (Shannon, Irel). (1998), 137(1), 77-85; "The pharmacological profile de FCE 27677: a novel ACAT inhibitor con potent hypolipidemic activity mediated by selective suppression of the hepatic secretion de ApoB100-containing lipoprotein", Ghiselli, Giancarlo, Cardiovasc. Drug Rev. (1998), 16(1), 16-30; "RP 73163: a bioavailable

alkylsulfinyl-diphenylimidazole ACAT inhibitor", Smith, C., et al, Bioorg. Med. Chem. Lett. (1996), 6(1), 47-50; "ACAT inhibitors: physiologic mechanisms for hypolipidemic and anti-atherosclerotic activities in experimental animals", Krause et al, Editor(s): Ruffolo, Robert R., Jr.; Hollinger, Mannfred A., Inflammation: Mediators Pathways (1995), 173-98, Publisher: CRC, Boca Raton, Fla.; "ACAT inhibitors: potential anti-atherosclerotic agents", Sliskovic et al, Curr. Med. Chem. (1994), 1(3), 204-25; "Inhibitors of acyl-CoA:colesterol O-acyl transferase (ACAT) as hypocolesterolemic agents. 6. The first water-soluble ACAT inhibitor with lipid-regulating activity. Inhibitors de acyl-CoA:colesterol acyltransferase (ACAT). 7. Development of a series de substituted N-phenyl-N'-[(1-phenylcyclopentyl)methyl]ureas with enhanced hypocolesterolemic activity", Stout et al, Chemtracts: Org. Chem. (1995), 8(6), 359-62.

El otro agente anti-aterosclerótico también puede ser un inhibidor de lipoxigenasa que incluye un inhibidor de 15-lipoxigenasa (15-LO) tal como derivados de bencimidazol como se describe en el documento WO 97/12615, inhibidores de 15-LO como se describe en el documento WO 97/12613, isotiazolonas como se describe en el documento WO 96/38144, e inhibidores de 15-LO como se describe por Sendobry et al "Attenuation of diet-induced atherosclerosis in rabbits with

a highly selective 15-lipoxygenase inhibitor lacking significant antioxidant properties, Brit. J. Pharmacology (1997) 120, 1199-1206, y Cornicelli et al, "15-Lipoxygenase and its Inhibition: A Novel Therapeutic Target for Vascular Disease", Current Pharmaceutical Design, 1999, 5, 11-20.

En una modalidad, se proporciona en la presente un método para prevenir, atenuar o tratar un trastorno cardiovascular en un hospedero, en donde el hospedero es peri- o post-menopáusico. aP2 se conoce por incrementar en la mujer peri- y post-menopáusica, quién tiene una incidencia superior de enfermedad cardiovascular que la mujer pre-menopáusica. Por consiguiente, la administración de un anticuerpo monoclonal anti-aP2 o agente de unión al antígeno descrito en la presente puede ser usada para atenuar, prevenir o tratar una mujer peri- y post-menopáusica en riesgo de desarrollar, o quién ha desarrollado, enfermedad cardiovascular asociada con niveles elevados de aP2 de circulación.

Enfermedad Inflamatoria

Los anticuerpos y agentes de unión al antígeno anti-aP2 descritos en la presente pueden ser administrados para el tratamiento de un trastorno inflamatorio en un sujeto. La inflamación puede originarse como una respuesta a una lesión o estimulación anormal causada por un agente físico, químico, o biológico. Una reacción de inflamación

puede incluir las reacciones locales y resultar en cambios morfológicos, destrucción o remoción de material nocivo tal como un organismo infectivo, y respuestas que conducen a la reparación y manejo. El término "inflamatorio" cuando se usa con referencia a un trastorno se refiere a un proceso patológico, el cual es causado por, que resulta de, o que resula en inflamación que es inapropiada o la cual no se resuelve en la manera normal. Los trastornos inflamatorios pueden ser sistémicos o localizados a tejidos u órganos particulares.

La inflamación se conoce por ocurrir en muchos trastornos los cuales incluyen, pero no se limitan a: Respuesta Inflamatoria Sistémica (SIRS); Enfermedad de Alzheimer (y condiciones y síntomas asociados que incluyen: neuroinflamación crónica, activación glial; aumento de microglia; formación de placa neurítica; Esclerosis Lateral Amiotrófica (ALS), artritis (y condiciones y síntomas asociados que incluyen, pero no se limitan a: inflamación articular aguda, artritis inducida por antígeno, artritis asociada con tiroiditis linfocítica crónica, artritis inducida por colágeno, artritis juvenil, artritis reumatoide, osteoartritis, artritis inducida por estreptococos y pronóstico, espondiloartropatías, y artritis gotosa), asma (y condiciones y síntomas asociados, que incluyen: asma bronquial; enfermedad de las vías respiratorias obstructivas

crónicas, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, asma juvenil y asma ocupacional); enfermedades cardiovasculares (y condiciones y síntomas asociados, que incluyen aterosclerosis, miocarditis autoinmune, hipoxia cardiaca crónica, insuficiencia cardiaca congestiva, enfermedad de la arteria coronaria, cardiomiopatía y disfunción de células cardíacas, que incluyen: activación de células del músculo liso aórtico, apoptosis de células cardiacas e inmunomodulación de la función de células cardiacas); diabetes (y condiciones asociadas, que incluyen diabetes autoinmune, diabetes dependiente de la insulina (Tipo I), periodontitis diabética, retinopatía diabética, y nefropatía diabética); inflamaciones gastrointestinales (y síntomas y condiciones relacionadas, que incluyen enfermedad celiaca, osteopenia asociada, colitis crónica, enfermedad de Crohn, enfermedad inflamatoria intestinal y colitis ulcerativa); úlceras gástricas; inflamaciones hepáticas tales como hepatitis viral y otros tipos, cálculos biliares y fibrosis hepática; infección por HIV (y condiciones adociadas, que incluen respuestas degenerativas, respuestas neuorodegenerativas, y enfermedad de Hodgkin asociada con HIV); síndrome de Kawasaki (y enfermedades y condiciones asociadas, que incluyen síndromo de nodo linfático mococutáneo, linfadenopatía cervical, lesiones de la arteria coronaria, edema, fiebre, leucocitos incrementados, anemia

leve, desprendimiento de piel, erupción, enrojecimiento de la conjuntiva, trombocitosis); nefropatías (y enfermedades y condiciones asociadas, que incluyen nefropatía diabética, enfermedad renal de etapa final, glomerulonefritis crónica, nefritis intersticial aguda y crónica, nefritis por lupus, síndrome del Buen Pastor, supervivencia a hemodiálisis y lesión por reperfusión isquémica renal); enfermedades neurodegenerativas o condiciones neuropatológicas (y enfermedades y condiciones asociadas, que incluyen neurodegeneración aguda, inducción de IL-I en envejecimiento y enfermedad neurodegenerativa, plasticidad inducida por IL-1 de neuronas hipotalámicas e hipersensibilidad por estrés crónico, mielopatía); oftalmopatías (y enfermedades y condiciones asociados, que incluyen retinopatía diabética, oftalmología de Graves, inflamación asociada con lesión o infección de la córnea que incluye ulceración de la córnea, y uveítis), osteoporosis (y enfermedades y condiciones asociadas, que incluyen alveolar, femoral, radial, vertebral o périda de hueso de la muñeca o incidencia de fractura, pérdida ósea postmenopáusica, incidencia de fractura o índice de pérdida ósea); otitis media (adulta o pediátrica); pancreatitis o acinitis pancreática; enfermedad periodontal (y enfermedades y condiciones asociadas, que incluyen adulto, comienzo temprano y diabético); enfermedades pulmonares, que incluyen enfermedad pulmonar, sinusitis crónica, enfermedad

de la membrana hialina, hipoxia y enfermedad pulmonar en SIDS; restenosis de injertos vasculares coronarios u otros; reumatimo que incluye artritis reumatoide, cuerpos Aschoff reumáticos, enfermedades reumáticas y miocarditis reumática; tiroiditis que incluye tiroiditis linfocítica crónica; infecciones del tracto urinario que incluyen prostatitis crónica, síndrome de dolor pélvico crónico y urolitiasis; trastornos inmunológicos, que incluyen enfermedades autoinmunes, tales como alopecia aereata, miocarditis autoinmune, enfermedad de Graves, oftalmología de Graves, esclerosis por liquen, esclerosis múltiple, psoriasis, lupus eritematoso sistémico, esclerosis sistémica, enfermedad tiroidea (por ejemplo, goitre y estroma linfomatosa (tiroiditis de Hashimoto, goitre linfadenoide); lesión pulmonar (lesión pulmonar hemorrágica aguda, síndrome del Buen Pastor, reperfusión isquémica aguda), disfunción miocardial, causada por contaminantes ambientales y de ocupación (por ejemplo, susceptibilidad a silicosis del síndrome de aceite tóxico), trauma por radiación, y eficiencia de respuestas de cicatrización de heridas (por ejemplo, heridas térmicas o quemadura, heridas crónicas, heridas quirúrgicas y lesiones de la médula espinal), septicemia, respuesta de fase aguda (por ejemplo, respuesta febril), respuesta inflamatoria general, respuesta de angusta respiratoria aguda, respuesta inflamatoria sistémica aguda,

cicatrización de heridas, adhesión, respuesta inmuno-inflamatoria, respuesta neuroendócrina, desarrollo de fiebre y resistencia, respuesta de fase aguda, respuesta al estrés, susceptibilidad a la enfermedad, estrés por movimiento repetitivo, codo de tenista, y respuesta y manejo del dolor.

En una modalidad de la presente invención, se proporciona en la presente un método para tratar diabetes Tipo I en un hospedero administrando al hospedero una cantidad efectiva de un anticuerpo monoclonal anti-aP2 descrito en la presente en combinación o alteración con un agente anti-inflamatorio. El agente anti-inflamatorio puede ser un agente anti-inflamatorio esteroideo, un agente anti-inflamatorio no esteroideo, o una combinación de los mismos. En algunas modalidades, los fármacos anti-inflamatorios incluyen, pero no se limitan a, alclofenac, dipropionato de alclometasona, algestona acetónido alfa amilasa, amcinafal, amcinafida, amfenac sodium, clorhidrato de amiprilosa, anacinra, anirolac, anitrazafeno, apazona, balsalazida disódica, bendazac, benoxaprofeno, clorhidrato de bencidamina, bromelaínas, broperamol, budesónida, carprofeno, cicloprofeno, cintazona, cliprofeno, propionato de clobetasol, butirato de clobetasona, clopirac, propionato de cloticasona, acetato de cormetasona, cortodoxona, deflazacort, desónido, desoximetasona, dipropionato de

dexametasona, diclofenac potásico, diclofenaco sódico, acetato de diflorasona, diflumidona sódica, diflunisal, difluprednato, diftalona, sulfóxido de dimetilo, drocinónido, endrisona, enlimomab, enolicam sódico, etodolac, etofenamato, felbinac, fenamol, fenbufeno, fenclofenaco, fenclorac, fendosal, fenpipalona, fentiazac, flazalona, fluazacort, ácido flufenámico, flumizol, acetato de flunisólido, flunixina, flunixina meglumina, butil fluocortina, acetato de fluorometolona, flucuazona, flurbiprofeno, fluretofeno, propionato de fluticasona, furaprofeno, furobufeno, halcinónido, propionato de halobetasol, acetato de halopredona, ibufenac, ibuprofeno, ibuprofeno de aluminio, ibuprofeno piconol, ilonidap, indometacina, indometacina sódico, indoprofeno, indoxol, intrazol, acetato de isoflupredona, isoxepac, isoxicam, cetoprofeno, clorhidrato de lofemizol, lomoxicam, etabonato de loteprednol, meclofenamato sódico, ácido meclofenámico, dibutirato de meclorisona, ácido fenámico, mesalamina, meseclazona, suleptanato de metilprednisolona, morniflumato, nabumetona, naproxeno, naproxeno sódico, naproxol, nimazona, olsalazina sódica, orgoteína, orpanoxina, oxaprozina, oxifenbutazona, clorhidrato de paranilina, polisulfato sódico de pentosan, glucerato sódico de fenbutazona, pirfenidona, piroxicam, cinamato de piroxicam, olamina de piroxicam, pirprofeno, prednazato, prifelona, ácido prodólico, procuazona, proxazol,

citrato de proxazol, rimexolona, romazarit, salcolex, salnacedina, salsalato, clorhidrato de sanguinario, seclazona, sermetacina, sudoxicam, sulindac, suprofeno, talmetacina, talniflumato, talosalato, tebufelona, tenidap, tenidap sódica, tenoxicam, tesicam, tesimida, tetridamina, tiopinac, pivalato de tixocortol, tolmetina, tolmetina sódica, triflumidato triclónido, zidometacina, zomepirac sódico, aspirina (ácido acetil salicílico), ácido salicílico, corticosteroides, glucocorticoides, tacrólimo, pimecorlimo, profármacos de los mismos, co-fármacos de los mismos, y combinaciones de los mismos.

Cánceres

La invención proporciona además un método para administrar un anticuerpo anti-aP2 o agente de unión al antígeno descrito en la presente para tratar cáncer. En una modalidad, el cáncer se selecciona a partir de liposarcoma, tumor muleriano mesenteral mezclado, schwannoma espinal, cáncer de vesícula biliar, cáncer de próstata, astrocitoma cerebral, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de vejiga, cáncer de colon, cáncer esofageal, cáncer de mama post-menopáusico, cáncer endometrial, cáncer renal, cáncer hepático, y cáncer pancreático.

En una modalidad de la presente invención, se proporciona un método para tratar un trastorno proliferativo, por ejemplo, un tumor o neoplasma, en un hospedero

administrando una cantidad efectiva de un anticuerpo monoclonal anti-aP2 o agente de unión al antígeno descrito en la presente. En una modalidad, el tumor se selecciona a partir de cáncer de vejiga transicional, cáncer de ovario, y un liposarcoma.

En una modalidad, el cáncer es cáncer de vejiga. En una modalidad el cáncer es carcinoma de células transicionales de la vejiga. En una modalidad de la presente invención, se proporciona en la presente un método para tratar cáncer de vejiga en un hospedero administrando al hospedero una cantidad efectiva de un anticuerpo monoclonal anti-aP2 o agente de unión al antígeno descrito en la presente.

En una modalidad de la presente invención, se proporciona un método para tratar cáncer de vejiga en un hospedero administrando una cantidad efectiva de un anticuerpo monoclonal anti-aP2 o agente de unión al antígeno descrito en la presente en combinación o alteración con un agente quimioterapéutico adicional. Agentes quimioterapéuticos adicionales para el tratamiento de cáncer de vejiga incluyen, pero no se limitan a, metotrexato, vinblastina, doxorubicina, cisplatino, gemcitabina, carboplatino, paclitaxel, y epirubicina.

En una modalidad el cáncer es cáncer de ovario. En una modalidad de la presente invención, se proporciona en la

presente un método para tratar cáncer de ovario en un hospedero administrando al hospedero una cantidad efectiva de un anticuerpo monoclonal anti-aP2 o an agente de unión al antígeno descrito en la presente.

En una modalidad de la presente invención, se proporciona un método para tratar cáncer de ovario en un hospedero administrando una cantidad efectiva de un anticuerpo monoclonal anti-aP2 descrito en la presente en combinación o alteración con un agente quimioterapéutico adicional. Agentes quimioterapéuticos adicionales para el tratamiento de cáncer de ovario incluyen, pero no se limitan a, cisplatino, carboplatino, paclitaxel, docetaxel, paclitaxel unido a albúmina, altretamina, capecitabina, ciclofosfamida, etopósido, gemcitabina, ifosfamida, irinotecano, doxorubicina liposomal, melfalano, pemetrexed, topotecano, y vinorelbina.

En una modalidad de la presente invención, se proporciona en la presente un método para tratar liposarcoma en un hospedero administrando una cantidad efectiva de un anticuerpo monoclonal anti-aP2 o agente de unión al antígeno descrito en la presente. En una modalidad, el liposarcoma es liposarcoma bien diferenciado, liposarcoma mixoide, liposarcoma pleomórfico, o liposarcoma desdiferenciado. En una modalidad, se proporciona en la presente un método para tratar un sarcoma, por ejemplo, pero no limitado a, un

histiocitoma fibroso, sarcoma sinovial, o leiomiosarcoma. En una modalidad, el anticuerpo monoclonal anti-aP2 o agente de unión al antígeno es administrado en combinación con un agente quimioterapéutico y/o agente radiativo.

En una modalidad, el neoplasma es un lipoma benigno, por ejemplo, un adenolipoma, angiolipoleiomioma, angiolipoma, ángulo pontino cerebelar y lipoma de canal auditivo interno, lipoma condroide, lipoma de cuerpo calloso, hibernoma, lipoma de células huso intradermales, fibrolipoma neural, lipoma pelomórfico, lipoma de células huso, y lipoma subcutáneo superficial.

Métodos para Atenuar la Severidad de un Trastorno Mediado por aP2

Se proporciona un método para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno causado por un nivel aberrante de aP2 en un hospedero, típicamente un humano, administrando al hospedero una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo monoclonal o agente de unión al antígeno como se describe en la presente. El anticuerpo monoclonal o fragmento es administrado a una dosis suficiente para inhibir o reducir la actividad biológica de aP2 ya sea parcialmente o completamente.

En un aspecto, se proporciona un método para prevenir o atenuar la severidad de un trastorno mediado por aP2 en un hospedero administrando una cantidad efectiva de un

anticuerpo monoclonal anti-aP2 descrito en la presente, resultando en reducción o atenuación de la actividad biológica de aP2 secretada, y una reducción en los efectos fisiológicos asociados de niveles elevado en suero aP2, por ejemplo, una reducción en el colesterol total, lipoproteína de alta densidad (HDL), lipoproteína de baja densidad (LDL), lipoproteína de muy baja densidad (VLDL), y/o triglicéridos, niveles de glucosa en sangre en ayunas, niveles de masa grasa, producción de glucosa hepática, lipólisis de células grasas, hiperinsulinemia, y/o esteatosis hepática. En una modalidad, la atenuación de la actividad biológica de aP2 secretada resulta en un incremento en la sensibilidad de la insulina, metabolismo de glucosa, y/o la prevención de la muerte de células β de isletas, disfunción, o pérdida.

En un aspecto de la presente invención, se proporciona un método para reducir el colesterol total en un hospedero administrando una cantidad efectiva de un anticuerpo monoclonal anti-aP2 o agente de unión al antígeno como se describe en la presente. En una modalidad, se proporciona en la presente un método para reducir el colesterol total, lipoproteína de alta densidad (HDL), lipoproteína de baja densidad (LDL), lipoproteína de muy baja densidad (VLDL), y/o triglicéridos en un hospedero administrando una cantidad efectiva de un anticuerpo monoclonal anti-aP2 descrito en la presente.

En otros aspectos de la presente invención, se proporcionan métodos para:

reducir los niveles de glucosa en sangre en ayunas;

reducir los niveles de masa grasa;

reducir la producción de glucosa hepática;

reducir la lipólisis de células grasas;

reducir la hiperinsulinemia;

reducir la esteatosis hepática;

incrementar el metabolismo de glucosa;

incrementar la sensibilidad a la insulina;

prevenir la muerte, disfunción o pérdida de células β; y/o

determinar los niveles de circulación de aP2 secretados en un hospedero;

que comprende administrar una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-aP2 o agente de unión al antígeno descrito en la presente a un hospedero, típicamente un humano, en necesidad del mismo.

Ejemplos

La chaperona lípida aP2/FABP4 ha sido implicada en la patología de muchas enfermedades inmunometabólicas, tales como diabetes y aterosclerosis. Mientras múltiples líneas de evidencia también soportan su involucramiento en la enfermedad humana, no se ha realizado aún el objetivo a aP2 para aplicaciones terapéuticas. Estudios recientes han

mostrado que aP2 no es simplemente una proteína intracelular, sino también un adipocina activa que contribuye a hiperglicemia promoviendo la gluconeogénesis hepática e interfiriendo con la acción de la insulina periférica. Los niveles de aP2 en suero son marcadamente elevados en obesidad humana y de ratón, y se correlacionan fuertemente con complicaciones metabólicas. Como una modalidad ilustrativa, se describe un anticuerpo monoclonal anti-aP2 de baja finidad de unión a CA33, un anticuerpo monoclonal anti-aP2 híbrido de conejo-ratón, el cual incluye 909 VH de Conejo (Seq. ID No. 454) y 909 VL (Seq. ID No. 445), que reduce los niveles de glucosa en sangre en ayunas, mejora el metabolismo de glucosa sistémica, incrementa la sensibilidad a la insulina sistémica y reduce la esteatosis hepática y masa grasa en ratones obesos. Se examinó la estructura del complejo aP2-CA33 y el epítopo objetivo se resolvió por estudios cristalográficos en comparación con otro anticuerpo monoclonal que carece de la eficacia *in vivo* (anticuerpo monoclonal anti-aP2 H3). En estudios de pinzamiento hiperinsulinémico-euglucémico, el efecto anti-diabético de CA33 fue predominantemente ligado a la regulación del rendimiento de glucosa hepática y utilización de glucosa periférica. De manera importante, este anticuerpo no presenta efectos biológicos en ratones deficientes de aP2, demostrando su especificidad objetivo.

Ejemplo 1: Preparación de un anticuerpo monoclonal

ilustrativo dirigido a aP2 secretado

Animales

Se realizaron procedimientos experimentales y para el cuidado animal con aprobación del comité para el cuidado animal de la Harvard University. Ratones macho (deficientes de leptina (ob/ob) y ratones obesos inducidos por dieta (DIO) con antecedente C57BL/6J) se adquirieron de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) y se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas. Los ratones DIO con antecedente C57BL/6J se mantuvieron en dieta alta en grasa (60% de kcal de grasa, Research Diets, Inc., D12492i) por 12 hasta 15 semanas antes de iniciar el tratamiento excpeto en estudios de pinzamiento, por los cuales estuvieron en HFD por 20 semanas. Los ratones deficientes en leptina (ob/ob) se mantuvieron en dieta de alimento regular (RD, PicoLab 5058 Lab Diet). Los animales usados fueron de 18 a 31 semanas de edad para modelos de dieta y 9 hasta 12 semanas de edad para el modelo ob/ob. En todos los experimentos, se usaron al menos 7 ratones en cada grupo, a menos que se declare de otro modo en el texto. Los ratones fueron tratados con 150 µl de PBS (vehículo) o 1.5 mg/ratón de anticuerpo monoclonal anti-aP2 (~33 mg/kg) en 150 µl de PBS por inyecciones subcutáneas dos veces a la semana por 3 a 5 semanas (Figura 1B). Antes y después del tratamiento, se recolectaron muestras de sangre a partir de la cola después de 6 horas de retiro de alimento

durante el día. Los pesos corporales se midieron semanalmente en el estado alimentado. Los niveles de glucosa en sangre se midieron semanalmente después de 6 horas de retiro de alimento o después de 16 horas de ayuno durante la noche. Después de 2 semanas de tratamiento, se realizaron pruebas de tolerancia a la glucosa por inyecciones de glucosa intraperitoneal (0.75 g/kg para DIO, 0.5 g/kg para ratones ob/ob). Después de 3 semanas de tratamiento, se realizaron pruebas de tolerancia a la insulina en ratones DIO por inyecciones de insulina intraperitoneal (0.75 IU/kg). Después de 5 semanas de tratamiento, se realizaron experimentos de pinzamiento hiperinsulinémico-euglucémico en ratones DIO como se describe previamente (Furuhashi et al., (2007) Nature 447, 959-965; Maeda et al., (2005) Cell metabolism 1, 107-119).

Se realizaron mediciones de jaula metabólica (Oxymax, Columbus Instruments) y mediciones de grasa corporal total por absorpciometría de rayos-X de energía dual (DEXA;PIXImus) como se describe previamente (Furuhashi et al., (2007) Nature 447, 959-965).

Producción y administración de anticuerpos anti-aP2

Se produjeron CA13, CA15, CA23 y CA33 (Ab 909 de conejo) y se purificaron por UCB. Se inmunizaron conejos Blancos New Zealand con una mezcla que contiene recombinante contra aP2 humana y de ratón (generada en casa en *E. coli*:números de acceso CAG33184.1 y CAJ18597.1,

respectivamente). Se recolectaron esplenocitos, células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) y médula ósea, a partir de conejos inmunizados y se almacenaron subsecuentemente a – 80°C. Cultivos de células B a partir de animales inmunizados se prepararon usando un método similar a aquel descrito por Zubler et al., ("Mutant EL-4 thymoma cells polyclonally activate murine and human B cells via direct cell interaction", J Immunol 134, 3662-3668 (1985)). Después de una incubación de 7 días, cavidaes que contienen anticuerpo específico del antígeno se identificaron usando un ensayo inmunosorbente ligado a la fluorescencia homogénea con aP2 humana o de ratón biotinilada inmovilizada eln perlillas de Superavidin™ (Bangs Laboratories) y un conjugado Cy-5 específico de Fcγ IgG anti-conejo de cabra (Jackson ImmunoResearch). Para identificar, aislar y recuperar las células B específicas del antígeno a partir de las cavidades de interés, se usó el método foci fluorescente (Clargo et al., (2014) mAbs 6, 143-159). Este método involucra recolectar células B a partir de una cavidad positiva y mezclar con perlillas de estreptavidina paramagnéticas (New England Biolabs) recubiertas con aP2 humana y de ratón biotinilada y conjugado FITC específico del fragmento Fc anti-conejo y de cabra (Jackson ImmunoResearch). Después de la incubación estática a 37°C por 1 h, las células B específicas del antígeno podrían ser identificadas debido a

la presencia de un halo fluorescente que rodea tal células B. Las células B que secreta el anticuerpo específico del antígeno individual fueron observadas usando un microscopio Olympus IX70, y fueron escogidas con un micromanipulador Eppendorf y se depositaron en un tubo de PCR. Los genes de la región variable a partir de estas células B únicas fueron recuperados por RT-PCR, usando cebadores que fueron específicos a regiones variables de cadena pesada y ligera. Se realizaron dos rondas de PCR, con la PCR a 2° anidada que incorpora sitios de restricción en los extremos 3′ y 5′ permitiendo la clonación de la región variable en una variedad de vectores de expresión; IgG γ1 de ratón, Fab de ratón, IgG γ1 de conejo (VH) o kappa de ratón y kappa de conejo (VL). Los constructos de cadena ligera y pesada fueron transfectados en células HEK-293 usando Fectina 293 (Invitrogen) y anticuerpo recombinante expresado en placas de 6 cavidades. Después de la expresión de 5 días, los sobrenadante se recolectaron y el anticuerpo se sometió a selección adicional por análisis de interacción biomolecular usando el sistema BiaCore para determinar la afinidad y epítopo binario.

Se produjo el aticuerpo monoclonal anti-aP2 de ratón H3 se produjo por la Instalación Central de Anticuerpo del Instituto del Cáncer Dana Farber. Ratones hembra C57BL/6 aP2-/-, de 4-6 semanas de edad, se inmunizaron por inyección

de aP2/FABP4-Gst humana de longitud completa, la proteína recombinante se suspendió en salina amortiguada de fosfato Dulbecco (PBS; GIBCO, Grand Island, NY) y se emulsificó con un volumen igual de adyuvante Freund completo (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Se recolectaron bazos de ratones inmunizados y se prepararon suspensiones celulares y se lavaron con PBS. Las células del bazo fueron contadas y mezcladas con células de mieloma SP 2/0 (ATCC No. CRL8-006, Rockville, MD) que son incapaces de secretar ya sea inmunoglobulinas de cadena ligera o pesada (Kearney et al., (1979) Journal de Immunology 123, 1548-1550) a una relación de bazo:mieloma de 2:1. Las células se fusionaron con polietilenglicol 1450 (ATCC) en 12 placas de cultivo de tejido de 96 cavidades en medio de selección HAT de conformidad con procedimientos estándares (Kohler et al., (1975) Nature 256, 495-497). Entre 10 y 21 días después de la fusión, las colonias de hibridoma llegaron a ser visibles y los sobrenadantes de cultivo fueron recolectados después seleccionados por manchado western en estrep-His-aP2/FABP4-humana. Se hizo una selección secundaria de 17 cavidades positivas seleccionadas usando placas EIA de 96 cavidades de unión de alta proteína (Costar/Corning, Inc. Corning, NY) recubiertas con 50 µl/cavidad con una solución de 2 µg/ml (0.1 µg/cavidad) de estrep-His-aP2/FABP4-humana o una proteína Gst irrelevante e incubó durante la noche a 4°C.).

Los hibridomas positivos se subclonaron por dilución limitante y se seleccionaron por ELISA. Las fusiones de sobrenadante fueron isotipo con kit Isostrip (RocheDiagnostic Corp., Indianápolis, IN).

Se realizaron transfecciones temporales a gran escala usando la línea de células CHOSXE propietaria de UCB y plataforma de expresión de electroporación. Las cpelulas se mantuvieron en fase de crecimiento logarítmico en medio CDCHO (LifeTech) suplementado con 2mM de Glutamax a 140 rpm en una incubadora sacudidora (Kuhner AG, Birsfelden, Switzerland) suplementado con 8% de CO2 a 37°C. Previo a la transfección, los números de células y viabilidad se determinaron usando el contador celular CEDEX (Innovatis AG. Bielefeld, Germany) y $2x10^8$ células/ml fueron centrifugadas a 1400 rpm por 10 minutos. Las células de pelotilla fueron lavadas en amortiguador Hyclone MaxCyte (Thermo Scientific) y se centrifugaron nuevamente por unos 10 minutos adicionales y las pelotillas se re-suspendieron a $2x10^8$ células/ml en amortiguador fresco. El ADN del plásmido, se purificó usando QIAGEN Plasmid Plus Giga Kit®, después se agregó a 400 µg/ml. Después de la electroporación usando un instrumento de electroporación de flujo MAxcyte STX®, las células se transfirieron en medio ProCHO (Lonza) que contiene 2 mM de Glutamax y solución antimitótica de antibiótico y se cultivó en bolsa ondulada (Cell Bag, GE Healthcare) colocada en una

plataforma Bioreactor ajustada a 37°C y 5% de CO_2 con movimiento de onda inducido por balanceo a 25 rpm.

Veintucuatro horas post-transfección se agregó una alimentación por bolo, y la temperatura se redujo a 320C y se matuvo por la duración del periodo de cultivo (12-14 días). Al díuas 3, se agregaron 3 mM de butirato de sodio (sal sódica de ácido n-butírico, Sigma B-5887) al cultivo. Al día 14, los cultivos se centrifugaron por 30 minutos a 4000 rpm y los sobrenadante retenidos se filtraron a través de 0.22 µm de SARTO BRAN-P (Millipore) seguido por filtros de oro gamma de 0.22 µm. El CHOSXE recolectado que expresa el anticuerpo monoclonal de ratón (mAb) se acondicionó por la adición de NaCl (a 4M). La muestra se cargó en una columna empacada con proteína A MabSelect Sure (GE-healthcare) equilibrada con 0.1M de Glicina + 4M de NaCl pH8.5 a 15ml/min. La muestra se lavó con 0.1M de Glicina + 4M de NaCl a pH8.5 y se realizó una etapa de lavado adicional con 0.15M de Na2HPO4 pH 9. La absorbancia U.V. pico a A280nm se recolectó durante la elución de la columna usando 0.1M de amortiguador de lución de citrato de sodio a pH 3.4 y después se neutralizó a pH 7.4 por la adición de 2M de Tris-HCl pH 8.5. La combinación mAb de la proteína A entonces se concentró a un volumen adecuado usando un dispositivo de Filtración de Flujo Tangencial minisette antes de ser purificada en una columna de filtración en gel de grado preparativo HiLoad XK 50/60

Superdex 200 (GE-healthcare). Las fracciones recolectadas fueron entonces analizadas por técnica analítica de filtración en gel para pico de monómero y las fracciones de monómero limpias se combinaron como producto final. La muestra de producto final se caracterizó entonces por SDS-PAGE reducido y no reducido y filtración en gel analítica por comprobación de pureza final. La muestra también se probó y se encontró por ser negativa para endotoxina usando un método de ensayo LAL para mediciones de endotoxina. El amortiguador final para todos los mAbs probados fue PBS. Para análisis *in vivo*, los anticuerpos purificados se diluyeron en salina a 10 mg/ml e inyectaron a una dosis de 1.5 mg/ratón (33 mg/kg) en ratones ob/ob y WT en dieta alta en grasa.

Medición de afinidad de anticuerpo

La afinidad de la unión anti-aP2 a aP2 (generada recombinantemente en *E. coli* como se describe abajo) se determinó por análisis de interacción biomolecular, usando un sistema Biacore T200 (GE Healthcare). IgG anti-ratón de cabra del fragmento $F(ab')_2$ Affinipure, específico del fragmento Fc (Jackson ImmunoResearch Lab, Inc.) en amortiguador de 10 mM NaAc, pH 5, se inmovilizó en un Chip Sensor CM5 mediante química de acoplamiento amina a un nivel de captura entre 4500 - 6000 unidades de respuesta (RU) usando HBS-EP+ (GE Healthcare) como el amortiguador de corrida. El IgG anti-aP2 se diluyó entre 1-10 µg/ml en amortiguador de corrida. Se usó

una inyección de 60 s de IgG anti-aP2 a 10 µl/min para cpatura por el IgG anti-ratón inmovilizado, después Fc aP2 se tituló de 25 nM a 3.13 nM sobre el anti-aP2 capturado por 180 s a 30 µl/min seguido por disociación de 300 s. La superficie se regeneró por 2 x 60 s 40 mM de HCl y 1 x 30 s 5 mM de NaOH a 10 µl/min. Los datos fueron analizados usando sotware de evaluación Biacore T200 (versión 1.0) usando el modelo de unión 1:1 con Rmáx local. Para CA33, se usó inyección del anticuerpo 60 s a 10 µl/min para captura por el IgG anti-ratón inmovilizado, Fc aP2 después se tituló de 40 µM a 0.625 µM sobre el anti-aP2 capturado por 180 s a 30 µl/min seguido por disociación a 300 s. La superficie se regeneró por 1 x 60 s 40 mM de HCl, 1 x 30 s 5 mM de NaOH y 1 x 60 s 40 mM de HCl a 10 µl/min. Se usó ajuste de estado listo para determinar los valores de afinidad.

Bloqueo cruzado de anticuerpo

El ensayo se realizó inyectando aP2 de ratón en la presencia o ausencia de IgG anti-aP2 de ratón sobre IgG anti-aP2 de conejo capturado. Se realizó análisis de interacción biomolecular usando un Biacore T200 (GE Healthcare Bio-Sciences AB). Se captiraron sobrenadantes temporales IgG de conejo anti-aP2 en las superficies Fc anti-conejo inmovilizadas (un sobrenadante por celda de flujo)) usando una velocidad de flujo de 10 µl/min y una inyección de 60 s para dar niveles de respuesta anterior 200RU. Después, el aP2

de ratón a 100 nM, 0 nM o aP2 de ratón a 100 nM más IgG anti-aP2 de ratón a 500 nM se pasaron durante 120s seguido por 120s de disociación. Se regeneraron superficies con 2x 60 s de 40 mM de HCl y 1x 30 s de 5 mM de NaOH.

Reactividad cruzada de FABP

Las proteínas aP2 humanas recombinantes (generadas en UCB en *E. coli* (véase método abajo)), hFABP3 (Sino Biological Inc.) y hFABP5/hMal1 (Sino Biological Inc.) fueron biotiniladas en un exceso molar de 5 veces de EZ-Link® Sulfo-NHS-LC-Biotina (Thermo Fisher Scientific) y se purificaron de la biotina no unida usando una columna de desalación Zeba (Thermo Fisher Scientific). Todos los estudios de unión se realizaron a 25°C usando un sistema FortéBio Octet RED384 (Pall FortéBio Corp.). Después de una etapa de valor de referencia de 120 s en PBS que contiene 0.05% de Tween 20, pH7.4 (PBS-T), biosensores Dip y ReadTM de estreptavidina (SA) (Pall FortéBio Corp.) se cargaron con haP2 recombinante biotinilado, hFABP3 o hFABP5/hMal1 a 60 nM por 90 s. Después de una etapa de estabilización de 60 s en PBS-T, cada biosensor cargado con FABP se transfirió a una muestra de anticuerpo monoclonal a 800 nM y se midió la asociación por 5 minutos. Los biosensores entonces se transfirieron nuevamente a PBS-T por 5 minutos para medir la disociación. Se monitoreó la unión no específica de anticuerpos usando puntas de biosensor no cargadas. La unión de asociación máxima, es

decir, una vez que la señal ha sido estabilizada, menos la unión antecedente, se trazó para cada combinación de anticuerpo/FABP.

Expresión y purificación de aP2

cADN aP2 de ratón (o humano) optimizado para expresión en *E. coli* se adquirión de ADN 2.0 (Menlo Park, California) y se subclonó directamente en un vector pET28a modificado (Novagen) que contiene una etiqueta His 10 N-terminal en armazón seguido por un sitio de proteasa del Virus del Grabado del Tabaco (TEV). La proteína se expresó en la cepa de *E. coli* BL21DE3 y se purificó como sigue. Típicamente, las células fueron lisadas con un disruptor de células enfriado (Constant Systems Ltd.) en 50 ml de amortiguador de lisis (PBS (pH 7.4) que contiene 20 mM de imidazol) por litro de cultivo de *E. coli* suplementado con una tableta de cóctel inhibidor de proteasa completo, libre de EDTA (Roche, Burgess Hill). El lisado fue entonces clarificado por centrifugación a alta velocidad (60000 g, 30 minutos, 4°C). Se agregron 4 ml/perillas de Ni-NTA (Qiagen) por 1000 de lisado separado y se revolvieron por 1 h a 4°C. Las perlillas se empacaron en una columna Tri-Corn (GE Healthcare) unida a una AKTA FPLC (GE Life Sciences) y la proteína se eluyó en un amortiguador que contiene 250 mM de imidazol. Las fracciones que contienen la proteína de interés como se juzga por 4-12% de electroforesis de gel Bis/Tris

NuPage (Life Technologies Ltd.) se dializaron para remover el imidazol y se trataron con proteasa TEV a una relación de 1 mg por 100 mg de proteína. Después de incubación durante la noche a 4°C, la muestra se pasó nuevamente sobre las perlillas de Ni/NTA en la columna Tri-Corn. La proteína aP2 no etiquetada (es decir, escindida con TEV) no se une a las perlillas y se recolecó en la columna de flujo de paso. La proteína se concentró, y se cargó en una columna de filtración en gel S75 26/60 (GE healthcare) pre-equilibrada en PBS, 1 mM de DTT. Las fracciones pico fueron combinadas y concentradas a 5 mg/ml. Seis ml de esta proteína se extrajeron entonces y se precipitaron con acetonitrilo a una relación de 2:1 para remover algún lípido. Después de la centrifugación a 16000 g por 15mins, se removió el acetonitrilo + amortiguador para análisis del contenido lípido original. La pelotilla de la proteína desnaturalizada entonces se resuspendió en 6 ml de 6 M GuHCl PBS + 2 µMoles de ácido palmítico (relación 5:1 de ácido palmítico a aP2) y después se dializó dos veces contra 5L de PBS por 20hrs a 4°C para permitir el repliegue. Después de la centrifugación para remover el precipitado (16000 g, 15 minutos) la proteína se filtró en gel usando una columna S75 26/20 en PBS para remover el agregado. Las fracciones pico se combinaron y se concentraron a 13 mg/ml.

Cristalografía de aP2

aP2 de ratón purificado se formó en complejo con

CA33 y H3 Fab (generado en UCB por métodos convencionales) como sigue. El complejo se hizo mezlando 0.5 ml de aP2 a 13 mg/ml con ya sea 0.8 ml de CA33 Fab a 21.8 mg/ml o 1.26 ml de H3 Fab a 13.6 mg/ml (relación molar aP2:Fab de 1.2:1). Las proteínas se incubaron a TA por 30 minutos, después se corrieron en una columna de filtración en gel S75 16/60 (GE Healthcare) en 50 mM de Tris pH7.2, 150 mM de NaCl + 5% de glicerol. Las fracciones pico se combinaron y se concentraron a 10 mg/ml por cristalografía.

Los ensayos de cristalización de sentado-caída, se ajustaron usando kits de selección comercialmente disponibles (QIAGEN). Los cristales de calidad de difracción se obtuvieron directamente en selección de cristalización primaria sin alguna necesidad para optimizar las condiciones de cristalización. Para el complejo aP2/CA33, la solución de la cavidad contiene 0.1 M de Hepes a pH 7.5, 0.2 M de $(NH_4)_2SO_4$, 16% de PEG 4K y 10% de isopropanol. Para el complejo aP2/H3 la solución de cavidad contiene 0.1 M de MES pH5.5, 0.15 M de $(NH_4)_2SO_4$ y 24% de PEG 4K. Los datos se recolectaron en el Diamond Synchrotron en i02 (λ=0.97949) proporcionando una serie de datos 2.9 Å para aP2/CA33 y una serie de datos 2.3 Å para aP2/H3. Las estructuras se determinaron por reemplazo molecular usando Phaser (44) (CCP4) con modelos iniciadores de

dominio aP2 y Fab. Se encontraron dos complejos por estar en la unidad asimétrica para aP2/CA33 y una para aP2/H3. La construcción del modelo y ciclos de refinamiento se realizó usando CNS (Brunger et al., (2007) Nature Protocols 2, 2728-2733) y gallareta (Emsley et al., (2004) Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography 60, 2126-2132) (CCP4) hasta que todas las estadísticas de refinamiento convergen para ambos modelos. La información del epítopo descrita anteriormente se derivó considerando átomos dentro de la distancia 4Å en la superficie de contacto aP2/Fab. Las estadísticas de refinamiento y recolección de datos se muestran abajo. Los valores en paréntesis se refieren a la cubierta de alta resolución.

Estructura	aP2-CA33	aP2-H3
Grupo espacial	P 1 2_1 1	P 1 2_1 1
Dimensiones celulares		
a, *b*, *c* (Å)	65.27, 101.95, 95.31	71.50, 66.04, 75.68
A, β, γ (°)	90.00, 90.03, 90.00	90.00, 111.67, 90.00
Resolución (Å)	54.97 - 2.95 (3.09 - 2.95)	33.03 - 2.23 (2.37 - 2.23)
R_{sim} o R_{unido}	0.18 (1.169)	0.11 (0.352)
I / σI	8.3 (2.9)	6.8 (1.7)
Completo (%)	99.2 (98.9)	98.6 (98.4)
Redundancia	6.2(6.3)	2.6 (2.6)
Refinamiento		
Resolución (Å)	54.97 - 2.95	33.02 - 3.00
No. de reflexiones	24898	13077

$R_{trabajo}$ / R_{libre}	0.21/0.28	0.22/0.27
No. de átomos		
Proteína	8632	4331
Agua	0	0
B-factores		
aP2	(molécula 1) 58.3; (molécula 2) 64.6	27.5
Fab	(molécula 1) 52.9; (molécula 2) 52.5	22.5
R.m.s. deviaciones		
Longitudes de unión (Å)	0.009	0.011
Ángulos de unión (°)	1.42	1.67

Los valores en paréntesis se refieren a la cubierta de alta resolución.

R_{sim} = $\Sigma|(I - <I>)|/\Sigma(I)$, donde I es la intensidad integrada observada, <I> es la intensidad integrada promedio obtenida a partir de mediciones múltiples, y la sumá es sobre todas las reflexiones observadas. $R_{trabajo}$ = $\Sigma||F_{obs}| - k|F_{calc}||/\Sigma|F_{obs}|$, donde F_{obs} y F_{calc} son los factores de estructura observada y calculada, respectivamente. R_{libre} se calcula como $R_{trabajo}$ usando 5% de los datos de reflexión elegidos aleatoriamente y omitidos a partir de los cálculos de refinamiento. La información de epítopo se derivó considerando átomos dentro de una distancia 4Å en la

superficie de contacto aP2/Fab.

Análisis bioquímico hepático y estudios de pinzamiento hiperinsulinémico-euglucémico

Se realizaron pinzamientos hiperinsulinémico-euglucémicos por una modificación de un procedimiento reportado (Cao et al., (2013) Cell Metab. 17, 768-778). Específicamente, los ratones fueron sujetados después de 5 horas de ayuno y fueron infundidos con 5 mU/kg/min de insulina. Se recolectaron muestras de sangre a intervalos de 10 mintuos para la medición inmediata de concentración de gluocsa en plasma, y se infundió 25% de glucosa a velocidades variables para mantener la glucosa en plasma a concentraciones basales. Se estimó la disposición de glucosa de sangre completa del valor de referencia con una infusión continua de [3-3H]-glucosa (0.05 µCi/min). Esto se siguió por determinación de disposición de glucosa de sangre completa estimulada por insulina, de este modo, la [3-3H]-glucosa se infundió a 0.1 µCi/min.

Los lípidos totales en el hígado se extrajeron de conformidad con el protocolo Bligh-Dyer (Bligh et al., (1959) Canadian J. Biochem. y Phys. 37, 911-917), y un método colorimétrico se usó para la medición del contenido de triglucéridos por un kit comercial de conformidad con las instrucciones del fabricante (Sigma Aldrich). La actividad Pck1 de la enzima gluconeogénica se midió por una

modificación del método reportado (Petrescu et al., (1979) Analytical Biochem. 96, 279-281). La actividad de glucosa-6-fosfatasa (G6pc) se midió por una modificación del protocolo Sigma [EC 3.1.3.9]. Brevemente, los hígados fueron homogeneizados en amortiguador de lisis que contiene 250 mM de sacarosa, Tris HCl y EDTA. Los lisados fueron centrifugados a velocidad completa por 15 min y el sobrenadante (predominantemente citoplasma) se aisló. Después las fracciones de microsomas se aislaron por ultracentrifugación de las muestras citoplásmicas. Las concentraciones de proteína microsomal se midieron por kit BCA comercial (Thermo Scientific Pierce). 200 mM de glucosa-6-fosfato (Sigma Aldrich) se pre-incubó en Bis-Tris. 150 µg de la proteína microsomal o dilucións erial de G6Pase recombinante se agregaron e incubaron en tal solución por 20 min a 37°C. Después se agregó 20% de TCA, se mezcló e incubó por 5 min a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugaron a velocidad completa a 4°C por 10 min, y el sobrenadante se transfirió a una placa UV separada. Se agregó reactivo de color y la absorbancia a 660 nm se midió y normalizó a una curva estándar preparada con dilución serial de enzima glucosa-6-fosfatasa recombinante (G6pc).

ELISA de aP2 en plasma, mal1, FABP3, adiponectina, glucagón, e insulina

Se recolectó sangre a partir de ratones por

sangrado de la cola después de 6 horas de retiro de alimento durante el día o 16 horas de retiro de alimento durante la noche. Las muestras de sangre terminal se recolectaron por punción cardiaca o se recolectaron a partir de la vena de cola. Las muestras se centrifugaron en una microcentrífuga a 3,000 rpm por 15 minutos a 4°C. Se realizaron mediciones de aP2 en plasma (Biovendor R&D), mal1 (Circulex Mouse Mal1 ELISA, CycLex Co., Ltd., Japan), FABP3 (Hycult Biotech, Plymouth Meeting, PA) glucagón, adiponectina (Quantikine ELISA, R&D Systems, Minneapolis, MN), e insulina (ELISA ulstrasensible de ratón-insulina, Alpco Diagnostics, Salem, NH), de conformidad con las instrucciones del fabricante.

Análisis de PCR en tiempo real cuantitativo

Se recolectaron tejidos después de 6 horas de retiro de alimento durante el día, se congeló inmediatamente y se almacenó a -80°C. Se realizó aislamiento de ARN usando Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) de conformidad con el protocolo del fabricante. Para la primera síntesis de cADN de hebra, se usaron 0.5-1 ng de ARN y 5x de iScript RT Supermix (BioRad Laboratories, Herculus, CA). La PCR en tiempo real cuantitativo (Q-PCR) se realizó usando mezcla principal Power SYBR Green PCR (Applied Biosystems, Life Technologies, Grand Island, NY) y las muestras se analizaron usando una máquina de PCR ViiA7 PCR (Applied Biosystems, Life Technologies, Grand Island, NY). Los cebadores usados para Q-PCR fueron

como sigue:

36B4	5′- cactggtctaggacccgagaa-3′ Seq. ID No. 513; 5′-aggggagatgttcagcatgt-3′ Seq. ID No. 514
FAS	5′-ggaggtggtgatag ccggtat-3′ Seq. ID No. 515; 5′-tgggtaatccatagagcccag-3′ Seq. ID No. 516
SCD1	5′-ttcttgcgatacactctggtgc-3′ Seq. ID No. 517; 5′-cgggattgaatgttcttgtcgt- 3′ Seq. ID No. 518
Pck1	5′-ctgcataacggtctggacttc-3′ Seq. ID No. 519; 5′-cagcaactgcccgtactcc-3′ Seq. ID No. 520
G6pc	5′- cgactcgctatctccaagtga-3′ Seq. ID No. 521; 5′-gttgaaccagtctccgacca-3′ Seq. ID No. 522
ACC1	5′-atgtctggcttgcacctagta-3′ Seq. ID No. 523; 5′-ccccaaagcgagtaacaaattct -3′ Seq. ID No. 524
TNF	5′- ccctcacactcagatcatcttct-3′ Seq. ID No. 525; 5′-gctacgacgtgggcta cag-3′ Seq. ID No. 526
IL-1β	5′-gcaactgttcctgaactcaact- 3′ Seq. ID No. 527; 5′-atcttttggggtccgtcaact-3′ Seq. ID No. 528
IL-6	5′-acaacc acggccttccctactt-3′ Seq. ID No. 529; 5′-cacgatttcccagagaacatgtg-3′ Seq. ID No. 530
CCL2	5′- catccacgtgttggctca-3′ Seq. ID No. 531; 5′-gatcatcttgctggtgaatgagt-3′ Seq. ID No. 532
CXCL1	5′- gactccagccacactccaac-3′ Seq. ID No. 533; 5′-tgacagcgcagctcattg-3′ Seq. ID No. 534
F4/80	5′ – tgactcaccttgtggtcctaa – 3′ Seq. ID No. 535; 5′ - cttcccagaatccagtctttcc - 3′ Seq. ID No. 536
CD68	5′- tgtctgatcttgctaggaccg-3′ Seq. ID No. 537; 5′-gagagtaacggccttttgtga - 3′ Seq. ID No. 538
TBP	5' - agaacaatccagactagcagca - 3' Seq. ID No. 539; 5'-gggaacttcacatcacagctc - 3' Seq. ID No. 540

Análisis Estadístico

Los resultados son presentados como la media ± SEM. La significancia estadística se determinó por mediciones repetidas de ANOV o prueba t de student. * denota significancia a $p<0.05$, **denota significancia a $p<0.01$.

Desarrollo y cribado del anticuerpo monoclonal anti-aP2

La obesidad está asociada con niveles incrementados de aP2 circulante, lo cual contribuye a la elevación de producción de glucosa hepática y glucosa periférica reducida dispuesta y resistencia a la insulina, características de diabetes tipo 2. Por lo tanto, aP2 en suero neutralizante representa un procedimiento eficiente para tratar diabetes y posiblemente otros trastornos metabólicos.

Los anticuerpos monoclonales híbridos de ratón y conejo-ratón planteados contra los péptidos aP2 humano y de ratón se produce y criban usando un sistema Biacore demostrando un intervalo amplio de afinidades para estos anticuerpos, a partir del intervalo micromolar al nanomolar bajo (Figura 1A). Como una prueba inicial para los efectos potenciales de estos anticuerpos *in vivo*, los anticuerpos se administran subcutáneamente por 4 semanas a ratones con obesidad inducida con dieta alta en grasa (HFD) (Figura 1B). La alimentación HFD resulta en una elevación en niveles de insulina en suero durante el experimento, un efecto que fue mitigado por tratamiento con el anticuerpo de ratón H3 e invertido por el anticuerpo híbrido CA33, pero inalterado por los otros tres anticuerpos híbridos probados (Figura 1C). Interesantemente, el CA33 también disminuye significativamente más rápido que la glucosa en sangre

(Figura 1D), mientras los otros anticuerpos probados no mejoran la glicemia, indicando que el CA33 reduce la resistencia a la insulina asociada con HFD y mejora el metabolismo de glucosa. El mejoramiento sistémico en metabolismo de glucosa fue además verificado usando una prueba de tolerancia a la glucosa (GTT). La terapia con CA33 resulta en mejoramiento significante a la tolerancia a la glucosa (Figura 1E), mientras los otros anticuerpos no mejoran la tolerancia a la glucosa y las curvas de disposición de glucosa no son diferentes comparadas con el vehículo (Figura 7A). Además, solamente ele tratamiento con CA33 marcadamente mejoran la sensibilidad a insulina como se demuestra en las pruebas de tolerancia a la insulina, mientras otros anticuerpos probados son similares al vehículo (Figura 1F, Figura 7B). Este una reducción moderada en ganancia de peso en todos pero uno de los grupos tratados con el anticuerpo (CA15) (Figura 1G), aunque esto no se correlaciona con el mejoramiento en metabolismo de glucosa. Tomados juntos, estos resultados demuestran que el CA33 únicamente pose propiedades anti-diabéticas.

El CA33 es un anticuerpo de afinidad baja que neutraliza aP2

El CA33 se caracteriza adicionalmente para entender mejor sus propiedades terapéuticas. En ensayos de unión a octeto, todos los anticuerpos probados demuestran unión

saturable a aP2. Existe una interacción medible pero baja con la proteína FABP3 relacionada (~25% de la interacción aP2/FABP4), y solamente interacciones con Mal1/FABP5 que fue similar al IgG control (Figura 2A). Interesantemente, también se encontró que el mejoramiento en homeostasis de glucosa en ratones tratados con CA33 se relaciona a un efecto único de este anticuerpo en niveles de aP2 circulante. Después de 4 semanas de tratamiento, los ratones tratados con CA33 mantuvieron los niveles de aP2 circulante a un nivel similar a o ligeramente inferior que el que parece en los animales tratados con el control, mientras todos los otros anticuerpos que incluyen H3 resultaron en un dramático incremento de 10 veces en niveles de aP2 circulante (Figura 2B). En efecto, el aP2 circulante fue detectable por manchado western en ratones tanto de control como los tratados con CA33, pero fuertemente evidente en suero después del tratamiento con H3 (Figura 2B, inserto).

En experimentos de bloqueo cruzado para iniciar la caracterización de los sitios objetivo, se encontró que el CA33 de unión parcialmente bloqueado del anticuerpo de ratón inefectivo H3 a aP2, mientras H3 de unión fue completamente bloqueado por los anticuerpos híbridos CA13 y CA15 (Figura 2C). Estos datos sugieren que el epítopo reconocido por CA33 solamente parcialmente traslapado con los reconocidos por H3. En análisis adicional, la identificación del epítopo se basa

en experimentos de espectrometría de masa de intercambio hidrógeno-deuterio, por ejemplo, como se describe por Pandit et al. (2012) J. Mol. Recognit. Mar, 25(3): 114-24 (incorporado en la presente por referencia), la interacción indicada de CA33 primero con la hélice alfa y la primera lámina beta de aP2 en residuos 9-17, 20-28 y 118-132, los cuales parcialmente son traslapados con el epítopo identificado por H3 (Figura 2D). Para entender estos epítopos precisamente, cuando se co-cristalizan los fragmentos Fab de CA33 y H3 con aP2 (Figura 2E). Los analitos de los cristales mostraron que CA33 se une a un epítopo que se extiende sobre los elementos de estructura secundarios beta1 y beta10, y las regiones en espiral aleatorias unidas a alfa2 hasta beta2 y beta3 hasta beta4, e incluye los aminoácidos 57T, 38K, 11L, 12V, 10K y 130E de aP2 (Figura 2E). A pesar del bloqueo parcial de H3 por VA33, se observó que no existe de hecho traslape directo de sus epítopos. En lugar, el movimiento significante de la región alrededor de Phe58 de aP2 puede parcialmente bloquear la unión de un anticuerpo por el otro en los experimentos de competición. Además, la afinidad baja del Fab de CA33 puede ser explicada por la estructura de cristal. De manera inusual, solamente un aminoácido en la cadena pesada de CA33 se pone en contacto con aP2, y la mayoría de los contactos son a través de la cadena ligera (Figura 2E, 2F). En contraste, el contacto H3-aP2 es más

convencional, con ambas cadenas Fab que interactúa con aP2. La estructura también muestra que CA33 no se une a la "tapa" del barril β (148 a 37A), la cual ha sido postulada para controlar el acceso de lípidos al paquete de unión o la "bisagra" la cual contiene E15, N16 y F17. Además, se encontró que la unión del lípido (ácido paranárico) a aP2 no fue sustancialmente alterada por la presencia de CA33 (Figura 2G). H3 no se une directamente a la tapa" pero tiene unión de actividad limitada de CA33 a aP2 unido al lípido o aP2 libre de lípido también se examinó usando análisis bioquímico (Biacore). Como se observa en las Figuras 2H y 21, CA33 se une a tanto aP2 unido al lípido como a aP2 libre de lípido con las siguientes afinidades.

aP2 de Ratón	**KD**
Cargado de lípido	9.3 µM
Deslipidado	4.7 µM

Cumulativamente, estos resultados sugieren que la actividad de CA33 puede ser independiente de aP2 de unión al lípido.

Dado la afinidad relativamente baja de CA33 para aP2, se examinaron los efectos fuera de objetivo. Se probaron los efectos del tratamiento con CA33 en ratones aP2-/- alimentados un HFD. En estos experimentos, la terapia con

anticuerpo falló al inducir cualquier cambio en peso o glucosa alta en este modelo (Figura 3A, 3B). Además, el CA33 no afecta la tolerancia a la glucosa en ratones aP2-/- obesos (Figura 3C), claramente demuestra que los efectos del anticuerpo son debido a aP2 dirigido.

Finalmente, se examinó el efecto de CA33 en un segundo modelo de obesidad genética severa y resistencia a la insulina usando ratones ob/ob deficientes en leptina. Durante el curso de 3 semanas de tratamiento, tanto los grupos CA33 como los tratados con el vehículo ganando peso pero el grado fue menor que en el grupo tratado con CA33 (Figura 3D). Sorprendentemente, la hiperglicemia en ratones ob/ob fue normalizada en ratones tratados con CA33 comparado a los controles (Figura 3E). El grado de hiperinsulinemia fue también parcialmente reducido en animales tratados con CA33 (Figura 3F). Los niveles de glucosa normal e insulina baja sugieren metabolismo de glucosa mejorado en la neutralización de aP2. En efecto, siguiendo la administración de glucosa exógena, los ratones ob/ob tratados con CA33 también exhiben mejoramiento significante de tolerancia a la glucosa comparado a los ratones tratados con el vehículo a pesar de la presencia de obesidad masiva (Figura 3G). Estos datos subrayan la amplia aplicabilidad de la neutralización de aP2 a la enfermedad metabólica en modelos preclínicos independientes y son consistentes con los resultados

obtenidos en el contexto de obesidad dietética y genética.

El tratamiento con CA33 mejora el metabolismo de lípido e inhibe la hepatoesteatosis en ratones obesos

Habiendo identificado y físicamente caracterizado un anticuerpo monoclonal candidato que puede generar beneficios metabólicos, se realizaron estudios funcionales detallados en el modelo HFD. Para explorar adicionalmente los efectos metabólicos del tratamiento con CA33, se trataron ratones obesos inducidos con HFD con CA33 o el vehículo por cinco semanas y se examinaron los efectos en el hígado. Como se espera, la alimentación alta en grada por largo tiempo induce esteatosis y acumulación de triglicérido en ratones tratados con el vehículo, sin embargo, estos efectos son significativamente mejorados por tratamiento con CA33 (Figura 4A, B). Además, el mejoramiento en homeostasis de lípido en hígado fue acompañado por expresión hepática reducida de los genes claves involucrados en lipogénesis *de novo* (Figura 4C). De manera similar a la deficiencia de aP2 genética, los ratones tratados con CA33 tienen niveles de ácido graso libre de plasma moderadamente altos (Figura 4D) y niveles de glicerol bajos (Figura 4E). Los niveles de colesterol total también son bajos en el grupo tratado con CA33 (Figura 4F), a pesar que no existe diferencia significante en triglicéridos en plasma (Figura 4G). Notablemente, a pesar que la deficiencia de aP2 genética del cuerpo total completa está

asociada con una sobrerregulación sustancial de la expresión mal1 en tejido (FABP5/Mal1), no son detectados los cambios significantes en niveles de mal1 circulante en tratamiento con CA33 indicando carencia de cambios compensatorios (Figura 4H). Además, el tratamiento con CA33 no altera significativamente los niveles circulantes de proteína FABP3 (Figura 4H). También no existe alteración en los niveles de suero de glucagón o adipopectina en ratones tratados con CA33 (Figura 4I-J).

Efectos de tratamiento con CA33 en tejido adiposo y composición corporal

También se examinó el impacto del tratamiento con CA33 en tejido adiposo y composición corporal. Los barridos de absorciometría de rayos X de energía doble (DEXA) mostraron que la masa de grada significativamente se reduce con tratamiento de CA33 (Figura 5A), mientras la masa magra también se reduce ligeramente, esto igualmente refleja que la acumulación de lípido reducido en los órganos sólidos, especialmente hígado (Figura 4A, 4B). En efecto, el tratamiento con CA33 significativamente disminuye el peso de hígado, y esta reducción permanece significante cuando se expresa como porcentaje de peso corporal (Figura 5B). La disminución en peso corporal en ratones obesos tratados con CA33 es reminiscente del fenotipo de ratones con deficiencia de aP2 y combinada con la deficiencia de aP2/mal1 en HFD, y

surge la posibilidad de que la terapia de anticuerpo directamente altera los parámetros metabólicos. En análisis de jaula metabólica, la actividad física, ingesta de alimento y producción de calor son similares en ratones tratados con el vehículo y anticuerpo (Figura 5C, D).

CA33 puede incrementar la oxidación de ácido graso

Para mediciones metabólicas adicionales, se colocaron ratones obsesos alimentados con HFD en un calorímetro de circuito abierto (Oxymax System, Columbus Instruments). Se monitorearon las concentraciones de oxígeno y dióxido de carbono por volumen en las partes de entrada y salida de una cámara parcialmente sellada, mediante lo cual un flujo conocido de aire ambiental fue forzadamente ventilado. Se usó la diferencia de concentración media entre las partes para calcular el consumo de oxígeno (VG2) y producción de dióxido de carbono (VCO2) y para calcular la velocidad de intercambio respiratorio (VCO2/VO2). En análisis de jaula metabólica, los ratones obesos los cuales han sido alimentados con HFD y tratamiento con CA33 por ocho semanas mostraron utilización de VO2 incrementada comparada a ratones tratados con el vehículo (Figura 5E), resultando en una velocidad de intercambio respiratorio (RER) cercano a 0.7 (Figura 5F), sugiriendo que el anticuerpo incrementa la utilización del lípido.

El análisis histológico describió que, como se

espera, la alimentación con HFD prolongada resulta en acumulación de lípido abundante en tejido adiposo marrón (BAT). Sin embargo, el tratamiento con CA33 resultó en una disminución significante en peso del tejido BAT y dramáticamente disminuye el tamaño de gota del lípido (Figura 5G, 5H).

En general, los depósitos de tejido adiposo parecen similares entre los grupos tratados con anticuerpo y de control, a pesar que existe una disminución significante en el tamaño de la almohadilla de grasa perigonadal (PGWAT, Figura 5A-5P). El análisis de secciones teñidas con H&E de PGWAT describió un grado similar de infiltración de célula inflamatoria en ratones tratados con CA33 y vehículo (Figura 5J). De hecho, la infiltración de células FA/80 y mieloide positivas CD11b en preparaciones de tejido adiposo por análisis FACS indicando un número similar de estas células inmunes entre los grupos (Figura 5K, 5L). Además, no se observaron cambios en la expresión de los marcadores inflamatorios TNF, IL-1β, CCL2, CXCl1, F4/80 o CD68 en tejido adiposo blanco perigonadal (PG-WAT) aislado de ratones tratados con CA33 y solamente un modesto incremento en niveles de mARN de IL-6 (Figura 5M). Los niveles de proteína aP2 del tejido adiposo mostraron un ligero incremento en tratamiento con el anticuerpo (Figura 5N y Figura 5P), y no se observó regulación compensatoria de mal1 (Figura 5O y

Figura 5P), sugiriendo que neutraliza el aP2 circulante en ratones adultos que no resulta en compensación molecular por otras isoformas FABP, y de este forma diferentes de la deficiencia genética.

CA33 disminuye la producción de glucosa en el hígado y disminuye la sensibilidad de insulina periférica

La producción de glucosa hepática y utilización de glucosa periférica ambas son críticas en el mantenimiento de normoglicemia y adaptación para respuestas de alimentación y ayuno. Estudios recientes demostraron que la producción de glucosa hepática y actividad gluconeogénica en hígado son reguladas por aP2 (Cao et al., (2013) Cell Metab. 17, 768-778), y sugiere que esta respuesta, sola o en combinación con efectos periféricos, puede ser crítica mediando el efecto anti-diabético de bloqueo de aP2. Para determinar si esto es subyacente a las propiedades terapéuticas de CA33, se recolectaron hígados de ratones alimentados con HFD 5 semanas de tratamiento con CA33 o vehículo. Se observó una reducción marcada en expresión de fosfoenolpiruvato carboxicinasa 1 de genes gluconeogénico (Pck1) y glucosa-6-fosfatasa (Gopc) en muestras de los ratones obsesos tratados con CA33 (Figura 6A). Además, las actividades anzimáticas de PCK1 citoplásmico y glucosa-6-fosfatasa microsomal son significativamente reducidas en muestras de ratones mediados con CA33 (Figura 6B, C). Estos hallazgos son consistentes con primeros

estudios de la función de aP2 en hígado (Cao, et al., (2013) Cell Metab. 17, 768-778).

Después los flujos de glucosa corporal completa por estudios de pinzamiento hiperinsulinémico-euglicémico se examinaron (Figura 6D). Para estos experimentos, los ratones se mantuvieron en HFD por 20 semanas antes del tratamiento con anticuerpo, y se realizaron estudios de pinzamiento después de 5 semanas de intervención del anticuerpo. Durante el estudio de pinzamiento, los ratones obesos tratados con CA33 requieren índices de infusión de glucosa alta para mantener euglicemia (Figura 6E) y muestra producción de glucosa hepática de pinzamiento disminuida (Figura 6F), así como también no hay tendencia hacia una producción de glucosa hepática basal disminuida (Figura 8A, p=0.07). El tratamiento con CA33 también significativamente incrementa los índices de disposición de glucosa de pinzamiento corporal completa (RD) (Figura 6G), a pesar que los niveles de insulina de plasma son disminuidos comparado a controles a pesar de infusión de insulina equivalente (5 mU/kg/min) (Figura 8B). Tomados juntos, estos datos indican que CA33 también incrementa la severidad de insulina sistémica corporal y utilización de glucosa estimulada por insulina incrementada. Para además valorar la utilización de glucosa estimulada por insulina. Para además valorar la utilización de glucosa, se recolectaron tejidos periféricos después del experimento de

pinzamiento y se realizó un ensayo de absorción de 2-desoxiglucosa a 14°C. La absorción de glucosa estimulada por insulina fue significantemente mayor en tejido aislado de ratones obesos tratados con CA33 (Figura 4H), y tiene una tendencia hacia un incremento en absorción de glucosa en tejido adiposo blanco perigonodal (PGWAT) (Figura 8C, p=0.1). Además, la glicólisis corporal completa, midió la velocidad de incremento en plasma [$3H_2O$] como un subproducto de glicólisis, también se incrementó por tratamiento con CA33 (Figura 6I). Estos datos soportan la conclusión que el efecto de disminución de glucosa de CA33 ocurre predominantemente a través de la disminución de producción de glucosa en hígado, e incrementa la utilización de glucosa en tejidos periféricos tal como músculo.

Ejemplo 2. Anticuerpo monoclonal anti-aP2 (CA33) para el tratamiento de Diabetes Tipo 1, el tratamiento con CA33 es protector contra hiperglicemia y mortalidad en el modelo de ratón NOD de diabetes tipo 1

Un modelo de diabetes Tipo 1 (T1D) en el cual el inicio de diabetes es espontáneo, los ratones NOD (S. Makino, K Kunimoto, Y. Murakoa, Y. Mizushima, K. Katagiri, Y. Tahino. La reproducción de una cepa diabética, no obesa de ratones Jikken-dobutsu. Se usaron 29 animales experimentales, 1-13 (1980)), para examinar los efectos del tratamiento con CA33 en incidentes de diabetes y mortalidad. Se realizaron

procedimiento experimental y cuidado del animal con aprobación del comité para el cuidado animal de la Universidad de Harvard. A ratones de ocho semanas de edad NOD se inyectaron subcutáneamente con ya sea vehículo a CA33. Para las primeras 6 semanas de tratamiento, los ratones tratados con CA33 se inyectaron con 1 mg/inyección, lo cual corresponde a dosis de ~15 mg/kg, dos veces a la semana. A partir de la séptima semana de estudio, los ratones tratados con CA33 se inyectaron con una dosis de 30 mg/kg de CA33 dos veces a la semana. Se midió la glucosa en sangre semanalmente después de seis horas de ayuno. El incidente de diabetes se definió como 2 semanas consecutivas de 6 horas de glucosa en sangre en ayunas > 200 mg/dl.

Como se observa en la Figura 9, el tratamiento de ratones NOD con anticuerpo monoclonal anti-aP2 (CA33) fue protector contra el desarrollo de hiperglicemia. Como un resultado, el tratamiento con CA33 también reduce el índice de mortalidad de ratones NOD en este experimento (Figura 10A). Además, el tratamiento de ratones NOD con anticuerpo anti-aP2 a partir de las 10 semanas de edad por 22 semanas (hasta 32 semanas de edad) reduce la glicemia en ayunas (6 horas de ayuno) a 11, 12 y 15 semanas de tratamiento (Figura 10B) y reduce los niveles de insulina en ayunas (6 horas de ayuno) a 16 semanas de tratamiento (Figura 10C), comparado a los ratones NOD tratados con el vehículo.

Resultados de deficiencia de aP2 en tolerancia a la glucosa mejorada en ratones NOD debido a secreción de insulina y masa de célula beta expandida

Previamente se ha reportado que la función de aP2 de bloqueo mediante supresión genética, inhibición de molécula pequeña o neutralización mediada por el anticuerpo es protectora en modelos de ratón de intolerancia a la glucosa inducida por obesidad (Hotamisligil et al., 2006, Uysal et al., 1996; Furuhashi et al., 2007, Cao et al., 2013, Burak et al., 2015). Se exploró la supresión de aP2 para observar si puede similarmente conferir mejoramiento en homeostasis de glucosa en ratones NOD magro. En efecto, los ratones $aP2^{-/-}$ NOD exhibieron tolerancia a la glucosa significativamente mejorada comparado a controles $aP2^{-/-}$ ambos en destete (datos no mostrados) y a 7-8 semanas de edad (Figura 11A). Notablemente, este efecto en homeostasis de glucosa fue perdido por los ratones que alcanzaron 11 semanas de edad, en línea con el inicio pronosticado de insulitis en este modelo.

En este ajuste de obesidad, el aP2 de bloqueo está asociado con sensibilidad de insulina mejorada. Sin embargo, no se observó sensibilidad a insulina alterada en ratones $aP2^{-/-}$ NOD magro comparada a los controles (Figura 11B). Esto eleva la posibilidad de la tolerancia a glucosa mejorada en ratones $aP2^{-/-}$ NOD se relacionan a un efecto intrínseco de la

célula beta de deficiencia aP2. Para evaluar el efecto de supresión genética aP2 en función de la célula beta, las isletas se aislaron de ratones $aP2^{-/-}$ NOD y $aP2^{-/-}$ NOD a 4, 7 y 12 semanas de edad. En el valor de referencia, el genotipo no está asociado con diferencias en secreción de insulina. Sin embargo, en estimulación con glucosa alta, las isletas $aP2^{-/-}$ secretan significativamente más insulina por célula que los controles $aP2^{-/-}$ (Figura 12A). Interesantemente, esta secreción de insulina mejorada empieza a declinar con la edad (Figura 12B y Figura 12C), y no se observaron diferencias de secreción de insulina significante en isletas a partir de ratones de 19 semanas de edad (datos no mostrados). Esto está en línea con el hallazgo de un mejoramiento temporal en tolerancia a la glucosa en ratones $aP2^{-/-}$ NOD, y sugiere que antes del inicio de insulitis, mejora la sensibilidad de la célula beta al menos en la parte subyacente del fenotipo de homeostasis de glucosa en ratones $aP2^{-/-}$ NOD.

El control de glucosa mejorado observado en el ajuste de deficiencia de aP2 también se relaciona a cambios en masa de la célula beta. Notablemente, durante la disección pancreática más isletas son visibles en ratones $aP2^{-/-}$ NOD que en controles $aP2^{-/-}$ (Figura 13). Esta observación fue adicionalmente validada cuantificando la masa de la célula beta en ratones $aP2^{-/-}$ NOD y controles. En animales de 7 semanas de edad, una deficiencia de aP2 está asociada con un

incremento significante (~35%) en la masa de la célula beta (Figuras 14A y 14B).

Secreción de insulina estimulada con glucosa que aumenta el aP2 hormonal

Dado el descubrimiento reciente que aP2 es una hormona activamente secretada y el hallazgo que la neutralización de aP2 mediada por el anticuerpo es protector en modelos de diabetes Tipo 1, la forma de circulación de aP2 fue explorada adicionalmente para ensayo y entendimiento si esta molécula actúa directamente en células beta para regular que su función, supervivencia o proliferación. Mientras la adición de aP2 a isletas primarias bajo control, condiciones de abundante nutriente no tiene efecto en secreción de insulina estimulada con glucosa (SIS) (Figura 15A, Figura 15B y Figura 15C), bajo condiciones de inanición (es decir, condiciones donde FOXO1 es activado), además de aP2 actúa para potenciar GSIS (Figura 15E y Figura 15F). Se corrió un manchado Western para confirmar que aP2 es un hecho tomado de isletas de ratón después de 20 minutos de tratamiento con 10 ug/ml de aP2 (Figura 15D). Esta potenciación de secreción responsable de la insulina después de la inanición prolongada puede estar asociado con resistencia al estrés incrementada en respuesta a la reducción de nutriente. Mientras esto pueda ser beneficioso con seguridad, se ha mostrado la activación crónica de FOXO1 por ser perjudicial a la función de la

célula beta, resultando en pérdida de expresión de insulina, GSIS dañado, diferenciación de la célula beta y susceptibilidad incrementada para apoptosis debido a la pérdida de la actividad de PDX1. Así en el contexto de T1D, la activación crónica de células beta FOXO1 puede incrementar la susceptibilidad para la destrucción inmune y desarrollo de enfermedad acelerada.

aP2 (CA33) dirigido al anticuerpo monoclonal es efectivo en la reducción de incidencia de diabetes en el modelo de ratón RIP-LCMV-GP de diabetes tipo 1

La neutralización de aP2 secretada proporciona efectos benéficos en diabetes Tipo 1, también se referida como diabetes juvenil. El objetico del anticuerpo monoclonal de aP2 con CA33 fue efectivo en la reducción de incidencia de diabetes en un modelo virus-glicoproteína corimeningitis linfocítica del promotor de insulina en rata reconocido en la técnica (RIP-LCMV-GP) de diabetes tipo 1.

El modelo de ratón RIP-LCMV-GP de diabetes tipo 1 es caracterizado por penetración alta e inicio rápido de diabetes debido a la destrucción de la célula β viralmente mediada (Figura 16) (Oldstone et al., (1991) Cell 65:319-331). Los ratones RIP-LCMV-GP son un regalo de los laboratorios de Bornfeldt de la Universidad de Washington en Seattle. Los antecedentes genéticos de todos los modelos de ratón intercruzados son verificados por genotipado congénito

(288 locus para C57BL/6) con un analizador ABI 3130. En el modelo RIP-LCMV-GP, se indujo la diabetes con la administración de LCMV (2 x 103 PFU/ml). Se realizaron el cuidado animal y procedimientos experimentales con aprobación del comité para el cuidado animal de la Universidad de Harvard.

El experimento se realizó en tres grupos de ratones (Figura 17). Grupo A consiste de 8 ratones RIP-LCMV-GP (GP+) que son inyectados intraperitonealmente con el vehículo (PBS) dos veces a la semana partiendo en el Día -14. Grupo B consiste de 8 ratones RIP-LCMV-GP (GP+) que son inyectados intraperitonealmente con CA33 a una dosis de 1.5 mg/inyección dos veces a la semana partiendo del Día -14. Grupo C consiste de 8 ratones $aP2^{-/-}$ RIP-LCMV-GP (GP+), que son inyectados intraperitonealmente con el vehículo dos veces a la semana partiendo en el Día -14. En el día 0, se indujo diabetes con la administración de LCMV (2 x 10^3 PFU/ml). El tratamiento con el vehículo o CA33 fue continuado por dos semanas después de la administración de LCMV (Figura 17).

Se midieron periódicamente los niveles de glucosa en sangre en ayuna por seis horas, y el inicio de diabetes se define como una glucosa en sangre en ayunas durante 6 horas por abajo de 250 mg/dL. Los animales tratados con el vehículo GP+ mostraron una elevación significante en niveles de glucosa en sangre en ayunas (Figura 18) y mayor que 75% de

incidencia de diabetes dentro de 14 días a partir del tratamiento con LCMV (Figura 19). Los ratones aP2$^{-/-}$, GP+ mostraron niveles de glucosa en sangre significativamente menores, completo que los ratones tratados con el vehículo GP+ después del tratamiento con LCMV (Figura 18). Los ratones aP2$^{-/-}$, GP+ también experimentaron una incidencia mucho menor de diabetes que los ratones tratados con el vehículo GP+, 15% contra 75% de incidencia (Figura 19). Los ratones GP+ tratados con el anticuerpo monoclonal mostraron niveles de glucosa en sangre significativamente menores que los ratones de control tratados con el vehículo (Figura 18) e incidencia del fenotipo diabético no se observó en el grupo tratado con el anticuerpo monoclonal (Figura 19).

Estos resultados demuestran que la reducción en niveles aP2 ya sea a través de la deficiencia genética o por neutralización del anticuerpo monoclonal tiene un efecto anti-diabético fuerte en este modelo viralmente inducido de diabetes Tipo 1.

aP2 dirigido a anticuerpo monoclonal (CA33) es efectivo en la reducción de inflamación en el modelo de ratón RIP-LCMV-GP de diabetes tipo 1

El modelo de ratón RIP-LCMV-GP de diabetes tipo 1 se describe anteriormente. Se examinó la inflamación determinando los niveles de insulitis en tres grupos de ratones. Grupo A consiste de 8 ratones RIP-LCMV-GP (GP+) que

son inyectados intraperitonealmente con el vehículo (PBS) dos veces a la semana partiendo en el Día -14. Grupo B consiste de 8 ratones RIP-LCMV-GP (GP+) que son inyectados intraperitonealmente con CA33 a una dosis de 1.5 mg/inyección dos veces a la semana partiendo en el Día -14. Grupo C consiste de 8 ratones aP2$^{-/-}$, RIP-LCMV-GP que se inyectaron intraperitonealmente con el vehículo dos veces a la semana en el Día -14. En el día 0, se indujo diabetes con la administración de LCMV (2 x 103 PFU/ml). El tratamiento con el vehículo o CA33 continúa por dos semanas después de la administración de LCMV.

Se realizó el registro de insulitis en hematoxilina y secciones pancreáticas teñidas con eosina (H&E). Cada isleta se registró como ya sea "no insulitis", "peri-insulitis", "insulitis media" o "insulitis severa". La gráfica en barras representa el porcentaje de cada tipo de isletas en cada animal analizado (Figura 20A).

Para teñido de anticuerpo, la pancreata de los ratones RIP-LCMV-GP se fijan en formalina y empapadas en parafina. Después, se generaron secciones seriales de 5 µm de la pancreata, y se realizó el teñido con anticuerpos contra insulina (Linco), ATF6 (Santa Cruz Biotechnology), fosfo-eLF2α (Biosource); sXBPI (en casa) y Alexa Fluor 488 y Alexa Fluor 568 (Invitrogen) de acuerdo con los protocolos establecidos.

Después del teñido, se realizó el análisis usando el software custom desarrollado en MATLAB (The MathWorks Inc.). De forma breve, las regiones de isletas se identifican como áreas contiguas (pixeles conectados) de teñido de insulina (canal verde) a o por debajo de un valor de intensidad de umbral optimizado a través de imágenes múltiples. La intensidad de fluorescencia media para insulina (canal verde) y por ya sea sXBP1 o ATF6 (canal rojo) se calculó como la suma de intensidades para todos los pixeles divididos por el número de pixeles dentro de la isleta.

Como se muestra en la Figura 20A, los animales tratados con el vehículo GP+ muestran altos niveles de inflamación con la mayoría de las isletas ya sea insulitis media o severa. Los ratones aP2$^{-/-}$, GP+ mostraron niveles disminuidos de inflamación con la mayoría de las isletas que muestran insulitis media (Figura 20A y 20D). Los ratones GP+ tratados con el anticuerpo monoclonal (CA33) también muestran niveles disminuidos de inflamación con números disminuidos de isletas que muestran insulitis severa (Figura 20A y 20E).

Como se muestra en las imágenes en la Figura 21A, la morfología de la isleta y retículo endoplásmico (ER) se preservó la capacidad adaptiva en aP2 deficiente y ratones RIP-LCMV-GP tratados con CA33, como se muestra por los niveles incrementados de teñido ATF6 y sXBP1. Los niveles de ATF6 son significativamente incrementadas tanto en ratones

aP2$^{-/-}$, GP+ como en ratones GP+ tratados con el anticuerpo monoclonal (CA33) (Figura 21B). Además, los niveles de sXBP1 son también significativamente incrementados tanto en los ratones aP2$^{-/-}$, GP+ como en los ratones GP+ tratados con el anticuerpo monoclonal (CA33) (Figura 21C).

Estos resultados demuestran que la reducción en niveles de actividad aP2 ya sea a través de la deficiencia genética o por neutralización del anticuerpo monoclonal reduce la inflamación y preserva la morfología de isletas en este modelo viralmente inducido de diabetes tipo 1.

Ejemplo 3: Anticuerpo monoclonal anti-aP2 para el tratamiento, reducción o prevención de ateroesclerosis

Animales

Se realizaron el cuidado animal y procedimientos experimentales con aprobación del comité para el cuidado animal de la Universidad de Harvard. Ratones ApoE-/- machos en el antecedente C57BL/6J (Jackson Laboratory) se mantuvieron en un ciclo de luz por 12 horas y se alimentaron con una dieta occidental aterogénica (D12079B: 21% de grasa, 0.21% de colesterol; Research Diets) ad libitum, iniciando a las 4-5 semanas de edad. Los ratones se trataron por administración subcutánea del vehículo o anticuerpo (33 mg/kg) por 12 semanas partiendo en la semana 6 de edad.

Valoración de lesiones ateroescleróticas

Los ratones se sacrificaron y se lavaron a chorro

con salina y después 10% de solución de formalina amortiguada neutral por inyección a través del ventrículo izquierdo. La aorta se cortó de la aorta próxima a la bifurcación iliaca, y la aorta se fijó en una preparación *en face*. Las aortas fijadas en face se tiñeron con Sudan IV.

Se logró la cuantificación de áreas de lesión usando el software Imaged desarrollado en el NIH. El perímetro exterior de la aorta fijada se definió en el software para establecer el área total de la aorta como un antecedente blanco. El porcentaje del área de las lesiones teñidas de rojo con Sudan IV después se midió y se calculó por el software.

Como se muestra en la Figura 22B, los ratones con exclusión génica tratados con CA33 tiene área de lesión ateroesclerótico disminuida. En contraste, los ratones con exclusión génica ApoE tratados con CA15 no muestran diferencia significante en área de lesión ateroesclerótica comparada a los controles. Las imágenes representativas de las aortas fijadas *en face* de ratones con exclusión génica ApoE se muestran en la Figura 22C (ratones tratados con el vehículo), Figura 22D (ratones tratados con CA33) y la Figura 22E (ratones tratados con CA15).

La eficiencia de supresión de ratones que aP2 es específicamente excluidos génicamente con el sistema lox-P en tejido adiposo (ratones $aP2^{adip-/-}$) se analizó por manchado

western (Figura 22G). Los ratones *aP2*$^{adip-/-}$ se cruzaron con ratones *ApoE*$^{-/-}$ para generar ratones *ApoE*$^{-/-}$*aP2*$^{adip-/-}$. Los ratones *ApoE*$^{-/-}$*aP2adip*$^{-/-}$ y *ApoE*$^{-/-}$*aP2adip*$^{-/-}$ alimentados con dieta occidental por 12 semanas, se analizaron para aP2 en suero, TG, y niveles de colesterol (Figura 22H, Figura 22I y Figura 22J). Como se muestra en la Figura 22I y Figura 22J). Como se muestra en la Figura 22I y Figura 22J, los ratones *ApoE*$^{-/-}$*aP2*$^{adip-/-}$ tienen niveles de triglicérido y colesterol bajos comparado a los ratones *ApoE*$^{-/-}$*aP2*$^{adip-/-}$. Después del sacrificio de estos ratones, el área de lesión ateroesclerótica se analizó por teñido con Sudan IV de una aorta *en face* de estos ratones (Figura 22K y Figura 22L). Como se muestra en la Figura 22K, los ratones *ApoE*$^{-/-}$*aP2*$^{adip-/-}$ tienen área de lesión ateroesclerótica disminuida comparada a ratones *ApoE*$^{-/-}$*aP2a*$^{dip-/-}$. Completamente, estos resultados muestran que el tejido adiposo derivado de aP2 regula el desarrollo de dislipidemia y ateroesclerosis en ratones *ApoE*$^{-/-}$.

Peso Corporal y Peso de Hígado

Los ratones con exclusión génica ApoE alimentados con dieta occidental iniciando a 4-5 semanas de edad hasta que los ratones tienen 18 semanas de edad. Los ratones se trataron por administración subcutánea del vehículo o anticuerpo (33 mg/kg) por 12 semanas partiendo a las 6 semanas de edad. Se midieron el peso corporal, masa magra y

masa de grasa por espectroscopio de absorbancia de rayos X (DXA).

Como se muestra en la Figura 23A, los ratones con exclusión génica ApoE tratados con anticuerpo CA33 muestran una disminución significante en peso corporal. Además, los ratones con exclusión génica ApoE tratados con CA33 también muestran una disminución significante en peso del hígado (Figura 23B). En contraste, los ratones con exclusión génica ApoE tratados con CA15 no muestran cualquiera de las diferencias significantes en peso corporal o peso del hígado (Figura 23A, 23B y 23C).

Como se muestra en la Figura 23D, los ratones con exclusión génica ApoE tratados con el anticuerpo CA33 no relevan cualquier disminución significante en masa magra o masa de grasa. Además, los ratones con exclusión génica ApoE tratados con el anticuerpo CA15 no muestran cualquiera de las diferencias significantes en masa magra o masa de grasa (Figura 23D).

Prueba de Tolerancia a la glucosa

Se realizó la prueba de tolerancia a la glucosa por administración de glucosa oral (1.0 g/kg) en ratones conscientes después de ayuno nocturno (16 horas). La distribución de tamaño de partícula de las lipoproteínas se determinó por cromatografía líquida de alto de desempeño en ayunas (FPLC), usando muestras combinadas de plasma después

de 6 o 12 semanas de tratamiento con vehículo o anticuerpo (33 mg/kg).

Como se muestra en la Figura 24A, los ratones tratados con CA33 tienen una glucosa en sangre en ayunas inferior estadísticamente significante que los ratones tratados con el vehículo. Sin embargo, los ratones tratados con CA33 no muestran cualquier diferencia en respuesta a la glucosa en la prueba de tolerancia a la glucosa (GTT) (Figura 24B).

Medición de colesterol y triglicéridos en la fracción de lipoproteína

Se midieron el colesterol y los triglicéridos en fracciones de lipoproteína (lipoproteína total, lipoproteína de muy baja densidad (VLDL), lipoproteína de baja densidad (LDL), o lipoproteína de alta densidad (HDL)) en ratones con exclusión génica ApoE tratados con PBS, CA33 (33 mg/kg) o CA15 (33 mg/kg) por seis semanas o doce semanas. Se determinó la distribución de tamaño de partícula por cromatografía líquida de desempeño en ayunas (FPLC), usando muestras combinadas en plasma.

Como se muestra en la Figura 25A, los ratones con exclusión génica ApoE tratados con CA33 por seis semanas mostró disminución significante en niveles de colesterol en lipoproteína total, lipoproteína de densidad muy baja (VLDL), lipoproteína de baja densidad (LDL), y lipoproteína de alta

densidad (HDL). Además, los ratones con exclusión génica ApoE tratados con CA33 por doce semanas mostraron disminución significante en niveles de colesterol en lipoproteína total, lipoproteína de densidad muy baja (VLDL), lipoproteína de baja densidad (LDL), y lipoproteína de densidad alta (HDL) (Figura 25B). El tratamiento de ratones con exclusión génica ApoE con CA15 por seis semanas no proporcionan cualquiera de las diferencias significantes en niveles de colesterol (Figura 25A), mientras el tratamiento de ratones con exclusión génica ApoE con C15 por doce semanas conduce a disminuciones más pequeñas en colesterol en lipoproteína total, lipoproteína de baja densidad (LDL), y lipoproteína de alta densidad (HDL), cuando se compara a animales tratados con CA33 (Figura 25B).

Como se muestra en la Figura 26A, los ratones con exclusión génica ApoE tratados con CA33 por seis meses mostró disminución significante en niveles de triglicérido en lipoproteína total y lipoproteína de muy baja densidad (VLDL). Además, los ratones con exclusión génica ApoE tratados con CA33 por doce semanas mostraron disminución significante en niveles de triglicérido en lipoproteína total, lipoproteína de muy baja densidad (VLDL), lipoproteína de baja densidad (LDL) y lipoproteína de alta densidad (HDL) (Figura 26B). En contraste, el tratamiento de ratones con exclusión génica ApoE con CA15 por seis meses o doce meses no

proporciona cualquiera de las diferencias significantes en niveles de triglicéridos (Figura 26A y 26B), comparados a animales tratados con PBS.

Ejemplo 4: Humanización de CA33

Se humanizó el anticuerpo 909 de conejo (CA33) injertando las CDRs a partir de las CDRs de región V del anticuerpo híbrido de armazón de CDR/ratón de conejo en armazones de la región V del anticuerpo de línea germinal humano. Para recuperar la actividad del anticuerpo, un número de residuos del armazón a partir de la región V híbrida de conejo/ratón también son retenidos en la secuencia humanizada. Estos residuos se seleccionan usando el protocolo resumido por Adair et al., (1991) (Humanised antibodies WO91/09967). Los alineamientos de las secuencias de la región V (donador) del anticuerpo híbrido de conejo/ratón con las secuencias de la región V (aceptor) de línea germinal humana se muestran en la Figura 27 (VL) y Figura 28 (VH), junto con las secuencias humanizadas diseñadas. Las CDRs injertadas a partir de la secuencia donadora y aceptora son como se definen por Kabat (Kabat et al., 1987), con la excepción de CDRH1 donde se usa la definición de Chothia/Kabat combinada (véase Adair et al., 1991, Humanised antibodies WO91/09967).

Los genes que codifican un número de secuencias d región V de cadena pesada y ligera variante son diseñadas y construidas por un procedimiento de síntesis automatizado por

ADN 2.0 Inc. Se crearon variantes adicionales de regiones V de cadena tanto pesada como ligera modificando los genes de VH y VK por mutagénesis dirigida al oligonucleótido, incluyendo, en algunos casos, las mutaciones con CDRs para modificar los sitios de isomerización de ácido aspártico potencial o remover los residuos de Cisteína no apareadas. Estos genes se clonaron en vectores para permitir la expresión de IgG4P humanizado 909 (IgG4 humano que contiene la bisagra que establece la mutación S241P, Angal et al., Mol Immunol. 1993, 30(1); 105-8) anticuerpos en células de mamífero. Las cadenas del anticuerpo humanizado variante, y combinaciones de los mismos, se expresan y valoran por su potencia relativa al anticuerpo precursor, sus propiedades biofísicas e idoneidad para procesamiento corriente abajo, conduciendo a la selección de injertos de cadena pesada y ligera en las Figuras 27 y 28.

La región J JK4 más IGKVI-17 (A30) de región V humana se seleccionó como el aceptor para las CDRs de cadena ligera del anticuerpo 909. Los residuos de armazón de cadena ligera en gL1 injertado (Seq ID No. 446), gL10 (Seq ID No. 448) Gl54 (Seq ID No. 450) y gL55 (Seq ID No. 452) son todos del gen de línea germinal humana, con la excepción de que los residuos 2, 3, 63 y 70 (numeración Kabat), donde los residuos del donador Valina (2V), Valina (3V), Lisina (63K) y Ácido aspártico (70D) son retenidos, respectivamente. La retención

de residuos 2, 3, 63 y 70 es esencial para la potencia completa del anticuerpo humanizado. El residuo 90 en CDRL3 del injerto gL10, injerto gL54 e injerto gL55 fue mutado a partir de un residuo de Cisteína (90) a una Serina (90S), Glutamina (90Q) e Histidina (H90), respectivamente, así removiendo el residuo de Cisteína no apareado a partir de la secuencia gL10, gL54 y gL55.

La región J JH4 más IGHV4-4 de la región V humana se eligió como el aceptor para las CDRs de cadena pesada del anticuerpo 909. En contraste con muchos anticuerpos de conejo, el gen VH del anticuerpo 909 es más corto que el aceptor humano seleccionado. Cuando se alinea con la secuencia del aceptor, el armazón 1 de la región VH del anticuerpo 909 (Seq ID No. 454) carece del residuo N-terminal, el cual es retenido en el anticuerpo humanizado (Figura 28). El armazón 3 de la región VH de conejo 909 también carece de dos residuos (75 y 76) en el bucle entre las hebras lámina beta D y E; en gH1 injertado (Seq ID No. 455) el hueco en el armazón 3 es conservado, mientras en el gH14 injertado (Seq ID No. 457), gH15 (Seq ID No. 459), gH61 (Seq ID No. 461) y gH62 (Seq ID No. 463) el hueco está rellenado con los residuos correspondientes (Lisina 75, 75K; Aspargina 76, 76N) a partir de la secuencia aceptora humana seleccionada (Figura 28). Los residuos de armazón de cadena pesada en gH1 y gH15 injertados son todos del gen de línea

germinal humano, con la excepción de los residuos 23, 67, 71, 72, 73, 74, 77, 78, 79, 89 y 91 (numeración Kabat), donde los residuos del donador Treonina (23T), Fenilananina (67F), Lisina (71K), Alanina (72A), Serina (73S), Treonina (74T), Treonina (77T), Valina (78V), Ácido aspártico (79D), Treonina (89T) y Fenilalanina (91F) se retuvieron, respectivamente. Los residuos de armazón de cadena pesada en gH14 injertada son del gen de línea germinal humano, con la excepción de los residuos 67, 71, 72, 73, 74, 77, 78, 79, 89 y 91 (numeración Kabat), donde los residuos del donador Treonina (23T), Fenilalanina (67T), Lisina (71K), Alanina (72A), Serina (73S), Treonina (74T), Treonina (77T), Valina (78V), Ácido aspártico (79D), Treonina (89T) y Fenilalanina (91F) se retuvieron, respectivamente. Los residuos de armazón de cadena pesada en gH61 y gH62 injertados son del gen de línea germinal humano, con la excepción de los residuos 71, 73 y 78 (numeración Kabat), donde los residuos donadores Lisina (71K), Serina (73S) y Valina (78V) son retenidos, respectivamente. El residuo de Glutamina en posición 1 del armazón humano se reemplazó con ácido glutámico (1E) para proporcionar la expresión y purificación de un producto homogéneo; la conversión de Glutamina a piroGlutamato en el N-término de anticuerpos y fragmentos de anticuerpo es ampliamente reportado. El residuo 59 en CDRH2 (Seq ID No. 19) del injerto gH15 se injerto gH62 se mutó de una Cisteína

(59C) a un residuo Serina (59S), así removiendo el residuo de Cisteína no apareada de la secuencia gH15. El residuo 98 en CDRH3 (Seq ID No. 20) de gH15 injertado y gH62 injertado se mutó de un Ácido aspártico (98D) a un residuo de Ácido glutámico (98E), así removiendo un sitio de isomerización de ácido aspártico de la secuencia gH15.

Para la expresión de Ab 909 humanizado en células de mamífero, el gen de región V de cadena ligera humanizado se une a una secuencia de ADN que codifica la región constante C kappa humana (alotipo Klm3), para crear un gen de cadena ligera contigua. El gen de región V de cadena pesada humanizado se unió a una secuencia de ADN que codifica la región constante de cadena pesada gamma 4 humana con la bisagra que establece mutación S241P (Angal et al., Mol Immunol. 1993, 30(1): 105-8), para crear un gen de cadena pesada contigua. Los genes de cadena pesada y ligera se clonaron en el vector de expresión de mamífero 1235-pGL3a(1)-SRHa(3)-SRLa(3)-DHFR(3) (Cellca GmbH).

Ejemplo 5: Afinidad de reducción de un anticuerpo monoclonal anti-aP2 de alta afinidad

En vista de la actividad terapéutica del anticuerpo CA33 monoclonal anti-aP2 de baja afinidad, se exploraron las sustituciones del residuo de aminoácido en el anticuerpo murino monoclonal anti-aP2 de alta afinidad (H3 gL1/gH1) para desarrollar anticuerpos de baja afinidad que tienen actividad

terapéutica que modula aP2. Se proporcionan en la Tabla 13 a continuación las secuencias de aminoácido original y cADN de H3 gL1/gH1, junto con las secuencias mutadas de los mismos.

Tabla 13: Modificación de anticuerpo anti-aP2 de alta afinidad

Proteína/ cADN	**Seq. ID No.**	**Secuencia**
región variable de cadena ligera H3 gL1	485	EVVLTQSPALMAASPGEKVTITCSVSSSISSSNLHWYQQKSETSPKPWIYG TSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSHYPLTFGAG TKLELK
Región variable de cadena ligera H3 gL1 (Seq. ID No. 485) cADN	502	GAAGTTGTGCTCACCCAGTCTCCAGCACTCATGGCTGCATCTCCAGGGG AGAAGGTCACCATCACCTGCAGTGTCAGCTCAAGTATAAGTTCCAGCAA CTTGCACTGGTACCAGCAGAAGTCAGAAACCTCCCCCAAACCCTGGATT TATGGCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGTTCGCTTCAGTGGCAG TGGATCTGGGACCTCTTATTCTCTCACAATCAGCAGCATGGAGGCTGAAG ATGCTGCCACTTATTACTGTCAACAGTGGAGTCATTACCCGCTCACGTTC GGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA
región variable de cadena ligera H3 gL11	486	EVVLTQSPALMAASPGEKVTITCSVSSSISSSNLHWYQQKSETSPKPWIYG TSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQASHYPLTFGAG TKLELK
Región variable de cadena ligera H3 gL11 (Seq. ID No. 486) cADN	503	GAAGTTGTGCTCACCCAGTCTCCAGCACTCATGGCTGCATCTCCAGGGG AGAAGGTCACCATCACCTGCAGTGTCAGCTCAAGTATAAGTTCCAGCAA CTTGCACTGGTACCAGCAGAAGTCAGAAACCTCCCCCAAACCCTGGATT TATGGCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGTTCGCTTCAGTGGCAG TGGATCTGGGACCTCTTATTCTCTCACAATCAGCAGCATGGAGGCTGAAG ATGCTGCCACTTATTACTGTCAACAGGCGAGTCATTACCCGCTCACGTTC GGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA
región variable de cadena pesada H3 gH1	482	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSNWITWVKQRPGQGLEWIGD IYPGSGSTTNNEKFKSKATLTVDTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARLRGY YDYFDFWGQGTTLTVSS

Región variable de cadena pesada H3 gH1 (Seq. ID No. 482) cADN	504	CAGGTCCAACTACAGCAGCCTGGGGCTGAACTTGTGAAGCCTGGGG CTTCAGTGAAGCTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACCAGC AACTGGATAACCTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAAGGCCTTGAGT GGATTGGAGATATTTATCCTGGTAGTGGTAGTACTACTAACAATGAG AAGTTCAAGAGCAAGGCCACACTGACTGTAGACACATCCTCCAGCAC AGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCT ATTACTGTGCAAGGCTAAGGGGCTACTATGATTACTTTGACTTCTGGG GCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCGAGT
región variable de cadena pesada H3 gH19	483	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSNAITWVKQRPGQGLEWIGD ISPGSGSTTNNEKFKSKATLTVDTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARLRGY YDYFDFWGQGTTLTVSS
Región variable de cadena pesada H3 gH19 (Seq. ID No. 483) cADN	505	CAGGTCCAACTACAGCAGCCTGGGGCTGAACTTGTGAAGCCTGGGG CTTCAGTGAAGCTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACCAGC AACGCGATAACCTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAAGGCCTTGAGT GGATTGGAGATATTTCTCCTGGTAGTGGTAGTACTACTAACAATGAG AAGTTCAAGAGCAAGGCCACACTGACTGTAGACACATCCTCCAGCAC AGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCT ATTACTGTGCAAGGCTAAGGGGCTACTATGATTACTTTGACTTCTGGG GCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCGAGT
región variable de cadena pesada H3 gH20	484	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSNAITWVKQRPGQGLEWIGD ISPGSGSTTNNEKFKSKATLTVDTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARLRGFY DYFDFWGQGTTLTVSS
H3 gH20 región variable de cadena pesada H3 gH20 (Seq. ID No. 484) cADN	495	CAGGTCCAACTACAGCAGCCTGGGGCTGAACTTGTGAAGCCTGGGG CTTCAGTGAAGCTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACCAGC AACGCGATAACCTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAAGGCCTTGAGT GGATTGGAGATATTTCTCCTGGTAGTGGTAGTACTACTAACAATGAG AAGTTCAAGAGCAAGGCCACACTGACTGTAGACACATCCTCCAGCAC AGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTA TTACTGTGCAAGGCTAAGGGGCTTCTATGATTACTTTGACTTCTGGGG CCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCGAGT
Región constante gamma 1 Fab de cadena pesada	496	AKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSG VHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDC

Región constante gamma 1 Fab de cadena pesada (Seq. ID No. 496) cADN	497	GCCAAAACGACACCCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCCTGGATCTGCTGCC CAAACTAACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTCCCT GAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACTCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCAC ACCTTCCCGGCTGTCCTGCAATCTGACCTCTACACTCTGAGCAGCTCAGTGA CTGTCCCCTCCAGCACCTGGCCCAGCGAGACCGTCACCTGCAACGTTGCCCA CCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGTGCCCAGGGATTGT
Región constante gamma 1 de longitud completa de cadena pesada	498	AKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHT FPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCK PCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLTITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDD V EVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKT ISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPA ENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLNVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKS LSHSPGK
Región constante gamma 1 de longitud completa de cadena pesada (Seq. ID No. 498) cADN	499	GCCAAAACGACACCCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCCTGGATCTGCTGCC CAAACTAACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTCCCT GAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACTCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCAC ACCTTCCCAGCTGTCCTGCAGTCTGACCTCTACACTCTGAGCAGCTCAGTGA CTGTCCCCTCCAGCACCTGGCCCAGCGAGACCGTCACCTGCAACGTTGCCCA CCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGTGCCCAGGGATTGTGG TTGTAAGCCTTGCATATGTACAGTCCCAGAAGTATCATCTGTCTTCATCTTCC C CCCAAAGCCCAAGGATGTGCTCACCATTACTCTGACTCCTAAGGTCACGTGTG TTGTGGTAGACATCAGCAAGGATGATCCCGAGGTCCAGTTCAGCTGGTTTGTA GATGATGTGGAGGTGCACACAGCTCAGACGCAACCCCGGGAGGAGCAGTTCA ACAGCACTTTCCGCTCAGTCAGTGAACTTCCCATCATGCACCAGGACTGGCTC AATGGCAAGGAGTTCAAATGCAGGGTCAACAGTGCAGCTTTCCCTGCCCCCAT CGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGCAGACCGAAGGCTCCACAGGTGTAC ACCATTCCACCTCCCAAGGAGCAGATGGCCAAGGATAAAGTCAGTCTGACCTG CATGATAACAGACTTCTTCCCTGAAGACATTACTGTGGAGTGGCAGTGGAATG GGCAGCCAGCGGAGAACTACAAGAACACTCAGCCCATCATGGACACAGATGG CTCTTACTTCGTCTACAGCAAGCTCAATGTGCAGAAGAGCAACTGGGAGGCAG GAAATACTTTCACCTGCTCTGTGTTACATGAGGGCCTGCACAACCACCATACT G AGAAGAGCCTCTCCCACTCTCCTGGTAAATGATCCCAGTGTCCTTGGAGCCCT C TGGTCCTACAGGACTCTGACACCTACCTCCACCCCTCCCTGTATAAA
Constante kappa de cadena ligera	500	RTDAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVL NSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNE C

Constante kappa de cadena ligera (Seq. ID No. 500) cADN	501	CGTACGGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTT AACATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACTTCTACCCCAAAG ACATCAATGTCAAGTGGAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCCT GAACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGC ACCCTCACGTTGACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGA GGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATG AGTGT

Para reducir la afinidad de H3 (gL1/gH1) a la de CA33, los residuos H3 igualmente forman contactos clave con aP2 murino identificado por inspección visual de la estructura de cristal (Figura 29), y mutado a Alanina, Fenilalanina o Serina. Inicialmente, se generaron un panel de 11 puntos de mutación a través de 9 posiciones y se clasificaron usando el análisis SPR. Las mutaciones que muestran reducciones significantes en afinidad se combinaron y después se clasificaron usando el Octeto. Se produjeron combinaciones adicionales hasta que aproximadamente se igualó la afinidad de CA33.

Sustituyendo el residuo W91 de aminoácido en la región CDRL3 precursora de cadena ligera para Ala, W33 en la región CDRH1 de cadena pesada a Ala, y Y52 en la región CDRH2 de cadena pesada a Ser (H3 gL1/gH1), se redujo la afinidad de <0.07 µM. Sustituyendo el residuo W3 de aminoácido en la región CDRH1 de cadena pesada a Ala, Y52 en la región CDRH2 de cadena pesada a Ser, y Y98 en la región CDRH3 de cadena pesada a Phe (H3 gL1/gH1), se redujo la afinidad de <0.07 µM. Las cadenas variables completas de los anticuerpos

resultantes y su alineación se proporcionan en la Figura 30B y C.

Experimentos adicionales examinaron las afinidades de unión de anticuerpos anti-aP2 que han sido mutadas para reducir la afinidad de unión (5251 mlgG1168 (PB1172) y 5252 mlgG1.169 (PB1171) se muestran en la Figura 31. El PB1172 es comprendido en la cadena ligera g11 y cadena pesada g19 (Véase Figura 30B y 30C) y PB1171 es comprendido en la cadena ligera g1 y cadena pesada g20 (Véase Figuras 30B y 30C). Las afinidades de unión hacia aP2 humano son 6.03 µM y 5.82 µM para los anticuerpos PB1172 y PB1171, respectivamente. Las afinidades de unión hacia aP2 de ratón son 4.57 µM y 5.12 µM para los anticuerpos PB1172 y PB1171, respectivamente.

Ejemplo 6: Producción de glucosa hepática regulada por aP2 adipocina interrumpiendo un complejo transcripcional FoxO1/CtBP2 representativo

Animales

Ratones ob/ob deficiente en leptina (10 semanas de edad) y ratones obsesos inducidos con dieta alta en grasa (12-16 semanas en dieta alta engrasa) se adquirieron de the Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME). Todos los ratones usados son machos y se mantuvieron en un ciclo de oscuridad/luz de 12 horas. Todos los procedimientos experimentales que involucran animales se condujeron de conformidad con la guía de the Institutional Animal Care and

Use Committee, Harvard School of Public Health.

1) Ratones con exclusión génica aP2 en estudio de dieta alta en grasa

Ratones de tipo silvestre o deficiente en aP2 [véase, Hotamisligil, G.S., *et al.* Uncoupling de obesity from insulin resistance through a targeted mutation in aP2, the adipocito fatty acid binding proteína. *Science* 274, 1377-1379 (1996)] en antecedente se alimentaron ya sea una dieta alta en grasa (60 kcal%, Research Diets, Inc., NJ, D12492i) o dieta de alimento normal (RD, PicoLab 5058 Lab Diet) a partir de las 8 semanas de edad por 16 semanas.

2) Tratamiento de ratones obesos inducidos con dieta con anticuerpo aP2.

Los ratones de tipo silvestre se alimentaron con dieta alta engrasa por 12 semanas para inducir obesidad con dieta y después de esto se trataron con ya sea vehículo o anticuerpo aP2 monoclonal (1.5 mg de CA33/ratón) dos veces a la semana por 4 semanas en la misma dieta.

3) Estudio de inyección de la proteína aP2 recombinante.

Los ratones de tipo silvestre (10-12 semanas de edad) recibieron inyecciones intraperitoneales de ya sea vehículo o proteína aP2 recombinante (100 µg/ratón) dos veces al día por 5 días. Se proporcionó de forma generosa a los ratones $FoxO1^{flox/flox}$ por Domenico Acoili (Columbia University,

NY) y se cruzaron con ratones Albúmi-Cre (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) para generar ratones con exclusión génica FoxO1 específicos al hígado. Se trataron ratones tipo silvestre o ratones con exclusión génica específicos al hígado FoxO1 con aP2 recombinante de la misma forma.

4) Estudio de transducción de adenovirus

Se suministró adenovirus recombinante que codifica ya sea β-glucuronidasa (AdGUS), CtBP2 (AdCtBP2), shControl (Ad/shControl), shFoxO1 (Ad/shFoxO1) o shCtBP2 (Ad/shCtBP2) en ratones al título de 1.5 x 1011 partículas/ratón. Se realizaron las pruebas de tolerancia a glucosa por inyección intraperitoneal (0.75 g/kg) después de ayuno durante la noche, y se realizaron pruebas de tolerancia a insulina por inyección intraperitoneal de insulina (0.5 U/kg) después de 6 horas de ayuno. Se analizaron parámetros de suero usando los siguientes sistemas: ELISA FABP4 de Ratón aP2 (BioVEndor), insulina; ELISA de Insulina Ultrasensible de Ratón (alpco), glucagón; Kit ELISA de Glucagon Quantikine (R&D Systems), FFA, NEFA-HR(2) Wako Chemicals), glicerol; Kit de Determinación Libre de Glicerol (Sigma), Alanin aminotransferasa (ALT), kit de ensayo de la actividad de ALT (Sigma). Se extrajo el triglicérido de hígado por el método de cloroformo-metanol y se determinó por un ensayo colorimétrico (Sigma).

Producción y purificación de proteína recombinante

Se clonó el cADN aP2 de ratón con una etiqueta de polihistidina N-terminal seguido por un sitio de escisión de proteasa TEV en el vector pT28 (EMD bioscience) y el plásmido se transformó en la cepa BL21AI de *E. coli* (Invitrogen). Después de la purificación de afinidad y remoción de endotoxina extensiva, la etiqueta His N-terminal se removió por escisión con proteasa TEV (Sigma). Se generó el mutante de unió al lípido (R126L, Y128F) siguiendo la misma estrategia [véase, Erbay, e. *et al.*, Reducing endoplasmic reticulum stress through a macrophage lipid chaperone alleviates aterosclerosis. *Nature Medicine* 15, 1383-1391 (2009)]. Para deslipidar la proteína recombinante, la unión dependiente de la temperatura de ligando hidrofóbicos a Lipidex1000 (Perkin-Elmer, Norwalk, CT), se utilizó un derivado de hidroxialcoxipropilo 10% sustituido de Sephadex G-25. A 37°C, se removió Lipidex1000 en lípidos tanto no unidos a la proteína como asociados a la proteína de una solución acuosa, mientras a 0°C solamente se removieron lípidos no unidos a la proteína [véase, Glatz, J.F. & Veerkamp, J.H. Removal de fatty acids from serum albumin by Lipidex 1000 chromatography. *Journal de Biochemical and Biophysical Methods* 8, 57-61 (1983)]. La proteína aP2 recombinante se deslipidó con Lipidex1000 a 37°C dos veces. Después de esto, las proteínas resultantes se purificaron

adicionalmente por filtración de gel a través de Sephadex G-25 (PD-10, GE Healthcare).

Aislamiento de hepatocito primario, cribado de factores de transcripción, fraccionamiento subcelular y transducción de adenovirus

Se aislaron hepatocitos de ratón primarios como se describe previamente, véase Sekiya, M., *et al.* SREBP-1-independent regulation de lipogenic gene expression in adipocytes. *Journal de Lipid Research* 48, 1581-1591 (2007). Después de la inanición en suero durante la noche, las células se trataron en medio E de William (Invitrogen) con 50 µg/ml de aP2 recombinante en la presencia o ausencia de forsfolina (2 µM, Sigma) por 3 horas a menos que se indique de otra forma. Para el cribado de los factores de transcripción, se adquirieron las siARNs plus en objetivo de Dharmacon y se transfectaron temporalmente en hepatocitos primarios por ARNiFect (QIAGEN). Para fraccionamiento subcelular, las células se trataron como se indica anteriormente por 90 minutos y lo fraccionado utilizó el sistema de fraccionamiento celular NE-PER (Pierce). Para transducción adenoviral, se clonaron los oligonucleótidos shARN en el vector pENTR/U6 seguido por la recombinación con el vector pAd/BLOCK-it-DEST (Invitrogen). Las secuencias objetivo de shARN se diseñaron como sigue: Control; 5'-GTCTCCACGCGCAGTACATTT-3', Seq. ID No. 541 Foxo1; 5'-

GCATGTTTATTGAGCGCTTGG-3', Seq. ID No. 542 CtBP1; 5'-GCAGCGGGTTTGACAATATCG-3', Seq ID No. 543 CtBP2; 5'-GGGAAGACTAGGACGTGATTA-3' Seq. ID No. 544 y 5'-GCCACATTCTCAATCTGTATC-3', Seq. ID No. 545 HNF4a; 5'-GCTGCAGATTGATGACAATGA-3' Seq. ID No. 546. El elemento responsable de cabeza de tenedor (Invitrogen). Se adquirió el adenovirus que codifica renilla luciferasa de Vector Biolabs (Philadelphia, PA). Se amplificaron los adenovirus en células HEK293A y se purificaron por centrifugación de gradiente CsCl. Para medir la actividad de transcripción de FoxO, se infectaron los hepatocitos primarios con luciferasa FHRE y luciferasa retinal que expresa adenovirus por 24 horas. Después de esto, las células se sometieron a inanición en suero durante la noche y se incubaron con 50 µl/ml de la proteína aP2 en la ausencia o presencia de 2 µM de forscolina por 6 horas. Las células se lisaron en amortiguador de lisis positiva y se analizaron usando Sistemas Reporteros de luciferasa Dual-Glo (Promega). Se normalizó luciferasa de luciérnaga a Renill luciferasa.

RT-PCR en Tiempo Real Cuantitativo

Se aisló el ARN total usando el Reactivo de Trizol (Invitrogen) y el cADN se sintetizó con Supermezcla de Transcripción Inversa iScript (Bio-Rad). Se realizó el análisis de PCR en tiempo real cuantitativo usando SYBR Green en sistemas PCR de Tiempo Real ViiA 7 (Applied Biosystema). Los datos se

normalizaron a expresión de fosfoproteína PO ribosomal acídico (*Rplp0*, 36B4). Los cebadores usados para Q-PCR son como sigue:

Rplp0	delantero	5’-CACTGGTCTAGGACCCGAGAA-3’ Seq. ID No. 547
	inverso	5’-AGGGGGAGATGTTCAGCATGT-3’ Seq. ID No. 548
Pck1	delantero	5’-CTGCATAACGGTCTGGACTTC-3’ Seq. ID No. 549
	inverso	5’-CAGCAACTGCCCGTACTCC-3’ Seq. ID No. 550
G6pc	delantero	5’-CGACTCGCTATCTCCAAGTGA-3’ Seq. ID No. 551
	inverso	5’-GTTGAACCAGTCTCCGACCA-3’ Seq. ID No. 552
Foxo1	delantero	5’-AACACACAGCTGGGTGTCAGG-3’ Seq. ID No. 553
	inverso	5’-GCATCTTTGGACTGCTCCTCAGT-3’ Seq. ID No. 554
Foxo3	delantero	5’-CTGGTGCTAAGCAGGCCTCAT-3’ Seq. ID No. 555
	inverso	5’-TGTAGGTCTTCCGTCAGTTTGAGG-3’ Seq. ID No. 556
Foxo4	delantero	5’-TGTATATGGAGAACCTGGAGTGCG-3’ Seq. ID No. 557
	inverso	5’-CAAAGCTTCTTGCTGTGACTCAGG-3’ Seq. ID No. 558
Cebpa	delantero	5’-CAAGAACAGCAACGAGTACCGG-3’ Seq. ID No. 559
	inverso	5’-TGTCACTGGTCAACTCCAGCAC-3’ Seq. ID No. 560
Nr3c1	delantero	5’-CTGACGTGTGGAAGCTGTAAAGTC-3’ Seq. ID No. 561
	inverso	5’-GATGCAATCATTTCTTCCAGCAC-3’ Seq. ID No. 562
CtBP1	delantero	5’-TTGGGCATCATTGGACTAGGTC-3’ Seq. ID No. 563
	inverso	5’-GCTCGATTCCATCAGATAGGTATGG-3’ Seq. ID No. 564
CtBP2	delantero	5’-GCAGGACTTGCTATATCAGAGCGA-3’ Seq. ID No. 565
	inverso	5’-ATGCACCTTGCCTCATCTGCT-3’ Seq. ID No. 566
Alb	delantero	5’-AGACGTGTGTTGCCGATGAGT-3’ Seq. ID No. 567
	inverso	5’-GTTTTCACGGAGGTTTGGAATG-3’ Seq. ID No. 568
Gpam	delantero	5’-ACAGTTGGCACAATAGACGTTT-3’ Seq. ID No. 569
	inverso	5’-CCTTCCATTTCAGTGTTGCAGA-3’ Seq. ID No. 570
Fasn	delantero	5’-AGAGATCCCGAGACGCTTCT-3’ Seq. ID No. 571
	inverso	5’-GCCTGGTAGGCATTCTGTAGT-3’ Seq. ID No. 572
Scd1	delantero	5’-CCCGGGAGAATATCCTGGTTT-3’ Seq. ID No. 573
	inverso	5’-TCGATGAAGAACGTGGTGAAGT-3’ Seq. ID No. 574
Hif1a	delantero	5’-ATGAAGTGCACCCTAACAAGCC-3’ Seq. ID No. 575
	inverso	5’-CACACTGAGGTTGGTTACTGTTGG-3’ Seq. ID No. 576
Ppargc1a	delantero	5’-GAAGTGGTGTAGCGACCAATC-3’ Seq. ID No. 577
	inverso	5’-AATGAGGGCAATCCGTCTTCA-3’ Seq. ID No. 578

Stat3	delantero	5’-ACCATTGACCTGCCGATGTC-3’ Seq. ID No. 579
	inverso	5’-TGAGCGACTCAAACTGCCCT-3’ Seq. ID No. 580
Srebf1c	delantero	5’-GGAGCCATGGATTGCACATT-3’ Seq. ID No. 581
	inverso	5’-GGCCCGGGAAGTCACTGT-3’ Seq. ID No. 582
Mlxipl	delantero	5’-CACTCAGGGAATACACGCCTAC-3’ Seq. ID No. 583
	inverso	5’-ATCTTGGTCTTAGGGTCTTCAGG-3’ Seq. ID No. 584
Pklr	delantero	5’-TCAAGGCAGGGATGAACATTG-3’ Seq. ID No. 585
	inverso	5’-CACGGGTCTGTAGCTGAGTGG-3’ Seq. ID No. 586
Acly	delantero	5’-ACCCTTTCACTGGGGATCACA-3’ Seq. ID No. 587
	inverso	5’-GACAGGGATCAGGATTTCCTTG-3’ Seq. ID No. 588
Crp	delantero	5’-ATGGAGAAGCTACTCTGGTGCC-3’ Seq. ID No. 589
	inverso	5’-ACACACAGTAAAGGTGTTCAGTGGC-3’ Seq. ID No. 590
Apcs	delantero	5’-GTCAGACAGACCTCAAGAGGAAAGT-3’ Seq. ID No. 591
	inverso	5’-AGGTTCGGAAACACAGTGTAAAATT-3’ Seq. ID No. 592
CD36	delantero	5’-AGATGACGTGGCAAAGAACAG-3’ Seq. ID No. 593
	inverso	5’-CCTTGGCTAGATAACGAACTCTG-3’ Seq. ID No. 594
Acadm	delantero	5’-AGGGTTTAGTTTTGAGTTGACGG-3’ Seq. ID No. 595
	inverso	5’-CCCCGCTTTTGTCATATTCCG-3’ Seq. ID No. 596

Contenido de acil-CoA de ácido nuclear

Se estimularon los hepatocitos primarios (6 x 106 células por muestra) con 50 µg/ml de aP2 por 2 horas. Las células se lavaron con PBS y los núcleos se aislaron sin detergente como se describe previamente en T. Nakamura *et al.*, un papel crítico para los complejos de PKR con TRBP en regulación Inmunometabólica y fosforilación de eIF2alfa en obesidad. *Cell Rep* 11, 295-307 (2015). Los lípidos en los núcleos aislados se extrajeron básicamente por el método Bligh-Dyer usando agua acidificada con ácido acético. El acil-CoA graso dividido en fase metanol/agua se recolectó.

Los acil-CoAs grasos se oxidaron por oxidasa de acil-CoA graso (Wako, Japón), proporcionando 2,3-trans-Enoil-CoAs y peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno se cuantificó por un sistema de detección fluorescente (Enzo Life Sciences, NY).

Ensayo de producción de Glucosa

Se infectaron hepatocitos primarios con ya sea Ad/shControl o Ad/shFoxo1 por 24 horas y además se incubaron en medio E de William fresco con 5% de FBS por 12 horas. Después de esto, las células se sometieron a inanición en suero durante la noche y se incubaron con ya sea el control o aP2 recombinante (50 µg/ml) en la presencia o ausencia de fosrcolina (2 µM) por 5 horas. Las células se lavaron dos veces con DMEM sin glucosa (Sigma) suplementado con 10 mM de HEPES y se incubaron con el mismo DMEM sin glucosa con 20 mM de glicerol en la presencia de las mismas concentraciones del vehículo, aP2 y/o foscolina por 2 horas. Se determinaron las concentraciones de glucosa en el medio usando el Kit de Ensayo Amplex Red Glucosa/Glucosa Oxidasa (Invitrogen).

Análisis de Manchado Western y experimentos de co-administración

Las proteínas se extrajeron de muestras de células o hígado con amortiguador A (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM de NaCl, 1% de Nonidet P-40, 1 mM de EDTA, 10 mM NaF, 2 mM Na_3VO_4) con inhibidores de proteasa completos (Sigma-Aldrich)

y se sometieron a electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida. Para detectar FoxO1 acetilado, se incluyeron 5 µM de tricosatina A (TSA) y 5 mM de nicotinamida en el amortiguador A para bloquear la desacetilación de la proteína FoxO1. Las membranas se incubaron con anti-FoxO1 (Señalización Celular, C29H4), anti-CtBP (Santa Cruz, E-12), anti-CtBP1 (BD), anti-CtBP2 (BD), anti-FLAG (Clontech), anti-GAPDH (Santa Cruz, FL-335), anti-Lamina A/C (Señalización Celular, 4C11), sustrato PKA anti-fosfo (Señalización Celular, #9621), anti-GUS (Invitrogen), anti-pAkt (Ser473, Señalización Celular, #9271), anti-Akt (Santa Cruz, H-136), anti-Ac-FKHR (Santa Cruz, D-19), anti-pFoxO1 (Ser 256, Señalización Celular, #9461) y anti-HNF4a (Santa Cruz, C-19). Las membranas se incubaron con el conjugado de anticuerpo secundario con peroxidasa de rábano picante (Santa Cruz) y se visualizaron usando el sistema quimioluminiscente mejorado (Roche Diagnostics). Para detectar la unión endógena de FoxO1 y CtBPs, el anticuerpo anti-FoxO1 (Santa Cruz, C-9), anticuerpo anti-CtBP (Santa Cruz, E-12), anti-CtBP2 (Santa Cruz, E-16), IgG de ratón control (generado en casa) o IgG de cabra control (Santa Cruz) fueron reticulados a dynabeads de Proteína G (Invitrogen) con 50 mM dimetil pimelimidato (Sigma-Aldrich). Los hepatocitos primarios o muestras de hígado fueron lisados con amortiguador A y el complejo de proteína fue immunoprecipitado en amortiguador A con

concentración reducida de NP40 (0.5%) (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5% Nonidet P-40, 1 mM EDTA, 10 mM NaF, 2 mM Na_3VO_4) por 4 h a 4 °C. Las perlillas se lavaron con el amortiguador A con 0.5% de NP40 sin EDTA cuatro veces, se eluyó con amortiguador de carga SDS y se analizó por análisis de manchado Western. Se realizó el estudio de co-inmunoprecipitación de la etiqueta FLAG como sigue. Los plásmidos que codifican FoxO1 de tipo silvestre de FLAG y CtBP1 son regalos generosos de Domenico Accili (Columbia University, NY) y Pere Puigserver (Harvard Medical School, MA), respectivamente. Se amplificó cADN de CtBP2 por PCR y se clonó en pcADN3.1(+) (Invitrogen). La porción de PSDL en FoxO1 fue ya sea mutado a PSAS o suprimido por el sistema de mutagénesis dirigido al sitio de gene tailor (Invitrogen). Las células HEK293 se transfectaron temporalmente con plásmidos de control, FoxO1 de tipo silvestre FLAG o FoxO1 FLAG mutado junto con ya sea CtBP1 o CtBP2 usando LTX lipofectamina (Invitrogen). Las células son lisadas con amortiguador A con 1% de NP40 e inmunoprecipitado con perlillas magnéticas FLAG M2 (Sigma) en amortiguador A con 0.5% de NP40 por 4 horas a 4°C. Las perlillas se lavaron cuatro veces con amortiguador A, con 0.5% de NP40 y se eluyeron con 0.5 mg/ml del péptido FLAG 3x (Sigma). Para evaluar el efecto de Oleilo-CoA y NADH, los lisados celulares se inmunoprecipitaron con perlillas magnéticas FLAG M2 con

concentraciones incrementadas de oleoil-CoA o NADH por 4 h a 4 °C. Después de esto, el complejo FoxO1/CtBP2 se eluyó y se analizó de la misma forma.

Ensayo de absorción de ácido graso

Se conjugó [1-^{14}C]oleato (59.0 mCi/mmol, PerkinElmer) con BSA (libre de ácido graso, Sigma, BSA:oleato = 1:6). Se incubaron hepatocitos primarios con aP2 recombinante (50 µg/ml) por 2 h y se agregó el complejo [1-^{14}C]oleato-BSA para dar una concentración final de 150 µM. Después del periodo de tiempo indicado, las células se colocaron en hielo, se lavaron con PBS frío conco veces y se sometieron a lisis con NaOH 0.1N para medir la radioactividad y concentraciones de proteína.

Oxidación de ácido graso

Se sembraron hepatocitos primarios en microplacas de cultivo celular XF96 recubiertas con colágeno tipo I (Sigma) (Seahorse Bioscience) a una densidad de 7 x 10^3/cavidad. Las células se trataron con aP2 recombinante (50 µg/ml) por 2 h en medio sin suero Williams E, posteriormente el medio de cultivo se cambió a amortiguador Krebs-Henseleit (111 mM de NaCl, 4.7 mM de KCl, 1.25 mM de $CaCl_2$, 2 mM de $MgSO_4$, 1.2 mM de NaH_2PO_4, 2.5 mM de glucosa, 0.5 mM de carnitina, 5 mM de HEPES pH 7.4) con las mismas concentraciones del vehículo o aP2 recombinante. Las velocidades de consumo de oxígeno (O_2) (OCR) se midieron

antes y después de la exposición a 150 µM de palmitato conjugado con BSA (Seahorse Bioscience).

Inmunocitoquímica

Hepatocitos primarios se incubaron como se describe anteriormente por 90 minutos y se fijaron en 4% de paraformaldehído por 10 minutos a temperatura ambiente. Las células se permeabilizaron con 0.1% de Triton X-100 por 10 min y se bloqueo con 10% de suero de moni (Sigma) por 1 hora. Los anticuerpo primarios empleados para detectar CtBP2 y FoxO1 fueron anticuerpo E-16 CtBP2 policrlonal de cabra (Santa Cruz, 1:50) y una mezcla de anticuerpos FoxO1 policlonales de conejo que contienen ab39670 (Abcam®, 1:100), C29H4 (Señalización Celular, 1:100) y H-128 (Santa Cruz, 1:100), respectivamente. Se aplicaron IgG anti-cabra de mono conjugado a Alexa Fluor® 568 e IgG anti-conejo de mono conjugado a Alexa Fluor® 647 como anticuerpos secundarios (Life Technologies, 1:200).

Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)

Se incubaron hepatocitos primarios como se describe anteriormente por 90 minutos y se fijaron en 1% de formaldehído por 10 minutos a temperatura ambiente. Se apagó la reticulación agregando glicina a una concentración final de 125 mM. Posteriormente, el ensayo ChIP se llevó a cabo usando el Kit de Inmunoprecipitación de Cromatina Magna ChIP HiSens (EMD Millipore) con modificaciones menores: el corte

de cromatina se logró por Nucleasa Micrococcica (Señalización Celular). La cromatina fue inmunoprecipitada ya sea con IgG de control, anti-FoxO1 (Abcam®, ab39670) o anti-CtBP2 (Santa Cruz, E-16). El ADN inmunoprecipitado y ADN de entrada se cuantificaron por PCR en tiempo real con cebadores específicos para el promotor del gen G6pc. Véase, Hall, J.A., Tabata, M., Rodgers, J.T. & Puigserver, P. USP7 attenuates hepatic gluconeogenesis through modulation of FoxO1 gene promoter occupancy. *Molecular endocrinology* 28, 912-924 (2014).

Medición de lactato/piruvato celular

Para estimar la relación citosólica NAD^+/NADH, se midieron contenidos celulares de lactato y piruvato con un kit (Cayman Chemical). Cuando la conversión entre piruvato/NADH y lactato/NAD está en equilibrio, la relación citosólica NAD^+/NADH podría ser estimada por la relación de lactato/piruvato. Véase, Williamson, D.H., Lund, P. & Krebs, H.A. The redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide in the cytoplasm and mitochondria of rat liver. *The Biochemical Journal* 103, 514-527 (1967).

aP2 regula ascendentemente la expresión del gen gluconeogénica en una manera dependiente de FoxO1

Actuando como una adipocina, la aP2 regula ascendentemente directamente la expresión de genes gluconeogénicos tanto en hígado *in vivo*, como en hepatocitos

in vitro. *Véase*, Cao, H., *et al.* Adipocyte lipid chaperone AP2 is a secreted adipokine regulating hepatic glucose production. *Cell metabolism* 17, 768-778 (2013).

Puesto que la extensión de la regulación ascendente es modesta en sistemas de cultivo celular, ajustes experimentales adicionales se examinaron para obtener regulación ascendente más robusta de estos genes. Se ha descubierto que la presencia de señales que inmitan el ayuno incrementa el efecto de aP2 en la expresión del gen. Por ejemplo, la forscolina (una ctivador de adenilato ciclasa) y glucagón (datos no mostrados) mejora la capacidad de aP2 para regular ascendentemente la expresión del gen *G6pc* y *Pck1* en hepatocitos primarios (Figuras 38A y 38B). Contrariamente, el bloqueo de la señalización de cAMP-PKA con H89 abole el efecto de aP2 (Figuras 38C y 38D).

Además, las bases moleculares de la regulación del gen gluconeogénico por aP2 en este ajuste han sido identificadas como se describe en la presente. Tanto aP2 deslipidado como una forma mutante de aP2 que carece de capacidad de unión lípida (R126L, Y128F) (Erbay, E., *et al.* Reducing endoplasmic reticulum stress through a macrophage lipid chaperone alleviates atherosclerosis. *Nature Medicine* 15, 1383-1391 (2009)) fallan para regular ascendentemente la expresión del gen gluconeogénico en la presencia de forscolina, (Figuras 32A y 32B), indicando que el cargo

lípido aP2 es un mediador importante de esta actividad.

Tal exclusión génica de siARN se usó para seleccionar varios factores y cofactores de transcripción hepática claves, tales como FoxO1, factor 1α inducible por hipoxia (Hif1α), transductor de señal y activador de la transcripción 3 (Estat3), coactivador 1α del receptor gamma activado por el proliferador de peroxisoma (PGC-1α, Ppargc1a), proteínas α de unión potenciadoras de CCAAT (C/EBPα, Cebpa) y receptor glucocorticoide (GR, subfamilia 3 grupo C miembro 1 del receptor nuclear, Nr3c1) por su capacidad para abrogar el efecto de aP2 en la expresión del gen. Entre estos, la exclusióng génica de FoxO1, la cual ha sido previamente mostrada por jugar un papel crítico en la regulación de la transcripción de la expresión del gen gluconeogénico (véase, Lin, H.V. & Accili, D. Hormonal regulation of hepatic glucose production in health and disease. *Cell metabolism* 14, 9-19 (2011)), aplana muy marcadamente el fecto de aP2 en la expresión de G6pc (Figuras 32C, 39A-39H).

Este hallazgo se validó además por el suministro de shARN mediado por adenovirus. La exclusión génica de FoxO1 mediada por adenovirus nuevamente disminuyó significantemente la regulación ascendente de la expresión del gen *G6pc* inducida por aP2 (Figuras 32D y 32E). Consistente con este hallazgo, la aP2 incrementa la actividad de un reportero de

luciferasa sensible a FoxO (FHRE) en hepatocitos primarios, y este efecto fue más pronunciado en la presencia de forscolina (Figura 32F). El tratamiento con aP2 no tiene influencia en los niveles de expresión de *Foxo1* (Figura 39H). Además, aP2 incrementa la producción de glucosa a partir de hepatocitos en una manera dependiente de FoxO1 (Figura 32G).

La aP2 extracelular altera el metabolismo de ácido graso en hepatocitos

Puesto que la aP2 es una proteína de unión al ácido graso y la deficiencia genética y neutralización mediada por el anticuerpo de aP2 se conoce por alterar el metabolismo del ácido graso sistémico (Hotamisligil, G.S., *et al.* Uncoupling of obesity from insulin resistance through a targeted mutation in aP2, the adipocyte fatty acid binding protein. *Science (New York, N.Y.)* 274, 1377-1379 (1996); Maeda, K., *et al.* Adipocyte/macrophage fatty acid binding proteins control integrated metabolic responses in obesity and diabetes. *Cell metabolism* 1, 107-119 (2005); Cao, H., *et al.* Regulation of metabolic responses by adipocyte/macrophage Fatty Acid-binding proteins in leptin-deficient mice. *Diabetes* 55, 1915-1922 (2006)), el efecto del tratamiento de aP2 exógeno en el metabolismo de ácido graso en hepatocitos fue evaluado. El efecto de aP2 fue significantemente disminuido en la presencia de etomoxir, un inhibidor de la oxidación del ácido graso (Figuras 33A y 33B). Estos datos sugieren que la aP2

está regulando la expresión del gen gluconeogénico inhibiendo la oxidación del ácido graso. Consistente con este hallazgo, la aP2 reduce el incremento estimulado por palmitato en la oxidación de ácido graso, como se mide por la velocidad de consumo de oxígeno después de la inyección de palmitato (Figura 33C). Además, la absorción de ácido graso incrementa fuertemente la aP2 en hepatocitos (Figura 33D) que sugiere que la extensión de la inhibición de la oxidación del ácido graso por aP2 observada (Figura 33C) puede ser una subestimación. Sin embargo, el palmitato suministrado exógenamente incrementa la extensión de la expresión del gen gluconeogénico inducida por aP2 (Figuras 33E y 33F).

Una vez tomado en las células, los ácidos grasos son esterificados con CoA para formar tioésteres de acil-CoA graso, y transportados a organelos tales como mitocondria y retículo endoplásmico fueron utilizados para oxidación y síntesis lípida. Véase, Mashek, D.G. & Coleman, R.A. Cellular fatty acid uptake: the contribution of metabolism. *Current opinion in lipidology* 17, 274-278 (2006) y Anderson, C.M. & Stahl, A. SLC27 fatty acid transport proteins. *Molecular aspects of medicine* 34, 516-528 (2013). Después del tratamiento con aP2, un incremento de la absorción de ácido graso con decline concomitante de oxidación de ácido graso podría causar presumiblemente, la acumulación de acil-CoAs grasa citosólicas, la cual se ha mostrado por jugar papeles

reguladores en enfermedades metabólicas. Véase, DeFronzo, R.A. Insulin resistance, lipotoxicity, type 2 diabetes and atherosclerosis: the missing links. The Claude Bernard Lecture 2009. *Diabetologia* 53, 1270-1287 (2010). Para probar si el efecto del palmitato en la expresión del gen gluconeogénico inducida por aP2 involucra acil-CoA citosólico, se usó el inhibidor de acil-CoA sintetasa, Triascina C. Véase, Mashek, D.G. & Coleman, R.A. Cellular fatty acid uptake: the contribution of metabolism. *Current opinion in lipidology* 17, 274-278 (2006). La inhibición química de acil-CoA sintetasa disminuye significantemente la capacidad del palmitato exógeno para mejorar el efecto de aP2 en la expresión del gen (Figuras 33G y 33H). Además, el tratamiento de hepatocitos primarios con aP2 induce un incremento significante en la acumulación de acil-CoA grasa nuclear (Figura 33I). Tomados en conjunto, estos datos indican que tanto el flujo lípido como el cambio en las células vivas son modulados por aP2, y que esto subraya el efecto de aP2 en la expresión del gen gluconeogénico.

Un complejo represivo novedoso, FoxO1/CtBP2, es mutado por aP2

El FoxO1 no ha sido previamente mostrado por ser regulado por el medio lípido intracelular. Por lo tanto, moléculas las cuales podrían ligar la señalización lípida a la activación de FoxO1 fueron examinadas. Las proteínas de

unión C-terminal (CtBPs) son represores transcripcionales que han sido mostrados por unirse no solamente al dinucleótido de nicotinamida adenina (NAD^+/NADH) sino también a acil-CoAs grasos. Véase, Nardini, M., *et al.* CtBP/BARS: a dual-function protein involved in transcription co-repression and Golgi membrane fission. *The EMBO journal* 22, 3122-3130 (2003). De manera importante, la unión de NAD^+/NADH induce un cambio conformacional de CtBPs u promueve la homo-dimerización y formación de una forma represora activa, mientras la unión de acil-CoA induce la conformación monomérica. Véase, Nardini, M., *et al.* CtBP/BARS: a dual-function protein involved in transcription co-repression and Golgi membrane fission. *The EMBO journal* 22, 3122-3130 (2003). En el sistema experimental, se examinó el papel de cada una de las dos isoformas de CtBP en la expresión del gen mediada por aP2. Mientras la exclusión génica de CtBP1 no tiene impacto en la expresión del gen inducido por aP2, la exclusión génica de CtBP2 bloquea el efecto de aP2 (Véase Figuras 34A, 34B, 40A, 40B, 40C y 40D). Notablemente, aunque el factor nuclear del hepatocito 4 α (HNF4α) es un factor de transcripción gluconeogénico bien conocido con afinidad de unión contra acil-CoAs de cadena grasa larga (Hertz, R., Magenheim, J., Berman, I. & Bar-Tana, J. Fatty acyl-CoA thioesters are ligands of hepatic nuclear factor-4alpha. *Nature* 392, 512-516 (1998)) no se observó un efecto de exclusión génica de HNF4α

en la expresión del gen mediada por aP2 (Figuras 40E y 40F).

CtBPs se une a porciones PxDLx en proteínas de unión al ADN. *Véase*, Chinnadurai, G. Transcriptional regulation by C-terminal binding proteins. *The international journal of biochemistry & cell biology* 39, 1593-1607 (2007) and Turner, J. & Crossley, M. The CtBP family: enigmatic and enzymatic transcriptional co-repressors. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 23, 683-690 (2001). El análisis de secuencia describió porciones PxDLx en proteínas FoxO humanas y de ratón múltiples (Figura 34C), sugiriendo el potencial para la interacción directa entre FoxOs y CtBPs. Experimentos de co-inmunoprecipitación revelaron un complejo endógeno de FoxO1/CtBP en hepatocitos primarios (Figuras 34D y 34E). La mutación o supresión de la porción PSDL en FoxO1 reduce específicamente la interacción entre FoxO1 y CtBP2, pero no disminuye la interacción entre FoxO1 y CtBP1 u otro asociado de unión, β-catenina (Figuras 34F, 34G, 41A y 41B), indicando que CtBP2 se une directamente a FoxO1 a través de su porción PxDLx mientras el CtBP1 puede unirse a FoxO1 indirectamente o a través de otros sitio(s) de interacción. De manera remarcable, después de la estimulación de hepatocitos primarios con aP2, el FoxO1 se disocia de CtBP2 (véase Figuras 34H, y 41C).

Mientras el efecto de NAD^+/NADH en la represión transcripcional por CtBPs ha sido completamente investigado,

[Zhang, Q., Piston, D.W. & Goodman, R.H. Regulation of corepressor function by nuclear NADH. *Science (New York, N.Y.)* 295, 1895-1897 (2002); Kumar, V., *et al.* Transcription corepressor CtBP is an NAD(+)-regulated dehydrogenase. *Molecular cell* 10, 857-869 (2002); Fjeld, C.C., Birdsong, W.T. & Goodman, R.H. Differential binding of NAD+ and NADH allows the transcriptional corepressor carboxyl-terminal binding protein to serve as a metabolic sensor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 9202-9207 (2003); y Thio, S.S., Bonventre, J.V. & Hsu, S.I. The CtBP2 co-repressor is regulated by NADH-dependent dimerization and possesses a novel N-terminal repression domain. *Nucleic Acids Research* 32, 1836-1847 (2004)), el efecto de acil-CoA graso en la actividad represora transcripcional de CtBPs no ha sido estudiado. Véase, Valente, C., Spano, S., Luini, A. & Corda, D. Purification and functional properties of the membrane fissioning protein CtBP3/BARS. *Methods In Enzymology* 404, 296-316 (2005). Para elucidar esto, concentraciones incrementadas de oleoil-CoA se agregaron en los lisados celulares y se encontró que este tratamiento resultó en la disociación de los complejos FoxO1/CtBP2 en una manera dependiente de la dosis (Figura 34I). Por el contrario, también se observó la formación incrementada del complejo FoxO1/CtBP2 en la presencia de NADH exógeno (véase Figura

34J). Los CtBPs se han reportado por ser un sensor rédox que detecta la relación NAD^+/NADH (Zhang, Q., Piston, D.W. & Goodman, R.H. Regulation of corepressor function by nuclear NADH. *Science (New York, N.Y.)* 295, 1895-1897 (2002); Chinnadurai, G. Transcriptional regulation by C-terminal binding proteins. *The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology* 39, 1593-1607 (2007)), de este modo se examinó si el complejo FoxO1/CtBP2 puede responder al estado rédox citosólico o relación NAD^+/NADH. Células HEK293 transfectadas con FLAG-FoxO1 y CtBP2 se trtaron con diferentes relaciones de lactato/piruvato extracelular para cambiar el estado rédox citosólico. La formación del complejo FoxO1/CtBP2 se mejoró en células con una alta relación de lactato/piruvato celular (baja relación citoxólica NAD^+/NADH) (véase Figura 34K). Estos datos sugieren que el complejoe FoxO1/CtBP2 no es regulado solamente por acil-CoA graso, sino también por NAD^+/NADH. Por lo tanto, después se cuestionó si el tratamiento con aP2 altera directamente la relación citosólica NAD^+/NADH. Puesto que la relación citosólica NAD^+/NADH es reflejada en la relación celular de piruvato/lactato asumiendo equilibrio de lactato deshidrogenasa, se midió la relación celular de lactato/piruvato en el mismo ajuste experimental como en las Figuras 33E y 33F. La relación de lactato/piruvato tiende a ser incrementada por aP2 en la presencia o ausencia de

palmitato pero la diferencia no fue significante (véase FIG. 41D). La inhibición de la oxidación de ácido graso fue reportada por incrementar la produción de lactato. Véase, Pike, L.S., Smift, A.L., Croteau, N.J., Ferrick, D.A. & Wu, M. Inhibition of fatty acid oxidation by etomoxir impairs NADPH production and increases reactive oxygen species resulting in ATP depletion and cell death in human glioblastoma cells. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1807, 726-734 (2011). Por lo tanto, esta tendencia hacia un incremento de la relación de lactato/piruvato podría ser secundaria a la inhibición de la oxidación de ácido graso. Se investigó una acción directa de aP2 en los ajustes experimentales relativamente agudos. De este modo, la aP2 regula la formación del complejo FoxO1/CtBP2 principalmente modulando el contenido de acil-CoA graso celular aunque la aP2 podría influenciar la relación NADH/NAD^+ en segundo lugar en un proceso a largo plazo. La actividad de FoxO es regulada en parte por el intercambio citoplásmico nuclear a través de modificaciones pos-traduccionales tales como fosforilación y acetilación. Véase, Eijkelenboom, A. & Burgering, B.M. FOXOs: signalling integrators for homeostasis maintenance. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 14, 83-97 (2013). Se encontró que el tratamiento con aP2 tiende a incrementar el contenido nuclear de FoxO1 en hepatocitos, aunque el cambio de contenido citosólico fue insignificante (véase Figuras 34L y

41E). En adición, el intercambio citoplásmico nuclear de CtBP2 por estos estímulos no se observó. De manera intersante, el tratamiento de forscolina y aP2 no alteró boviamente los niveles de fosforilación de FoxO1 y modificación de acetilación (véase Figura 41F), los cuales se conocen por refular el intercambio citoplásmico nuclear de la proteína.

La ocupación promotora de CtBP2 así como también FoxO1 por ensayo de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) fueron además investigados. La exposición a aP2 causa disociación de CtBP2 a partir del promotor *G6pc* en la ausencia o prescencia de forscolina (Figuras 34M y 34N). El FoxO1 se reclutó al promotor *G6pc* por tratamiento de aP2 aunque el efecto fue marginal (Figuras 34M y 34N).

CtBP2 regula fuertemente la expresión del gen gluconeogénico

Las características de este sistema transcripcional nuevamente definido fueron además investigadas. Los CtBPs se conocen por ser represores, pero funcionan como activadores en algunos casos. *Váse*, Fang, M., *et al.* C-terminal-binding protein directly activates and represses Wnt transcriptional targets in Drosophila. *The EMBO journal* **25**, 2735-2745 (2006). Por lo tanto, los efectos de CtBP2 en la expresión del gen gluconeogénico mediada por FoxO1 fueron investigados. La exclusión génica de CtBP2 regula ascendentemente la expresión de *G6pc* (Figura 35A) y *Pck1* (datos no mostrados) en

hepatocitos primarios, y este efecto fue mejorado en la presencia de forscolina, el cual fue también el caso con la regulación ascendente mediada por aP2 de estos genes. Además, la regulación ascendente de estos genes por la exclusión génica de CtBP2 se disminuyó por la exclusión génica simultánea de FoxO1 (Figura 35A). La exclusión génica de CtBP2 también activó al reprotaro de luciferasa sensible de FoxO (Figura 35B). Contrariamente, la sobreexpresión de CtBP2 regula descendentemente la expresión de *G6pc* en el valor de referencia y la regulación ascendente inducida por forscolina de *G6pc* y *Pck1* fueron fuertemente suprimidas por la sobreexpresión de CtBP2 comparada con la sobreexpresión de β-glucuronidasa (GUS) (véase Figuras 35C, 35D y 35E). Para establecer la posibilidad de la represión transcripcional general que ocurre después de la sobreexpresión de CtBP2, la expresión de genes de hepatocitos múltiples fue evaluada. Algunos genes que regulan el metabolismo celular fueron regulados ascendentemente (por ejemplo, *Acadm*) otros estuvieron sin cambio (por ejemplo, *Alb*, *Creb1*) (véase Figuras 36A – 36N) y datos no mostrados), sugiriendo un efecto específico de CtBP2. La regulación descendente de genes dirigudos a FoxO1 después de la sobreexpresión de CtBP2 también fue verificada por la actividad del reportero luciferasa sensible a FoxO (Figura 35F).

También se investigó si la insulina y señalización

de cAMP regulan el complejo transcripcional de FoxO1/CtBP2, puesto que estas trayectorias han sido previamente mostradas por regular la actividad transcripcional de FoxO1. *Véase*, Brunet, A., *et al.* Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96, 857-868 (1999); Nakae, J., *et al.* Regulation of insulin action and pancreatic beta-cell function by mutated alleles of the gene encoding forkhead transcription factor Foxo1. *Nature Genetics* 32, 245-253 (2002); y Mihaylova, M.M., *et al.* Class IIa histone deacetylases are hormone-activated regulators of FOXO and mamM dealian glucose homeostasis. *Cell* 145, 607-621 (2011). Como se muestra en la presente, se observó una activación aguda de estas trayectorias no alteran fuertemente la formación del complejo FoxO1/CtBP2 a través de un leve incremento del complejo FoxO1/CtBP2 por el tratamiento de insulina (Figura 35G), la cual puede ser causada por una relación incrementada de NADH/NAD^+ a través del flujo glicolítico mejorado.

La actividad de aP2 de circulación disocia el holocomplejo de FoxO1/CtBP2 holocomplex *in vivo*

Para explorar además la relevancia de la modulación de aP2 del complejo FoxO1/CtBP2, la formación del complejo transripcional se analizó *in vivo*. Puesto que el contenido de acil-CoA graso incrementada y NAD^+ disminuida en el hígado de ratones obesos ha sido reportado (Samuel, V.T., *et al.*

Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *The Journal of Biological Chemistry* 279, 32345-32353 (2004); HamM deond, L.E., *et al.* Mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase-1 is essential in liver for the metabolism of excess acyl-CoAs.*The Journal of Biological Chemistry* 280, 25629-25636 (2005); Cheng, Z., *et al.* Foxo1 integrates insulin signaling with mitochondrial function in the liver. *Nature Medicine* 15, 1307-1311 (2009); and Eckel-Mahan, K.L., *et al.* ReprogramM deing of the circadian clock by nutritional challenge. *Cell* 155, 1464-1478 (2013)) la actividad corepresora disfuncional de CtBPs podría subrayar la gluconeogénesis hepática no regulada en obesidad. En el hígado de ambos ratones obesos inducidos por dieta e inducidos genéticamente, los cuales tienen niveles elevados de aP2 de circulación (Cao, H., *et al.* Adipocyte lipid chaperone aP2 is a secreted adipokine regulating hepatic glucose production. *Cell Metabolism* 17, 768-778 (2013)), la asociación de FoxO1/CtBP2 fue dramáticamente reducida comparada conlos controles magros (véase Figuras 36A, 36B, 36C y 36D). En adición, tanto la deficiencia genética de aP2 como la neutralización mediada por el anticuerpo de aP2 (usando CA33 monoclonal anti-aP2) mejora fuertemente la formación del complejo FoxO1/CtBP2 (Figuras 36E, 36F, 36G y 36H), consistente con la reducción en la producción de glucosa hepática en estos animales. *Véase*, Maeda, K., *et al.*

Adipocyte/macrophage fatty acid binding proteins control integrated metabolic responses in obesity and diabetes. *Cell Metabolism* 1, 107-119 (2005); Cao, H., *et al.* Adipocyte lipid chaperone aP2 is a secreted adipokine regulating hepatic glucose production. *Cell Metabolism* 17, 768-778 (2013).

Para determinar si aP2 de circulación elevado fue suficiente para alterar el complejo FoxO1/CtBP2, se administró aP2 recombinante por inyección IP en ratones flacos de tipo silvestre por 5 días, lo cual resultó en un incremento leve de niveles de aP2 en suero (Figura 36I), similar al nivel observado en ratones obesos [Cao, H., *et al.* Adipocyte lipid chaperone aP2 is a secreted adipokine regulating hepatic glucose production. *Cell Metabolism* 17, 768-778 (2013)]. Este incremento a corto plazo en la aP2 de circulación resulta en una reducción significnate en la interacción de FoxO1/CtBP2 en el hígado (Figura 36J y 36K), lo cual conduce a un incremento selectivo en la expresión de *G6pc* (Figura 36L). De manera importante, este tratamiento agudo no afectó el peso corporal o parámetros metabólicos en suero tales como insulina, glucagón, ácidos grasos libres o glicerol (Figuras 43A, 43B, 43C, 43D, 43E, 43F y 43G).

Puesto que la sobreexpresión de CtBP2 en hepatocitos regula descendentemente la expresión del gen gluconeogénico (Figuras 35D y 35E), el potencial terapéutico de esta trayectoria de señalización se investigó *in vivo* por

sobreexpresión de CtBP2 en el hígado de ratones obesos inducidos con dieta por el suministro del gen mediado por adenovirus. Tres días después de la transducción del adenovirus, los niveles de glucosa en sangre en ayunas normalizaron la sobreexpresión de CtBP2 en ratones obesos sin inducir pérdida de peso (Figuras 37A, 37B, y 45A). En un grupo independiente, 3 días de sobrexpresión de CtBP2 adenoviral en ratones obesos resultó en mejoramiento marcado en la tolerancia a la glucosa (Figura 37C). Este mejoramiento no fue debido a cambios en la sensibilidad a la insulina, como se determina por la prueba de tolerancia a la insulina después de 5 días de transducción adenoviral (Figuras 37D, 45E y 45F). Para evaluar más directamente la producción de glucosa hepática en este modelo, se realizó una prueba a la toleranca de piruvato, y se observó que la sobreexpresión de CtBP2 resultó en una excursión de glucosa significantemente despuntada después de la inyección de piruvato (Figura 37Q). Consistente con este hallazgo, la expresión de *G6pc* en hígado fue fuertemente regulada descendentemente en animales que sobreexpresan CtBP2 mientras la expresión del gen *Alb* no fue afectada (Figuras 37E, 37F y 37G).

Además, se observó una reducción de la acumulación lípida hepática en ratones obesos después de 7 días de sobreexpresión de CtBP2 (Figura 37H). El mejoramiento dramático de esteatosis hepática es otra característica de

supresión genética y neutralización mediada por el anticuerpo de aP2. Véase, Maeda, K., *et al.* Adipocyte/macrophage fatty acid binding proteins control integrated metabolic responses in obesity and diabetes. *Cell Metabolism* 1, 107-119 (2005); Cao, H., *et al.* Regulation of metabolic responses by adipocyte/macrophage Fatty Acid-binding proteins in leptin-deficient mice. *Diabetes* 55, 1915-1922 (2006). La reducción de esteatosis por sobreexpresión de CtBP2 también fue verificada por la medición de triglicéridos en hígado (Figura 37I) y esto es acompañado por una reducción de los niveles de alanina aminotransferasa (ALT) en suero (Figura 37J). Consistente con estos hallazgos, la expresión del gen lipogénico fue fuertemente regulada descendentemente por la sobreexpresión de CtBP2 (Figuras 37K, 37L, 37M, 37N y 37O). Este perfil de expresión también se observó en hepatocitos primarios en una manera autónoma a la célula (Figuras 45A, 45B, 45C y 45D). La sobreexpresión de CtBP2 disminuye los niveles de expresión de estos genes en hepatocitos de exclusión génica de FoxO1 (Figuras 45E y 45F), lo cual sugiere que CtBP2 regula la expresión lipogénica en una manera independiente de FoxO1. Un papel para CtBP2 en la represión de la esteatosis hepática también se mostró por pérdida de la función de CtBP2. Catorce días después de la transducción de Ad/shCtBP2, la exclusión génica de CtBP2 resultó en una acumulación de triglicéridos en el hígado en ratones magros en una dieta de comida normal

(Figuras 45G y 45H), la cual se acompañó por la expresión incrementada de genes lipogénicos (Figuras 45I y 45J).

En sumario, los mecanismos moleculares que fundamentan la acción de la proteína aP2 de circulación fueron investigados, y se investigó un nuevo holocomplejo transcripcional compuesto de FoxO1 y CtBP2 el cual detecta los nutrientes celulares tales como acil-CoA graso y NAD^+/NADH. Modulando el metabolismo de ácido graso, la aP2 media la disociación del complejo FoxO1/CtBP2, liberando FoxO1 para accionar la expresión del gen gluconeogénico (Figura 37P).

Además, la adipocina aP2 es elevada bajo condiciones de ayunas, donde actúa para incrementar la produción de glucosa hepática a través de la modulación de la actividad de FOXO1. En las células beta pancreáticas, el FOXO1 es un regulador clave de la función de células beta, actuando como un factor de transcripción contra-regulador a PDX1 (homocaja duodenal y pancreática 1). Bajo condiciones de estrés, tales como ayuno prolongado, el FOXO1 se trasloca al núcleo donde desplaza la unión a PDX1 y activa la expresión de genes de respuesta al estrés que incluyen aquellos para proteínas de respuesta de proteína no plegada y antioxidante (UPR). La adición de aP2 recombinante a isletas humanas y de ratón primarias promueve la translocación de FOXO1 (Figura 46A), sugiriendo que la aP2 puede actuar para modular la función celular beta a través de una trayectoria dependiente de FOXO1.

Evidencia adicional de esto se muestra con la expresión incrementada de genes dirigidos a FOXO1 y proteínas subsecuentes después de 24 horas de tratamiento en células INS1 (Figura 46B y Figura 46C).

En la ausencia de aP2, la translocación de FOXO1 se reduce, de este modo permitiendo la actividad incrementada de PDX1. La actividad mejorada de PDX1 podría corresponder a la expresión incrementada de insulina, detección mejorada de la glucosa debido a la regulación ascendente del transportador de glucosa y glucocinasa, y susceptibilidad reducida a la apoptosis. De este modo, el agotamiento de aP2 através de la supresión genética o tratamiento de anticuerpo, puede actuar para prevenir T1D a través de un mecanismo dependiente de FOXO1.

Ejemplo 7: la deficiencia en aP2 resulta en función mejorada de las vías respiratorias en ratones con exclusión génica de aP2 después de la inhalación de un agente broncoconstrictor (metacolina)

Ratones genéticamente deficientes en aP2 y de tipo silvestre originados en una dieta regular hasta 11-13 semanas de edad fueron sensbilizados con 100 microgramos de ovalbúmina (OVA) inyectada intraperitonealmente (IP) el día del experimento 0 y 14. Los animales fueron entonces nebulizados con 1% de OVA en PBS en los días 28, 30, 32 y 33. Las mediciones experimentales se recolectaron el día 34. La

resistencia de las vías respiratorias se midió durante la estimulación con un constrictor bronquial, metacolina, a concentraciones incrementadas. Los ratones fueron nebulizados con metacolina por 20 minutos y las mediciones repetitivas se tomaron por 3 minutos por un total de 12 mediciones consecutivas usando el aparato FlexiVent (Scireq, Scientific Respiratory Equipment, Canada). Los resultados mostrados en la Figura 47 ilustran que ratones deficientes en ap2 tienen función mejorada de las vías respiratorias durante la estimulación con metacolina comparado con ratones de tipo silvestre bajo las mismas condiciones.

Esta especificación ha sido descrita con referencia a modalidades de la invención. Sin embargo, uno de habilidad ordinaria en la técnica aprecia que varias modificaciones y cambios pueden hacerse sin apartarse del alcance de la invención como se expone en las reivindicaciones siguientes. Por consiguiente, la especificación es considerada en un sentido ilustrativo en lugar de restrictivo, y todas de tales modificaciones están propuestas para estar incluidas dentro del alcance de la invención.

Se hace constar que con relación a esta fecha, el mejor método conocido por la solicitante para llevar a la práctica la citada invención, es el que resulta claro de la presente descripción de la invención.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere al área de anticuerpos ani-aP2 y agentes de unión al antígeno mejorados, y composiciones de los mismos, los cuales dirigen la chaperona lípida aP2/FABP4 (referida como "aP2") para uso en tratamiento de trastornos tales como diabetes, obesidad, enfermedad cardiovascular, enfermedad de hígado hepático, y/o cáncer, entre otros. En un aspecto, se describen tratamientos mejorados para trastornos mediados por aP2 en los cuales el aP2 del suero es dirigido y la actividad biológica de aP2 es neutralizada o modulada usando anticuerpos monoclonales aP2 de baja afinidad de unión, proporcionando niveles inferiores de glucosa en sangre en ayunas, metabolismo de glucosa sistémica mejorado, sensibilidad a la insulina sistémica incrementada, masa grasa reducida, esteatosis hepática reducida, enfermedad cardiovascular reducida y/o un riesgo reducido de desarrollar la enfermedad cardiovascular.

LAG\LAG\ID-547718\WPC23875