

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 952 132**

51 Int. Cl.:

C07K 16/40 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)
C12N 9/99 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.03.2016 PCT/JP2016/057030**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **15.09.2016 WO16143753**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.03.2016 E 16761721 (6)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.05.2023 EP 3266872**

54 Título: **Nuevo anticuerpo anti-PAD4**

30 Prioridad:

06.03.2015 JP 2015044518

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

27.10.2023

73 Titular/es:

**PUBLIC UNIVERSITY CORPORATION
 YOKOHAMA CITY UNIVERSITY (33.3%)
 22-2, Seto, Kanazawa-ku
 Yokohama-shi, Kanagawa 236-0027, JP;
 PUBLIC UNIVERSITY CORPORATION NAGOYA
 CITY UNIVERSITY (33.3%) y
 PHARMA FOODS INTERNATIONAL CO., LTD.
 (33.3%)**

72 Inventor/es:

**SATO, MAMORU;
 YAMADA, MICHYUKI;
 KANAZAWA, SATOSHI;
 TOYOURA, MASAYOSHI;
 SHOYA, YUJI;
 SAITO, KENJI y
 YAMAZAKI, CHIHIRO**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 952 132 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Nuevo anticuerpo anti-PAD4

Ámbito técnico

La presente invención se refiere a nuevos anticuerpos anti-PAD4.

5 Técnica anterior

Peptidylarginina deiminasa 4 (PAD4) es conocida como una enzima que participa en la citrulinación de una arginina en una proteína. Esta citrulinación implica una reacción tal que una arginina, que es el aminoácido más básico entre los aminoácidos que constituyen una proteína, se convierte en una citrulina neutra. Esto es importante para la estructura de la proteína y la reacción mediada por la proteína.

10 Al parecer, la citrulinación afecta a la artritis reumatoide (AR). Por ejemplo, en la AR, un péptido cíclico citrulinado (PCC) está presente como antígeno en la membrana sinovial. De este modo, un anticuerpo anti-CCP está disponible comercialmente como agente de diagnóstico de la AR.

15 Existen algunos informes sobre PAD4 y AR. Por ejemplo, la Bibliografía no patentada 1 informa de la asociación entre la aparición de la AR y un polimorfismo de un solo nucleótido del gen PAD4. Además, Bibliografía no patentada 2 informa del uso de un anticuerpo anti-PAD4 para el diagnóstico de la AR. Asimismo, la Bibliografía de Patentes 1 describe que una mezcla que contiene 4 anticuerpos anti-PAD4 diferentes se administra a ratones para suprimir la AR (véase el Ejemplo 2 de la Bibliografía de Patentes 1).

Lista de citas**Bibliografía sobre patentes**

20 [Bibliografía sobre patentes 1] WO2012/026309

Bibliografía no patentada

[Bibliografía no patentada 1] "Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis", Suzuki et al., Nat Genet. 2003 Ago;34(4):395-402.
 25 [Bibliografía no patentada 2] "Two novel sandwich ELISAs identify PAD4 levels and PAD4 autoantibodies in patients with rheumatoid arthritis", Ishigami et al., Mod Rheumatol. 2013 Jul;23(4):794-803.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere al objeto definido en las reivindicaciones adjuntas.

Problema técnico

30 Desafortunadamente, en la Bibliografía de Patentes 1, la mezcla que contiene 4 anticuerpos anti-PAD4 diferentes tiene que ser utilizada para suprimir la AR, y ha habido espacio para la mejora. Además, no existen anticuerpos anti-PAD4 convencionales eficaces en el tratamiento de la AR.

La presente invención se ha llevado a cabo teniendo en cuenta las situaciones anteriores. El propósito de la presente invención es proporcionar anticuerpos anti-PAD4 que tengan propiedades excelentes o proporcionar un procedimiento excelente para el tratamiento de la AR, etc.

35 Solución al problema

La presente invención se dirige a un anticuerpo anti-PAD4, en el que el anticuerpo se une específicamente a un péptido cuya secuencia de aminoácidos se establece en SEQ ID NO: 1, y no se une a un péptido cuya secuencia de aminoácidos se establece en SEQ ID NO: 32, 34, o 35; y en el que el anticuerpo inhibe la actividad de citrulinación de PAD4. Los presentes inventores han descubierto que los anticuerpos anti-PAD4 que se unen específicamente a un epítipo que contiene las posiciones 345, 347 y 348 de PAD4 ejercen efectos terapéuticos sorprendentemente potentes sobre la AR como se describe en los Ejemplos descritos a continuación. Además, estos anticuerpos tienen mayor afinidad hacia PAD4 y mayor función inhibidora de la actividad de citrulinación que los anticuerpos anti-PAD4 descritos en la Bibliografía de Patentes 1.

45 Además, para nuestra sorpresa, cuando se administró una combinación de un anticuerpo anti-PAD4 y un inhibidor del TNF α a ratones modelo de artritis reumatoide humana, se observó un beneficio terapéutico sinérgico.

Específicamente, un aspecto de la presente invención proporciona un anticuerpo anti-PAD4 que se une específicamente a un epítipo que contiene las posiciones 345, 347 y 348 de PAD4. El uso de este anticuerpo permite el tratamiento de la AR.

Además, otro aspecto de la presente invención proporciona un polinucleótido o vector que codifica el anticuerpo anti-PAD4 anterior. Además, otro aspecto de la presente invención proporciona una composición que comprende el anticuerpo anti-PAD4 anterior. Además, otro aspecto de la presente invención proporciona un inhibidor de la actividad de citrulinación de PAD4, que comprende el anticuerpo anti-PAD4 anterior. Además, otro aspecto de la presente invención proporciona una composición farmacéutica para el tratamiento de la AR o la artritis, que comprende el anticuerpo anti-PAD4 anterior. Además, otro aspecto de la presente invención proporciona un proceso para producir un anticuerpo anti-PAD4, que comprende la etapa de hacer proliferar una célula que contiene el polinucleótido o vector anterior.

Además, en otro aspecto de la presente invención, el anticuerpo anti-PAD4 anterior puede inhibir la actividad de citrulinación de PAD4. Además, en otro aspecto de la presente invención, el anticuerpo anti-PAD4 anterior puede tener una $KD (M)$ de $9,0 \times 10^{-9}$ o menos. Además, en otro aspecto de la presente invención, el epítipo del anticuerpo anti-PAD4 anterior puede identificarse por medio de la exploración de alanina en la que se sustituye un único aminoácido. Además, en otro aspecto de la presente invención, el anticuerpo anti-PAD4 anterior puede ser un anticuerpo monoclonal. Además, en otro aspecto de la presente invención, el anticuerpo anti-PAD4 anterior puede ser un anticuerpo humanizado. Además, en otro aspecto de la presente invención, el anticuerpo anti-PAD4 anterior puede ser un fragmento de unión a antígeno.

Además, otro aspecto de la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-PAD4 y un inhibidor de $TNF\alpha$. Además, otro aspecto de la presente invención proporciona una composición farmacéutica que contiene anticuerpo anti-PAD4 utilizada cuando el anticuerpo anti-PAD4 y un inhibidor de $TNF\alpha$ se utilizan en combinación. Además, otro aspecto de la presente invención proporciona una composición farmacéutica que contiene inhibidor de $TNF\alpha$ utilizada cuando un anticuerpo anti-PAD4 y el inhibidor de $TNF\alpha$ se utilizan en combinación. Además, otro aspecto de la presente invención proporciona un kit de tratamiento que comprende un anticuerpo anti-PAD4 y un inhibidor de $TNF\alpha$.

Además, otro aspecto de la presente invención proporciona la composición farmacéutica anterior como composición farmacéutica para el tratamiento de la AR o la artritis. Además, en otro aspecto de la presente invención, el anticuerpo anti-PAD4 anterior puede ser un anticuerpo humanizado. Además, otro aspecto de la presente invención proporciona el kit de tratamiento anterior como un kit para el tratamiento de la AR o la artritis.

Efectos ventajosos de la invención

La presente invención proporciona anticuerpos anti-PAD4 que tienen propiedades excelentes o un procedimiento excelente para el tratamiento de la AR o la artritis, etc.

Breve descripción de los dibujos

[FIG. 1] la FIG. 1 son gráficos que muestran los resultados de ELISA.

[FIG. 2] la FIG. 2 son gráficos que muestran los resultados de ELISA.

[FIG. 3] la FIG. 3 son gráficos que muestran los resultados de ELISA.

[FIG. 4] la FIG. 4 es un gráfico que muestra los resultados del ensayo de afinidad.

[FIG. 5] la FIG. 5 es un diagrama que ilustra los resultados de la exploración con alanina.

[FIG. 6] la FIG. 6 es un gráfico que muestra los resultados de la evaluación de la función inhibidora de la actividad de citrulinación.

[FIG. 7] la FIG. 7 son gráficos que muestran los resultados de la evaluación de la función inhibidora de la actividad de citrulinación.

[FIG. 8] la FIG. 8 ofrece un esquema de las condiciones experimentales durante la evaluación de la eficacia de los fármacos.

[FIG. 9] la FIG. 9 son gráficos que muestran los resultados de la evaluación del tamaño de la hinchazón.

[FIG. 10] la FIG. 10 es un gráfico que muestra los resultados de la evaluación de una puntuación de artritis.

[FIG. 11] la FIG. 11 es un gráfico que muestra los resultados de la evaluación del título de un anticuerpo anti-CCP.

[FIG. 12] la FIG. 12 son imágenes que muestran los resultados del análisis histológico.

[FIG. 13] la FIG. 13 ofrece un esquema de las condiciones experimentales durante la evaluación de la eficacia de los fármacos.

[FIG. 14] la FIG. 14 son gráficos que muestran los resultados de la evaluación del tamaño de la hinchazón.

[FIG. 15] la FIG. 15 es un gráfico que muestra los resultados de la evaluación de una puntuación de artritis.

[FIG. 16] la FIG. 16 muestra la secuencia de aminoácidos de la región constante de cada una de la cadena H (IgG1) y la cadena L (κ) de un anticuerpo humanizado del Ejemplo 6.

[FIG. 17] la FIG. 17 muestra las secuencias de las regiones variables de un anticuerpo humanizado G8.

[FIG. 18] la FIG. 18 muestra las secuencias de las regiones variables de un anticuerpo humanizado H7 (la secuencia de la cadena H es la misma que la de G8).

[FIG. 19] la FIG. 19 muestra la secuencia completa de aminoácidos de un anticuerpo humanizado derivado de A11 o G8.

[FIG. 20] la FIG. 20 muestra la secuencia completa de aminoácidos de un anticuerpo humanizado derivado de G9 o H7.

[FIG. 21] la FIG. 21 son tablas que muestran los resultados de ELISA.

[FIG. 22] la FIG. 22 son gráficos que muestran los resultados de ELISA.

[FIG. 23] la FIG. 23 son gráficos que muestran los resultados de ELISA.

[FIG. 24] la FIG. 24 es una tabla y gráficos que muestran los resultados de ELISA.

5 [FIG. 25] la FIG. 25 muestra las secuencias de ADN utilizadas para la construcción de un anticuerpo humanizado anti-PAD4 (IgG4λ).

[FIG. 26] la FIG. 26 muestra las secuencias de aminoácidos del anticuerpo anti-PAD4 (IgG4λ) del Ejemplo 6.

[FIG. 27] la FIG. 27 es una tabla y un gráfico que muestran los resultados de ELISA.

[FIG. 28] la FIG. 28 es un gráfico que muestra los resultados de la evaluación de la función inhibidora de la actividad de citrulinación.

10 Descripción de las realizaciones

A continuación, se describirán en detalle las realizaciones de la presente invención. Tenga en cuenta que las descripciones no se repiten de forma que se eviten redundancias.

15 Una realización de la presente invención proporciona un nuevo anticuerpo anti-PAD4 como se define en las reivindicaciones. Este anticuerpo es, por ejemplo, un anticuerpo anti-PAD4 que se une específicamente a un epítipo que contiene las posiciones 345, 347 y 348 de PAD4. El uso de este anticuerpo permite el tratamiento de la artritis reumatoide (AR) o artritis. Este protocolo de tratamiento es excelente desde el punto de vista de la seguridad, dado que el uso de un anticuerpo produce un pequeño efecto secundario.

20 PAD4 es conocida como una enzima que participa en la citrulinación de una arginina en una proteína. Se puede consultar información detallada sobre la secuencia de aminoácidos de PAD4, etc., en, por ejemplo, la página web del NCBI (National Center for Biotechnology Information) o del HGNC (HUGO Gene Nomenclature Committee). Entre los ejemplos del número de acceso de PAD4 depositado en el NCBI se incluye NP_036519.2. Ejemplos de la secuencia de aminoácidos de PAD4 incluyen SEQ ID NO: 2. Los organismos fuente de PAD4 no están limitados siempre que el PAD4 tenga dicha actividad. Asp, Trp y Met se encuentran normalmente en las posiciones 345, 347 y 348 de PAD4, respectivamente.

25 Como se usa en la presente memoria, los "anticuerpos anti-PAD4" incluyen un anticuerpo que puede unirse a PAD4. Los ejemplos de un proceso para producir este anticuerpo anti-PAD4 pueden incluir, pero no se limitan particularmente a, un proceso en el que un mamífero o ave se inmuniza con PAD4. El anticuerpo anti-PAD4 que se une específicamente a un epítipo que contiene las posiciones 345, 347 y 348 de PAD4 puede obtenerse seleccionando, por ejemplo, un anticuerpo anti-PAD4 que muestre unión a PAD4 de tipo salvaje pero que no muestre unión a un mutante de PAD4 en el que un aminoácido en la posición 345, 347 o 348 se sustituye por alanina.

30 Un anticuerpo anti-PAD4 de acuerdo con una realización de la presente invención puede inhibir la actividad de citrulinación de PAD4.

35 Un anticuerpo anti-PAD4 de acuerdo con una realización de la presente invención puede ser un anticuerpo monoclonal. El anticuerpo monoclonal puede actuar sobre PAD4 más eficazmente que un anticuerpo policlonal homólogo. Desde el punto de vista de la producción eficiente de un anticuerpo monoclonal anti-PAD4 que tenga un efecto deseado, se inmuniza preferentemente un pollo con PAD4. A menos que se indique lo contrario, los ejemplos de PAD4 utilizados como antígeno incluyen PAD4 de longitud completa o fragmentos peptídicos de PAD4.

40 La clase de anticuerpo de un anticuerpo anti-PAD4 de acuerdo con una realización de la presente invención no está particularmente limitada. Ejemplos de esta clase pueden ser IgM, IgD, IgG, IgA, IgE e IgY. Además, los ejemplos de la subclase de anticuerpos pueden incluir, pero no se limitan particularmente a, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2.

Un anticuerpo anti-PAD4 de acuerdo con una realización de la presente invención puede ser un fragmento de anticuerpo que tenga actividad de unión a PAD4 (en lo sucesivo, denominado a veces "fragmento de unión a antígeno"). En este caso, se ejercen efectos que implican una mayor estabilidad o eficiencia en la producción de anticuerpos.

45 Un anticuerpo anti-PAD4 de acuerdo con una realización de la presente invención puede ser una proteína de fusión. Esta proteína de fusión puede producirse uniendo un polipéptido u oligopéptido al extremo N-terminal o C-terminal del anticuerpo anti-PAD4. Como se utiliza en la presente memoria, el oligopéptido puede ser una etiqueta His. Además, esta proteína de fusión puede crearse al fusionar el anticuerpo anti-PAD4 y una porción de la secuencia de un anticuerpo de ratón, humano o pollo. Dicha proteína de fusión puede incluirse como una forma del anticuerpo anti-PAD4 de acuerdo con esta realización.

50 Un anticuerpo anti-PAD4 de acuerdo con una realización de la presente invención puede obtenerse tras una etapa de inmunización de un pollo con PAD4. El anticuerpo puede ser un anticuerpo que tenga un conjunto de CDR del anticuerpo obtenido tras una etapa de inmunización de un pollo con PAD4. El conjunto CDR es un conjunto que contiene los CDR de cadena pesada 1, 2 y 3 y los CDR de cadena ligera 1, 2 y 3.

55 Un anticuerpo anti-PAD4 de acuerdo con una realización de la presente invención puede tener una KD (M) de, por ejemplo, 9.9×10^{-9} , 9.5×10^{-9} , 9.0×10^{-9} , 8.5×10^{-9} , 8.0×10^{-9} , 7.0×10^{-9} , 6.0×10^{-9} , 5.0×10^{-9} , 4.0×10^{-9} , 3.0×10^{-9} ,

2.0×10^{-9} , o menos. El número puede estar comprendido entre dos de los valores anteriores. Desde el punto de vista de la mejora de los efectos del tratamiento de AR, el KD (M) es preferentemente $9,0 \times 10^{-9}$ o inferior.

5 Un anticuerpo anti-PAD4 de acuerdo con una realización de la presente invención puede unirse a PAD4 de tipo salvaje o a un mutante de PAD4. El término "mutante" incluye ser responsable de una variación en la secuencia de ADN, tal como los SNP, entre individuos. Homología entre la secuencia de aminoácidos de PAD4 de tipo salvaje o de un mutante de PAD4 y la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 2 es preferentemente del 80% o superior, más preferentemente del 90% o superior, aún más preferentemente del 95% o superior, y aún más preferentemente del 98% o superior.

10 Un anticuerpo anti-PAD4 de acuerdo con una realización de la presente invención puede ser un anticuerpo que puede unirse a PAD4 de tipo salvaje pero no puede unirse a un mutante de PAD4 en el que un aminoácido en la posición 345, 347 o 348 se sustituye por Ala. La expresión "no puede vincular a" se refiere a que no hay vinculación sustancial.

15 Un anticuerpo anti-PAD4 de acuerdo con una realización de la presente invención puede ser un anticuerpo obtenido por un proceso de producción que incluye: la selección de un anticuerpo que puede reaccionar significativamente con PAD4 de tipo salvaje; o la selección de un anticuerpo que no puede unirse a un mutante de PAD4 en el que un aminoácido en la posición 345, 347 o 348 se sustituye por Ala.

20 Con respecto a un anticuerpo anti-PAD4 de acuerdo con una realización de la presente invención, la unión del anticuerpo a un mutante de PAD4 en el que un aminoácido en la posición 345, 347 o 348 se sustituye por Ala puede ser del 50% o menos que la de un anticuerpo policlonal anti-PAD4. El término "50% o menos" puede significar, por ejemplo, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5, 1 o 0%. El número puede estar comprendido entre dos de los valores anteriores. La unión puede evaluarse, por ejemplo, por medio de ELISA o Biacore. Como se utiliza en el presente documento, el término "anticuerpo policlonal anti-PAD4" incluye, por ejemplo, anti-suero. Los términos "unión" o "reactividad" incluyen la afinidad.

25 Un anticuerpo anti-PAD4 de acuerdo con una realización de la presente invención puede unirse específicamente a las posiciones 345, 347 y 348 de PAD4. Este anticuerpo puede unirse a otro residuo de aminoácido dentro del epítipo siempre que el anticuerpo pueda unirse específicamente a las posiciones 345, 347 y 348 de PAD4. Ejemplos de otro residuo de aminoácido dentro del epítipo pueden incluir un residuo de aminoácido en la posición 344 de PAD4. Un anticuerpo que se une específicamente a un sitio específico puede ser un anticuerpo que reconoce el sitio específico.

30 Un epítipo al que se une un anticuerpo anti-PAD4 de acuerdo con una realización de la presente invención puede contener, además de los residuos de aminoácidos en las posiciones 345, 347 y 348 de PAD4, uno o varios residuos de aminoácidos distintos de los residuos de aminoácidos en las posiciones 345, 347 y 348. Por ejemplo, el epítipo anterior puede contener un residuo de aminoácido en la posición 344. Además, este epítipo no puede contener un aminoácido en la posición 340, 341, 342, 343, 344, 346, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355 o 356 de PAD4.

35 Un anticuerpo anti-PAD4 de acuerdo con una realización de la presente invención puede unirse específicamente a un epítipo que contiene aminoácidos en las posiciones 6, 8 y 9 de un péptido, cuya secuencia de aminoácidos se establece en SEQ ID NO: 1.

Un anticuerpo anti-PAD4 de acuerdo con una realización de la presente invención es un anticuerpo que puede unirse a un péptido, cuya secuencia de aminoácidos se establece en SEQ ID NO: 1, pero no puede unirse a un péptido cuya secuencia de aminoácidos se establece en SEQ ID NO: 32, 34 o 35.

40 Con respecto a un anticuerpo anti-PAD4 de acuerdo con una realización de la presente invención, la unión del anticuerpo a un péptido, cuya secuencia de aminoácidos se establece en SEQ ID NO: 32, 34 o 35, puede ser del 50% o menos que la de un anticuerpo policlonal anti-PAD4. El término "50% o menos" puede significar, por ejemplo, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5, 1 o 0%. El número puede estar comprendido entre dos de los valores anteriores. La unión puede evaluarse, por ejemplo, por medio de ELISA o Biacore.

45 Un anticuerpo anti-PAD4 de acuerdo con una realización de la presente invención puede unirse específicamente a las posiciones 6, 8 y 9 de un péptido, cuya secuencia de aminoácidos se establece en SEQ ID NO: 1. Este anticuerpo puede unirse a otro residuo de aminoácido dentro del epítipo siempre que el anticuerpo pueda unirse específicamente a las posiciones 6, 8 y 9 de un péptido cuya secuencia de aminoácidos se establece en SEQ ID NO: 1. Ejemplos de otro residuo de aminoácido dentro del epítipo pueden incluir un residuo de aminoácido en la posición 5 de un péptido, cuya secuencia de aminoácidos se establece en SEQ ID NO: 1.

50 Un epítipo al que se une un anticuerpo anti-PAD4 de acuerdo con una realización de la presente invención puede contener, además de los residuos de aminoácidos en las posiciones 6, 8 y 9 de un péptido, cuya secuencia de aminoácidos se establece en SEQ ID NO: 1, un residuo de aminoácido en la posición 5. Además, este epítipo no puede contener un aminoácido en la posición 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o 17 de un péptido cuya secuencia de aminoácidos se establece en SEQ ID NO: 1.

55 Un epítipo al que se une un anticuerpo anti-PAD4 de acuerdo con una realización de la presente invención puede ser un epítipo identificado por medio de, por ejemplo, exploración de alanina. Como se utiliza en el presente documento,

el término "exploración de alanina" se refiere a una técnica en la que un aminoácido de una proteína, por ejemplo, se sustituye por alanina y se examinan las características de la unión de un anticuerpo a la proteína. El epítipo identificado por exploración de alanina puede ser un epítipo que puede determinarse tras una etapa (i) de sustitución de un único residuo de aminoácido de un antígeno por Ala para crear un mutante Ala; una etapa (ii) de medición de la afinidad de un anticuerpo de prueba hacia el mutante Ala; y/o una etapa (iii) de evaluación, como epítipo, de un residuo de aminoácido original antes de la sustitución Ala con respecto al mutante Ala con el que el anticuerpo de prueba no reacciona significativamente. La etapa (i) anterior puede incluir una etapa de sustitución de una pluralidad de residuos de aminoácidos individuales del antígeno por Ala para crear una pluralidad de mutantes Ala. El procedimiento de evaluación del epítipo puede incluir una etapa (iv) de medición de la afinidad de un anticuerpo policlonal anti-PAD4 hacia cada mutante Ala. El procedimiento de evaluación del epítipo puede incluir una etapa (v) de determinar que cuando la afinidad del anticuerpo de prueba hacia el mutante Ala es 50% o menos que la afinidad de un anticuerpo policlonal anti-PAD4 hacia el mutante Ala, el anticuerpo de prueba no muestra reactividad significativa. El término "50% o menos" puede significar 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5, 1% o menos, o 0%. El número puede estar comprendido entre dos de los valores anteriores. La exploración de la alanina puede ejecutarse sustituyendo un solo aminoácido. Un antígeno utilizado para la exploración de alanina puede ser PAD4 o un fragmento peptídico del mismo. La afinidad puede evaluarse, por ejemplo, por medio de ELISA o Biacore.

Como se utiliza en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a una molécula que puede unirse específicamente a un epítipo específico localizado en un antígeno, y también se refiere a una población de la molécula. Además, el término "anticuerpo" puede incluir anticuerpos policlonales y monoclonales. Además, los anticuerpos tienen una gran variedad de formas. Los ejemplos pueden incluir al menos una forma seleccionada del grupo que consiste en un anticuerpo de longitud completa (un anticuerpo que tiene regiones Fab y una región Fc), un anticuerpo Fv, un anticuerpo Fab, un anticuerpo F(ab')₂, un anticuerpo Fab', un diacuerpo, un anticuerpo de cadena simple (por ejemplo, un scFv), un dsFv, un anticuerpo multivalente (por ejemplo, un anticuerpo divalente), un péptido o polipéptido de unión a antígeno, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo de ratón, un anticuerpo de pollo, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano y sus equivalentes. Además, los anticuerpos pueden estar modificados o no. Con respecto a los anticuerpos modificados, diversas moléculas tales como el polietilenglicol pueden conjugarse con un anticuerpo. Los anticuerpos modificados pueden obtenerse sometiendo un anticuerpo a una modificación química mediante el uso de un procedimiento conocido. La secuencia de aminoácidos, clase o subclase del anticuerpo puede ser la derivada de, por ejemplo, un humano, un mamífero no humano (por ejemplo, un ratón, una rata, un conejo, una vaca, un mono) o un ave (por ejemplo, un pollo). Además, ejemplos del anticuerpo incluyen un anticuerpo aislado, un anticuerpo purificado y un anticuerpo recombinante. Además, el anticuerpo puede utilizarse, por ejemplo, *in vitro* o *in vivo*.

Como se utiliza en el presente documento, un "anticuerpo policlonal" puede producirse inmunizando, por ejemplo, un mamífero (por ejemplo, una rata, un ratón, una cobaya, un conejo, una vaca, un mono) o un ave (por ejemplo, un pollo) con un inmunógeno que contenga un antígeno de interés. La inmunización puede requerir la coinyección de uno o más agentes inmunizantes y un adyuvante. El adyuvante puede utilizarse para aumentar la respuesta inmunitaria. El adyuvante puede incluir el adyuvante de Freund (completo o incompleto), un gel mineral (por ejemplo, hidróxido de aluminio) y/o un tensioactivo (por ejemplo, lisolectina). Un protocolo de inmunización es públicamente conocido en la técnica. Cualquier procedimiento para inducir una respuesta inmunitaria en un organismo huésped seleccionado se puede llevar a cabo en función de la especie huésped seleccionada ("Protein Experiment Handbook", YODOSHA CO., LTD. (2003), 86-91).

Como se utiliza en el presente documento, el término "anticuerpo monoclonal" incluye anticuerpos obtenidos cuando anticuerpos individuales que constituyen una población reaccionan sustancialmente con el mismo epítipo. Alternativamente, el anticuerpo monoclonal puede obtenerse cuando los anticuerpos individuales que constituyen una población son sustancialmente iguales (se permiten mutaciones naturales). Los anticuerpos monoclonales son muy específicos y difieren de los anticuerpos policlonales normales, que suelen contener diferentes anticuerpos que se unen a diferentes epítipos. Un proceso para producir un anticuerpo monoclonal no tiene ninguna limitación particular. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal puede producirse por medio de un procedimiento similar al procedimiento del hibridoma divulgado en "Köhler G y Milstein C, Nature, 1975, Aug. 7, 256 (5517), 495-497". Alternativamente, el anticuerpo monoclonal puede producirse por un procedimiento similar a la tecnología recombinante divulgada en Patente estadounidense nº 4816567. Además, el anticuerpo monoclonal puede aislarse de una biblioteca de anticuerpos fago por medio de un procedimiento similar a la tecnología descrita en "Clackson et al., Nature, 1991, 15 de agosto, 352 (6336), 624-628" o "Marks et al., J Mol Biol., 1991, dic. 5, 222(3), 581-597". Además, el anticuerpo puede generarse mediante un procedimiento divulgado en "Protein Experiment Handbook, YODOSHA CO., LTD. (2003), 92-96".

Como se utiliza en el presente documento, un "anticuerpo Fv" es un fragmento de anticuerpo que contiene un sitio de reconocimiento de antígeno. El Fv consiste en un dímero entre un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera, dominios que están acoplados por enlaces no covalentes. Con esta estructura, tres CDR de los respectivos dominios variables pueden interactuar entre sí para formar un sitio de unión al antígeno en la superficie del dímero VH-VL.

Como se utiliza en el presente documento, un "anticuerpo Fab" es un fragmento de anticuerpo producido por digestión, por ejemplo, de un anticuerpo que contiene regiones Fab y una región Fc por una proteasa papaína, teniendo el

fragmento la mitad N-terminal de la cadena H y toda la cadena L unidas por un enlace disulfuro. Por ejemplo, puede obtenerse un Fab digiriendo, por medio de una proteasa papaína, un anticuerpo anti-PAD4 que contenga regiones Fab y una región Fc de acuerdo con una realización de la presente invención.

5 Como se utiliza en el presente documento, un "anticuerpo F(ab')₂" es un fragmento de anticuerpo que contiene dos regiones Fab derivadas de un fragmento producido por digestión, por ejemplo, de un anticuerpo que contiene regiones Fab y una región Fc por una proteasa pepsina. Por ejemplo, puede obtenerse un F(ab')₂ digiriendo, por medio de una proteasa pepsina, un anticuerpo anti-PAD4 que contenga regiones Fab y una región Fc de acuerdo con una realización de la presente invención. Además, el F(ab')₂ puede producirse uniendo, por ejemplo, los siguientes Fab por medio de un enlace tioéter o un enlace disulfuro.

10 Como se utiliza en el presente documento, un "anticuerpo Fab'" es un fragmento de anticuerpo producido, por ejemplo, por escisión del enlace disulfuro en la región bisagra de un fragmento F(ab')₂. El Fab' puede producirse tratando el F(ab')₂ con un agente reductor tal como el ditiotreitól.

15 Como se utiliza en el presente documento, un "anticuerpo scFv" es un fragmento de anticuerpo en el que VH y VL están unidos por medio de un enlazador peptídico adecuado. El anticuerpo scFv puede producirse obteniendo ADNc que codifique el VH y el VL de un anticuerpo anti-PAD4 de acuerdo con la realización anterior de la presente invención, construyendo un polinucleótido que codifique un fragmento VH-peptido enlazador-VL, clonando el polinucleótido en un vector, y mediante el uso de células que expresen el vector para producir un scFv.

20 Como se utiliza en el presente documento, un "diabodia" es un fragmento de anticuerpo que tiene una actividad de unión a antígenos divalentes. Ambas actividades de unión a antígeno pueden ser idénticas, o una de ellas puede ser una actividad de unión a antígeno distinta. El diacuerpo puede producirse construyendo un polinucleótido que contenga una secuencia de nucleótidos que codifique, por ejemplo, scFvs unidos mediante el uso de un enlazador peptídico que tenga una secuencia de aminoácidos de 8 residuos o menos, clonando el polinucleótido resultante en un vector y mediante el uso de células que expresen el vector para producir un diacuerpo.

25 Como se utiliza en el presente documento, un "dsFv" es un fragmento de anticuerpo en el que un polipéptido VH que contiene un residuo de cisteína y un polipéptido VL que contiene un residuo de cisteína están unidos por medio de un enlace disulfuro entre los residuos de cisteína mencionados. El residuo de aminoácido sustituido por el residuo de cisteína puede seleccionarse en base a una predicción de la conformación del anticuerpo de acuerdo con un procedimiento indicado por Reiter *et al.* (Reiter *et al.*, Protein Eng., 1994, mayo, 7(5), 697-704).

30 Como se utiliza en el presente documento, un "péptido o polipéptido de unión a antígeno" es un fragmento de anticuerpo que contiene el VH y/o VL de un anticuerpo o CDRs 1, 2, y/o 3 del mismo. Una pluralidad de péptidos que contienen una o varias CDR pueden unirse directa o indirectamente por medio de un enlazador peptídico adecuado.

35 Un proceso para producir el anticuerpo Fv, el anticuerpo Fab, el anticuerpo F(ab')₂, el anticuerpo Fab', el anticuerpo scFv, el diabody, el anticuerpo dsFv, y el péptido o polipéptido de unión a antígeno (en lo sucesivo, a veces denominado "anticuerpo Fv, etc.") anterior no está particularmente limitado. Por ejemplo, el anticuerpo Fv, etc., puede producirse clonando un ADN que codifique una región (como un anticuerpo Fv, etc.) de un anticuerpo anti-PAD4 de acuerdo con una realización de la presente invención en un vector de expresión y mediante el uso de células que expresen el vector para su producción. Además, para su producción puede utilizarse un proceso de síntesis química tal como un proceso Fmoc (fluorenilmetiloxicarbonilo) y un proceso tBOC (t-butiloxicarbonilo). Se observa que, como se utiliza en el presente documento, un fragmento de antienlazamiento puede incluir al menos uno de los anticuerpos Fv
40 mencionados anteriormente, etc.

45 Como se utiliza en el presente documento, un "anticuerpo quimérico" puede producirse, por ejemplo, uniendo regiones variables de un anticuerpo derivado de una especie a regiones constantes de un anticuerpo derivado de otra especie, y puede construirse fácilmente mediante el uso de tecnología de recombinación genética. Los ejemplos incluyen un anticuerpo quimérico ratón-humano, un anticuerpo quimérico pollo-humano y un anticuerpo quimérico pollo-ratón. Por ejemplo, un anticuerpo quimérico ratón-humano puede producirse por medio de un proceso divulgado en "Roguska *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A., 1994, Feb. 1, 91(3), 969-973". Por ejemplo, un procedimiento básico para producir un anticuerpo quimérico ratón-humano incluye: aislar una secuencia líder de ratón y una secuencia de región variable presente en un ADNc clonado; y unir estas secuencias a una secuencia que codifica una región constante de un anticuerpo humano, estando la secuencia presente en un vector de expresión de mamífero. Alternativamente, una
50 secuencia líder de ratón y una secuencia de región variable presente en un ADNc clonado pueden ligarse primero a una secuencia que codifica una región constante de un anticuerpo humano y la secuencia resultante se liga después a un vector de expresión de mamífero. Un fragmento de región constante del anticuerpo humano puede ser una región constante de la cadena H o una región constante de la cadena L de cualquier anticuerpo humano. Ejemplos de la región constante de la cadena H humana pueden incluir Cy1, Cy2, Cy3 y Cy4. Ejemplos de la región constante de la
55 cadena L pueden ser Cλ y Cκ.

Como se utiliza en el presente documento, un "anticuerpo humanizado" tiene, por ejemplo, una o más CDR derivadas de una especie no humana, regiones marco (FR) derivadas de inmunoglobulina humana y regiones constantes derivadas de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado se une a un antígeno deseado. Un anticuerpo puede

humanizarse mediante el uso de diversas técnicas conocidas en la técnica (Almagro et al., *Front Biosci.*, 2008, Jan. 1, 13, 1619-1633). Ejemplos de estas técnicas pueden ser el injerto de CDR (Ozaki et al., *Blood*, 1999, Jun. 1, 93(11), 3922-3930), el reasfaltado (Roguska et al., *Proc Natl Acad Sci USA.*, 1994, Feb.1, 91(3), 969-973), y FR shuffling (Damschroder et al., *Mol Immunol.*, 2007, Abr., 44(11), 3049-3060, Epub 2007, Jan 22). A fin de modificar o mejorar la unión al antígeno, los residuos de aminoácidos de las regiones FR humanas pueden sustituirse por residuos correspondientes a los del anticuerpo donante CDR. Esta sustitución de FR puede llevarse a cabo mediante el uso de un procedimiento bien conocido en la técnica (Riechmann et al., *Nature*, 1988, Mar 24; 332(6162): 323-327). Por ejemplo, la interacción entre CDR y FR puede simularse para identificar los residuos FR que son críticos en la unión al antígeno. Alternativamente, sus secuencias pueden compararse para identificar los residuos FR que son anormales en una posición específica. Obsérvese que un anticuerpo se humaniza preferentemente por medio del procedimiento descrito en Nishibori et al., *Mol Immunol.* 2006 Feb;43(6):634-42.

Como se utiliza en el presente documento, un "anticuerpo humano" tiene, por ejemplo, una región variable de cadena pesada y una región constante y una región variable de cadena ligera y una región constante, todas ellas derivadas de genes que codifican una inmunoglobulina humana. Los ejemplos de un procedimiento básico para generar un anticuerpo humano incluyen un procedimiento que utiliza un ratón transgénico productor de anticuerpos humanos, visualización de fagos y similares. El procedimiento que utiliza un ratón transgénico productor de anticuerpos humanos incluye: introducir un gen Ig humano funcional en un ratón endogénico Ig-knockout; y producir, en lugar de anticuerpos de ratón, anticuerpos humanos con capacidades versátiles de unión a antígenos. Además, si se inmuniza a este ratón, se puede obtener un anticuerpo monoclonal humano mediante el uso de un procedimiento de hibridoma convencional. Por ejemplo, un anticuerpo humano puede prepararse mediante el uso del procedimiento divulgado en "Lonberg et al., *Int Rev Immunol.*, 1995, 13(1), 65-93". La visualización de fagos es típicamente un sistema en el que se hace que un gen exógeno se exprese como una proteína de fusión en una porción N-terminal de una proteína de cubierta (por ejemplo, g3p, g10p) de un fago filamentoso como M13 o T7, un virus de *E. coli*, sin perder la infectividad del fago. Por ejemplo, puede generarse un anticuerpo humano mediante el uso del procedimiento divulgado en "Vaughan et al., *Nat Biotechnol*, 1996, Mar., 14(3), 309-314".

Como se utiliza en el presente documento, una "cadena pesada" es típicamente un componente principal de un anticuerpo de longitud completa. La cadena pesada suele estar unida a una cadena ligera por medio de un enlace disulfuro y enlaces no covalentes. El dominio N-terminal de la cadena pesada tiene lo que se denomina una región variable (VH), cuya secuencia de aminoácidos no es la misma ni siquiera en la misma clase de anticuerpos derivados de la misma especie. En general, se sabe que el VH contribuye en gran medida a la especificidad y afinidad hacia un antígeno. Un artículo "Reiter et al., *J Mol Biol.*, 1999, Jul. 16; 290(3): 685-98", por ejemplo, ha informado de que una molécula que sólo contenía un VH era capaz de unirse a un antígeno con gran especificidad y afinidad. Además, un artículo "Wolfson W, *Chem Biol.*, 2006, dic.; 13(12): 1243-1244" ha informado de que entre los anticuerpos de camello, está presente un anticuerpo que sólo tiene una cadena pesada, pero no una cadena ligera.

Como se utilizan en el presente documento, las "CDR (regiones determinantes de la complementariedad)" son regiones de anticuerpos que realmente entran en contacto con un antígeno para formar un sitio de unión. En términos generales, las CDR se localizan en el Fv (regiones variables que incluyen una región variable de cadena pesada (VH) y una región variable de cadena ligera (VL)) de un anticuerpo. Además, las CDR, en general, incluyen CDR1, CDR2 y CDR3 que tienen entre 5 y 30 residuos de aminoácidos. En este caso, se sabe que las CDR de la cadena pesada, en particular, contribuyen a la unión de un anticuerpo a un antígeno. Entre las CDR, se sabe que la CDR3 es la que más contribuye a la unión de un anticuerpo a un antígeno. Un artículo "Willy et al., *Biochemical and Biophysical Research Communications Volume 356, Issue 1, 27, April 2007, Pages 124-128*", por ejemplo, desvela que la modificación de la CDR3 de la cadena pesada aumentó la capacidad de unión de un anticuerpo. Las regiones Fv distintas de las CDR se denominan regiones marco (FR). Las regiones FR incluyen FR1, FR2, FR3 y FR4 y están relativamente bien conservadas entre los anticuerpos (Kabat et al., "Sequence of Proteins of Immunological Interest" US Dept. Health and Human Services, 1983).

Diversos informes han divulgado definiciones de CDR y procedimientos para determinar una posición CDR. Por ejemplo, la definición de Kabat (Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) o la definición de Chothia (Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 1987; 196: 901-917). En el presente documento, la definición de Kabat es la preferente. Sin embargo, la definición no se limita a lo anterior. Además, los CDR pueden determinarse teniendo en cuenta tanto la definición de Kabat como la de Chothia. Por ejemplo, una parte en la que los CDR definidos por cada definición se solapan entre sí puede determinarse como un CDR. Alternativamente, puede determinarse como CDR una porción que contenga los dos CDR definidos por cada definición. Algunos ejemplos concretos de este procedimiento son el procedimiento de Martin (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989; 86: 9268-9272) mediante el uso del software de modelización de anticuerpos AbM de Oxford Molecular. El procedimiento de Martin implica una propuesta en la que se comprometen la definición de Kabat y la definición de Chothia.

De acuerdo con una realización de la presente invención, al menos un anticuerpo anti-PAD4 se selecciona del grupo que consiste en: (a) un anticuerpo que contiene las secuencias de aminoácidos de las CDRs 1 a 3 de cadena pesada y CDRs 1 a 3 de cadena ligera representadas por los respectivos SEQ ID Nros.: 50 a 55; (b) un anticuerpo que contiene las secuencias de aminoácidos de las CDR de cadena pesada 1 a 3 y de las CDR de cadena ligera 1 a 3 representadas por los respectivos SEQ ID Nros.: 56 a 61; c) un anticuerpo que contenga las secuencias de aminoácidos de las CDR

de cadena pesada 1 a 3 y de las CDR de cadena ligera 1 a 3 representadas por los respectivos SEQ ID Nros.: 62 a 67; d) un anticuerpo que contiene las secuencias de aminoácidos de las CDR de cadena pesada 1 a 3 y de las CDR de cadena ligera 1 a 3 representadas por los respectivos SEQ ID Nros.: 68 a 73; (e) un anticuerpo que contiene las secuencias de aminoácidos de las CDRs 1 a 3 de cadena pesada y CDRs 1 a 3 de cadena ligera representadas por los respectivos SEQ ID Nros.: 74 a 79; y f) un anticuerpo que contenga las secuencias de aminoácidos de las CDR de cadena pesada 1 a 3 y de las CDR de cadena ligera 1 a 3 representadas por los respectivos SEQ ID Nros.: de 80 a 85. El uso de cada anticuerpo permite tratar la AR o la artritis. En otra realización de la presente invención, un anticuerpo anti-PAD4 contiene al menos un conjunto seleccionado entre conjuntos de secuencias de aminoácidos de las CDR de cadena pesada 1 a 3 y las CDR de cadena ligera 1 a 3 enumeradas anteriormente. En el presente documento, el término "respectivo" tiene el mismo significado que "en secuencia".

Se observa que las secuencias de aminoácidos expuestas en los anteriores (a) a (f) corresponden a las respectivas secuencias de aminoácidos CDR de los anticuerpos A11, E9, G6, G8, G9, y H7 descritos en los siguientes Ejemplos. En concreto, las secuencias de aminoácidos de las CDRs 1, 2 y 3 de la cadena pesada y las CDRs 1, 2 y 3 de la cadena ligera de A11 son secuencias de aminoácidos representadas por SYGMG (SEQ ID NO: 50), AIRNDGSWTGYGAAVKG (SEQ ID NO: 51), TTGSRGGSIDA (SEQ ID NO: 52), SGGGRYYYYG (SEQ ID NO: 53), YKRPS (SEQ ID NO: 54), y GSAETSSYV (SEQ ID NO: 55), respectivamente. Además, las secuencias de aminoácidos de las CDR de cadena pesada 1, 2 y 3 y de las CDR de cadena ligera 1, 2 y 3 de E9 son secuencias de aminoácidos representadas por SYGMG (SEQ ID NO: 56), AIRNDGSWTGYGSAVKG (SEQ ID NO: 57), TSGSSGGSVDA (SEQ ID NO: 58), SGGGRYYYYG (SEQ ID NO: 59), YKRPS (SEQ ID NO: 60), y GSAETSSYV (SEQ ID NO: 61), respectivamente. Además, las secuencias de aminoácidos de las CDR de cadena pesada 1, 2 y 3 y de las CDR de cadena ligera 1, 2 y 3 de G6 son secuencias de aminoácidos representadas por SYGME (SEQ ID NO: 62), AIRNDGSWTGYGAAVKG (SEQ ID NO: 63), TTGSSGGSIDA (SEQ ID NO: 64), SGGGNYYYYG (SEQ ID NO: 65), YKRPS (SEQ ID NO: 66), y GTADTGKYV (SEQ ID NO: 67), respectivamente. Además, las secuencias de aminoácidos de las CDR de cadena pesada 1, 2 y 3 y de las CDR de cadena ligera 1, 2 y 3 de G8 son secuencias de aminoácidos representadas por TYAMG (SEQ ID NO: 68), AIRNDGSWTGYGAAVKG (SEQ ID NO: 69), YTGSSGGSIGA (SEQ ID NO: 70), SGGNRNYYYYG (SEQ ID NO: 71), YKRPS (SEQ ID NO: 72), y GTADTGKYV (SEQ ID NO: 73), respectivamente. Además, las secuencias de aminoácidos de las CDR de cadena pesada 1, 2 y 3 y de las CDR de cadena ligera 1, 2 y 3 de G9 son secuencias de aminoácidos representadas por TYAMG (SEQ ID NO: 74), AIRNDGSWTGYGAAVKG (SEQ ID NO: 75), YTGSSGGSIGA (SEQ ID NO: 76), SGGGRYYYYG (SEQ ID NO: 77), YKRPS (SEQ ID NO: 78), y GSAETSSYV (SEQ ID NO: 79), respectivamente. Además, las secuencias de aminoácidos de las CDR de cadena pesada 1, 2 y 3 y de las CDR de cadena ligera 1, 2 y 3 de H7 son secuencias de aminoácidos representadas por TYAMG (SEQ ID NO: 80), AIRNDGSWTGYGAAVKG (SEQ ID NO: 81), YTGSSGGSIGA (SEQ ID NO: 82), SGGSGRYYYYG (SEQ ID NO: 83), SSTHRPS (SEQ ID NO: 84), y GTADSSSYV (SEQ ID NO: 85), respectivamente.

El anticuerpo anterior (a) puede contener las secuencias de aminoácidos de los FR de cadena pesada 1 a 4 y de cadena ligera 1 a 4 representadas por los respectivos SEQ ID Nros.: 86 a 93. El anticuerpo anterior (b) puede contener las secuencias de aminoácidos de los FR de cadena pesada 1 a 4 y de cadena ligera 1 a 4 representadas por los respectivos SEQ ID Nros.: 94 a 101. El anticuerpo anterior (c) puede contener las secuencias de aminoácidos de los FR de cadena pesada 1 a 4 y de cadena ligera 1 a 4 representadas por los respectivos SEQ ID Nros.: 102 a 109. El anticuerpo anterior (d) puede contener las secuencias de aminoácidos de los FR de cadena pesada 1 a 4 y de cadena ligera 1 a 4 representadas por los respectivos SEQ ID Nros.: 110 a 117. El anticuerpo anterior (e) puede contener las secuencias de aminoácidos de los FR de cadena pesada 1 a 4 y de cadena ligera 1 a 4 representadas por los respectivos SEQ ID Nros.: 118 a 125. El anticuerpo anterior (f) puede contener las secuencias de aminoácidos de los FR de cadena pesada 1 a 4 y de cadena ligera 1 a 4 representadas por los respectivos SEQ ID Nros.: 126 a 133. Se observa que estas secuencias de aminoácidos FR corresponden a las respectivas secuencias de aminoácidos FR de los anticuerpos A11, E9, G6, G8, G9 y H7 descritos en los siguientes Ejemplos. En otra realización de la presente invención, un anticuerpo anti-PAD4 contiene al menos un conjunto seleccionado de conjuntos de secuencias de aminoácidos de los FR de cadena pesada 1 a 4 y los FR de cadena ligera 1 a 4 enumerados anteriormente.

Siempre que el anticuerpo anterior (a) ejerza los efectos deseados, su cadena pesada CDR3 puede contener la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 70 en lugar de SEQ ID NO: 52; y su cadena ligera CDR3 puede contener la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 67 en lugar de SEQ ID NO: 55. Siempre que el anticuerpo (b) anterior ejerza los efectos deseados, su cadena pesada CDR2 puede contener la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 51 en lugar de SEQ ID NO: 57; su cadena pesada CDR3 puede contener la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 70 en lugar de SEQ ID NO: 58; y su cadena ligera CDR3 puede contener la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 67 en lugar de SEQ ID NO: 61. Siempre que el anticuerpo (c) anterior ejerza los efectos deseados, su cadena pesada CDR1 puede contener la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 50 en lugar de SEQ ID NO: 62; su cadena pesada CDR3 puede contener la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 70 en lugar de SEQ ID NO: 64; su cadena ligera CDR1 puede contener la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 53 en lugar de SEQ ID NO: 65; y su cadena ligera CDR3 puede contener la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 55 en lugar de SEQ ID NO: 67. Siempre que el anticuerpo anterior (d) ejerza los efectos deseados, su cadena ligera CDR1 puede contener la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 53 en lugar de SEQ ID NO: 71; y su cadena ligera CDR3 puede contener la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 55 en lugar de SEQ ID NO: 73. Siempre que el

anticuerpo anterior (e) ejerza los efectos deseados, su cadena ligera CDR3 puede contener la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 67 en lugar de SEQ ID NO: 79. Siempre que el anticuerpo (f) anterior ejerza los efectos deseados, su cadena ligera CDR1 puede contener la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 53 en lugar de SEQ ID NO: 83; su cadena ligera CDR2 puede contener la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 54 en lugar de SEQ ID NO: 84; y su cadena ligera CDR3 puede contener la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 55 o 67 en lugar de SEQ ID NO: 85.

Siempre que un anticuerpo anti-PAD4 de acuerdo con una realización de la presente invención ejerza los efectos deseados, su CDR1 de cadena pesada puede contener la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 50, 56, 62, 68, 74 u 80; su CDR2 de cadena pesada puede contener la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 51, 57, 63, 69, 75 u 81; su CDR3 de cadena pesada puede contener la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 52, 58, 64, 70, 76 u 82; su CDR1 de cadena ligera puede contener la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 53, 59, 65, 71, 77 u 83; su CDR2 de cadena ligera puede contener la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 54, 60, 66, 72, 78 u 84; y su cadena ligera CDR3 puede contener la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 55, 61, 67, 73, 79 u 85.

Un anticuerpo anti-PAD4 de acuerdo con una realización de la presente invención puede tener una forma de scFv. En este caso, puede proporcionarse un enlazador entre una cadena pesada y una cadena ligera. Ejemplos representativos del enlazador incluyen, pero no se limitan a, una secuencia que contiene de 0 a 5 aminoácidos consistentes en G y P. El enlazador puede tener, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 134. El enlazador es prescindible y puede no estar presente.

Un anticuerpo anti-PAD4 de acuerdo con una realización de la presente invención puede ser al menos un anticuerpo anti-PAD4 seleccionado del grupo que consiste en: un anticuerpo que contiene las secuencias de aminoácidos de una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera como se establece en SEQ ID NO: 186 y 187, respectivamente; un anticuerpo que contiene las secuencias de aminoácidos de una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera según se establece en SEQ ID NO: 188 y 189, respectivamente; un anticuerpo que contiene las secuencias de aminoácidos de una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera según se establece en SEQ ID NO: 190 y 191, respectivamente; un anticuerpo que contiene las secuencias de aminoácidos de una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera según se establece en SEQ ID NO: 192 y 193, respectivamente; y un anticuerpo que contiene las secuencias de aminoácidos de una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera según se establece en SEQ ID NO: 194 y 195, respectivamente. Dado que este anticuerpo tiene secuencias FR derivadas de un anticuerpo humano, es preferente desde el punto de vista de la seguridad. Tenga en cuenta que el término "respectivamente" tiene el mismo significado que "en secuencia".

Un anticuerpo anti-PAD4 de acuerdo con una realización de la presente invención puede ser al menos un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en: un anticuerpo que contiene las secuencias de aminoácidos de una cadena pesada y una cadena ligera como se establece en SEQ ID NO: 170 y 171, respectivamente; un anticuerpo que contiene las secuencias de aminoácidos de una cadena pesada y una cadena ligera según se establece en SEQ ID NO: 172 y 173, respectivamente; un anticuerpo que contiene las secuencias de aminoácidos de una cadena pesada y una cadena ligera según se establece en SEQ ID NO: 174 y 175, respectivamente; un anticuerpo que contiene las secuencias de aminoácidos de una cadena pesada y una cadena ligera según se establece en SEQ ID NO: 176 y 177, respectivamente; y un anticuerpo que contiene las secuencias de aminoácidos de una cadena pesada y una cadena ligera según se establece en SEQ ID NO: 196 y 197, respectivamente. Debido a que este anticuerpo tiene secuencias FR y secuencias de región constante derivadas de un anticuerpo humano, el anticuerpo es preferente desde el punto de vista de la seguridad. Tenga en cuenta que el término "respectivamente" tiene el mismo significado que "en secuencia".

Siempre que un anticuerpo anti-PAD4 de acuerdo con una realización de la presente invención ejerza los efectos deseados, su región variable de cadena pesada puede contener la secuencia de aminoácidos establecida en 186, 188, 190, 192, 194, 155, 156, 157, 162, 163, o 164; la región variable de cadena ligera puede contener la secuencia de aminoácidos establecida en 187, 189, 191, 193, 195, 158, 159, 160, 161, 165, 166, 167, 168, o 169. En este momento, la combinación de la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera no tiene ninguna limitación particular, y puede permitirse cualquier combinación. Dado que este anticuerpo tiene secuencias FR derivadas de un anticuerpo humano, es preferente desde el punto de vista de la seguridad.

Siempre que un anticuerpo anti-PAD4 de acuerdo con una realización de la presente invención ejerza los efectos deseados, su cadena pesada puede contener la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 170, 172, 174, 176, o 196; y su cadena ligera puede contener la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 171, 173, 175, 177 o 197. En este momento, la combinación de la cadena pesada y la cadena ligera no tiene ninguna limitación particular, y puede permitirse cualquier combinación. Debido a que este anticuerpo tiene secuencias FR y secuencias de región constante derivadas de un anticuerpo humano, el anticuerpo es preferente desde el punto de vista de la seguridad.

Siempre que el anticuerpo anti-PAD4 ejerza el efecto deseado, su secuencia de aminoácidos enumerada anteriormente puede ser al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: (i)

secuencias de aminoácidos que tengan una o varias deleciones, sustituciones, inserciones o adiciones de aminoácidos en las secuencias de aminoácidos anteriores; (ii) secuencias de aminoácidos que tengan un 90% o más de homología con las secuencias de aminoácidos anteriores; y (iii) secuencias de aminoácidos codificadas por polinucleótidos específicamente hibridados, en condiciones estrictas, con polinucleótidos que tengan secuencias de nucleótidos complementarias a las secuencias de nucleótidos que codifican las secuencias de aminoácidos anteriores. Los puntos (i) a (iii) anteriores son aplicables a las secuencias de aminoácidos enumeradas en el listado de secuencias. Cuando las secuencias se refieren a ácido nucleico, las secuencias de aminoácidos pueden convertirse y leerse como secuencias de nucleótidos.

Como se utiliza en el presente documento, el término "varios" puede significar que el número es, por ejemplo, 10, 8, 6, 5, 4, 3 o 2. El número puede ser igual o menor que cualquiera de los valores anteriores. Se sabe que un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos ha sido modificada por una o varias supresiones, adiciones, inserciones o sustituciones de residuos de aminoácidos por otros aminoácidos puede mantener su actividad biológica (Mark et al., Proc Natl Acad Sci US A., 1984, Sep., 81(18), 5662-5666; Zoller et al., Nucleic Acids Res., 1982, 25 de octubre, 10(20), 6487-6500y Wang et al., Science, 1984, Jun. 29, 224(4656), 1431-1433). Por ejemplo, el anticuerpo que tiene tales deleciones, etc., puede producirse mediante el uso de mutagénesis específica de sitio, mutagénesis aleatoria o biopanning mediante el uso de una biblioteca de fagos de anticuerpos. En la mutagénesis de sitio específico, puede utilizarse, por ejemplo, un kit de mutagénesis KOD-Plus (TOYOBO CO., LTD.). A fin de seleccionar un anticuerpo que tenga sustancialmente la misma actividad que el tipo salvaje a partir de anticuerpos mutantes que tengan deleciones, etc., se pueden llevar a cabo varios tipos de caracterización por medio de análisis FACS, ELISA, etc.

Como se utiliza en el presente documento, el término "90% o más" puede significar que el número es, por ejemplo, 90, 95, 96, 97, 98, 99% o más, o 100%. El número puede estar comprendido entre dos de los valores anteriores. El término "homología" puede referirse a una relación entre el número de aminoácidos idénticos entre dos o entre una pluralidad de secuencias de aminoácidos y el número total de aminoácidos, calculado de acuerdo con un procedimiento conocido en la técnica. Antes de calcular la proporción, se alinean las secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo de secuencias de aminoácidos comparadas. Si se requiere optimizar la proporción de aminoácidos idénticos, se insertan huecos en algunas partes de la secuencia de aminoácidos. Los procedimientos de alineación, los procedimientos de cálculo de proporciones, los procedimientos de comparación y los programas informáticos relacionados son bien conocidos en la técnica (por ejemplo, BLAST, GENETYX). Como se utiliza en el presente documento, a menos que se indique lo contrario, el término "homología" puede representarse por medio de un valor determinado por el programa BLAST del NCBI. Blastp puede utilizarse por defecto como algoritmo cuando se utiliza BLAST para comparar secuencias de aminoácidos. Los valores numéricos de los resultados medidos se designan como "Positivos" o "Identidades".

Las siguientes condiciones, por ejemplo, pueden utilizarse como la "condición estricta" anterior. (1) Se utiliza una solución de baja fuerza iónica para el lavado a alta temperatura (por ejemplo, una solución a 50°C que contenga 0,015 M de cloruro sódico/0,0015 M de citrato sódico/0,1% de dodecil sulfato sódico); (2) se utiliza un agente desnaturalizante tal como la formamida durante la hibridación (por ejemplo, una solución a 42°C que contiene formamida al 50% (v/v), albúmina de suero bovino al 0,1%/0,1% Ficoll/0,1% polivinilpirrolidona/tampón fosfato sódico 50 mM a pH 6,5, cloruro sódico 750 mM y citrato sódico 75 mM); o (3) se incuba un filtro durante la noche a 37°C en una solución que contiene formamida al 20%, 5 × SSC, fosfato sódico 50 mM (pH 7.6), 5 × solución de Denhardt, 10% de sulfato de dextrano y 20 mg/ml de ADN de espermatozoide de salmón desnaturalizado, y a continuación se lava el filtro con 1 × SSC a una temperatura de 37 a 50°C aproximadamente. Obsérvese que la concentración de formamida puede ser del 50% o más. El tiempo de lavado puede ser de 5, 15, 30, 60, 120 minutos o más. Una pluralidad de factores, tales como la temperatura y la concentración de sal, parecen afectar a la rigurosidad de una reacción de hibridación. Los detalles pueden encontrarse en el documento Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995).

Como se usa en el presente documento, el término "aminoácido" significa el término general para un compuesto orgánico que tiene un grupo amino y un grupo carboxilo. Cuando un anticuerpo de acuerdo con una realización de la presente invención contiene una "secuencia de aminoácidos específica", cualquiera de los aminoácidos de la secuencia de aminoácidos puede modificarse químicamente. Además, cualquiera de los aminoácidos de la secuencia de aminoácidos puede implicar la formación de una sal o un solvato. Además, cualquiera de los aminoácidos de la secuencia de aminoácidos puede ser un aminoácido de forma L o de forma D. Incluso en tal caso, puede decirse que un anticuerpo de acuerdo con una realización de la presente invención contiene la "secuencia específica de aminoácidos" mencionada anteriormente. Ejemplos conocidos de modificaciones químicas *in vivo* de aminoácidos en una proteína incluyen: Modificaciones N-terminales (por ejemplo, acetilación, miristilación); modificaciones C-terminales (por ejemplo, amidación, adición de glucosilfosfatidilinositol); y modificaciones de la cadena lateral (por ejemplo, fosforilación, glucosilación).

Una realización de la presente invención proporciona un polinucleótido o vector que codifica un anticuerpo anti-PAD4 de acuerdo con la realización anterior de la presente invención. Este polinucleótido o vector puede introducirse en una célula para generar un transformante. Los transformantes pueden ser células derivadas de un mamífero humano o no humano (por ejemplo, una rata, ratón, cobaya, conejo, vaca, mono, etc.). Ejemplos de células de mamífero incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), células de mono COS-7 y células de riñón embrionario humano (por ejemplo, células HEK293). Además, los transformantes pueden ser células de *Escherichia coli*, levaduras, etc. El

polinucleótido o vector anterior puede construirse para permitir la expresión de un anticuerpo anti-PAD4. El polinucleótido o vector anterior puede contener, por ejemplo, un promotor, un potenciador, un origen de replicación y/o un gen de resistencia a antibióticos, que son componentes esenciales para la expresión de proteínas. El polinucleótido o vector anterior puede tener una secuencia de nucleótidos extraña. La secuencia de nucleótidos extraña puede contener secuencias de nucleótidos derivadas de al menos dos organismos seleccionados del grupo que consiste en organismos humanos y no humanos (por ejemplo, bacterias, arqueas, levaduras, insectos, aves, virus, mamíferos excluyendo un humano).

Algunos ejemplos del vector anterior que pueden utilizarse son: Plásmidos derivados de *E. coli* (p. ej., pET-Blue); plásmidos derivados de *Bacillus subtilis* (p. ej., pUB 110); plásmidos derivados de levaduras (p. ej., pSH19); plásmidos de expresión para células animales (p. ej., pA1-11, pcDNA3.1-V5/His-TOPO); bacteriófagos tales como el fago λ ; y vectores derivados de virus. El vector anterior puede ser un vector de expresión y puede ser circular.

Los ejemplos de un procedimiento para introducir el polinucleótido o vector anterior en una célula incluyen un procedimiento de fosfato de calcio, lipofección, electroporación, un procedimiento mediado por adenovirus, un procedimiento mediado por retrovirus, microinyección y similares ("Genetic Engineering Handbook", 4ª edición, YODOSHA CO., LTD. (2003): 152-179). Cada procedimiento descrito en, por ejemplo, "Protein Experiment Handbook", YODOSHA CO., LTD., (2003), 128-142 puede utilizarse como proceso para producir un anticuerpo mediante el uso de células.

Una realización de la presente invención proporciona un proceso para producir un anticuerpo anti-PAD4, que comprende la etapa de hacer proliferar una célula que contiene un polinucleótido o vector de acuerdo con la realización anterior de la presente invención. La etapa de proliferación anterior incluye una etapa de cultivo. Además, este proceso de producción puede incluir una etapa de recogida de un anticuerpo anti-PAD4. Además, este proceso de producción puede incluir una etapa de preparación de un medio de cultivo celular. Además, este proceso de producción puede incluir una etapa de purificación de un anticuerpo anti-PAD4.

Como se utilizan en el presente documento, los ejemplos de un procedimiento para purificar un anticuerpo incluyen: precipitación con sulfato de amonio; precipitación con etanol; cromatografía de filtración de proteína A, proteína G o gel; cromatografía de intercambio aniónico o catiónico; cromatografía de fosfocelulosa; cromatografía de interacción hidrofóbica; cromatografía de afinidad; cromatografía de hidroxipatita; cromatografía de lectina; y similares ("Protein Experiment Handbook", YODOSHA CO., LTD., 2003, 27-52).

Una realización de la presente invención proporciona una composición que contiene un anticuerpo anti-PAD4 de acuerdo con la realización anterior de la presente invención. La utilización de esta composición permite detectar eficazmente la PAD4. Además, se puede inhibir eficazmente la citrulinación de PAD4. Además, se puede tratar la AR o la artritis. Esta composición puede contener cualquier componente sin limitación, y puede contener, por ejemplo, un tampón. Al menos una de las diversas formas de realización (por ejemplo, puede incluirse un portador) de los inhibidores y composiciones farmacéuticas descritos a continuación es aplicable a esta composición.

Una realización de la presente invención proporciona un inhibidor de la actividad de citrulinación de PAD4, que comprende un anticuerpo anti-PAD4 de acuerdo con la realización anterior de la presente invención. Este inhibidor puede inhibir eficazmente la citrulinación de PAD4. El inhibidor anterior puede disminuir la actividad de citrulinación en un 20, 30, 40, 60 u 80% o más. La disminución puede estar comprendida entre dos de los valores anteriores. Esta disminución puede expresarse en un porcentaje relativo, mientras que una disminución cuando se utiliza PBS se establece en 0%. Como se utiliza en el presente documento, el término "agente (por ejemplo, un inhibidor)" incluye, por ejemplo, una composición utilizada para la investigación o el tratamiento. El inhibidor mencionado incluye, por ejemplo, un agente terapéutico para la AR o la artritis. El inhibidor anterior puede utilizarse, por ejemplo, *in vitro* o *in vivo*. El inhibidor anterior puede contener una composición de acuerdo con la realización anterior de la presente invención. Una realización de la presente invención proporciona un procedimiento para inhibir la actividad de citrulinación de PAD4, que comprende una etapa de administrar a un paciente un anticuerpo anti-PAD4 de acuerdo con la realización anterior de la presente invención. El procedimiento de inhibición anterior incluye un protocolo de inhibición para investigación o tratamiento. Una realización de la presente invención proporciona el uso de un anticuerpo anti-PAD4 de acuerdo con la realización anterior de la presente invención para producir un inhibidor de la actividad de citrulinación de PAD4.

Una realización de la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-PAD4 de acuerdo con la realización anterior de la presente invención. El uso de esta composición farmacéutica permite el tratamiento de la AR o la artritis. La composición farmacéutica anterior puede contener al menos un portador farmacológicamente aceptable. La composición farmacéutica anterior contiene, por ejemplo, una composición farmacéutica para el tratamiento de la AR o la artritis. La composición farmacéutica anterior puede contener una composición de acuerdo con la realización anterior de la presente invención. Una realización de la presente invención proporciona un procedimiento para tratar una enfermedad, que comprende una etapa de administrar a un paciente un anticuerpo anti-PAD4 (o una composición farmacéutica que contiene un anticuerpo anti-PAD4) de acuerdo con la realización anterior de la presente invención. La enfermedad mencionada incluye, por ejemplo, la AR o la artritis. Una

realización de la presente invención proporciona el uso de un anticuerpo anti-PAD4 de acuerdo con la realización anterior de la presente invención para producir una composición farmacéutica.

De acuerdo con un informe, el número de pacientes con AR asciende a 70 millones en todo el mundo. Algunos fármacos están actualmente disponibles en el mercado, pero en un determinado porcentaje de pacientes, los medicamentos existentes son ineficaces. Puede decirse que entre el 60 y el 80% de los pacientes no han recibido un tratamiento satisfactorio. Además, se ha señalado que los fármacos existentes también pueden presentar un problema de efectos secundarios. El uso de un anticuerpo anti-PAD4 de acuerdo con la realización anterior de la presente invención permite tratar la AR por medio de un nuevo mecanismo de acción.

Una realización de la presente invención proporciona un agente de diagnóstico para AR o artritis, que comprende un anticuerpo anti-PAD4 de acuerdo con la realización anterior de la presente invención. El uso de este agente diagnóstico permite diagnosticar eficazmente la AR o la artritis. Una realización de la presente invención proporciona un procedimiento para diagnosticar AR o artritis, que comprende una etapa de hacer que la muestra de un paciente entre en contacto con un anticuerpo anti-PAD4 de acuerdo con la realización anterior de la presente invención. Una realización de la presente invención proporciona un reactivo para detectar PAD4, que comprende un anticuerpo anti-PAD4 de acuerdo con la realización anterior de la presente invención. El uso de este reactivo permite una detección eficaz de PAD4. Una realización de la presente invención proporciona un procedimiento para detectar PAD4, que comprende una etapa de hacer que una muestra de ensayo entre en contacto con un anticuerpo anti-PAD4 de acuerdo con la realización anterior de la presente invención. Una realización de la presente invención proporciona un kit que comprende un anticuerpo anti-PAD4 de acuerdo con la realización anterior de la presente invención. El uso de este kit permite tratar y diagnosticar una enfermedad o detectar PAD4. Este kit puede incluir, por ejemplo, una composición, un inhibidor, una composición farmacéutica, un agente de diagnóstico o un reactivo de detección de acuerdo con las realizaciones anteriores de la presente invención. Este kit también puede incluir un prospecto, un tampón, un recipiente (por ejemplo, un vial o una jeringa) o un envoltorio.

Una realización de la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-PAD4 y un inhibidor de TNF α . El uso de esta composición farmacéutica permite el tratamiento de la AR o la artritis. La combinación del anticuerpo anti-PAD4 y el inhibidor del TNF α puede ejercer un efecto terapéutico sinérgico sobre la AR o la artritis. En vista de lo anterior, puede decirse que esta combinación de dos componentes es muy excelente como fármaco de dos componentes seleccionado cuando se utiliza la terapia combinada para el tratamiento de la AR o la artritis. Además, el efecto terapéutico sinérgico permite reducir la dosis, con lo que se consigue un tratamiento muy seguro.

Cuando un anticuerpo anti-PAD4 y un inhibidor de TNF α se utilizan en combinación, los tipos del anticuerpo anti-PAD4 no tienen ninguna limitación particular. Los ejemplos pueden incluir: un anticuerpo anti-PAD4 que se une específicamente a un epítipo que contiene las posiciones 345, 347 y 348 de PAD4; anticuerpos establecidos en los anteriores (a) a (f); y anticuerpos que contienen las CDR de cadena pesada 1 a 3 y las CDR de cadena ligera 1 a 3 derivadas de un pollo. Además, el anticuerpo anti-PAD4 de interés puede ser un anticuerpo de acuerdo con la realización anterior de la presente invención. Además, también pueden utilizarse anticuerpos anti-PAD4 disponibles en el mercado o anticuerpos anti-PAD4 descritos en publicaciones. Es preferente utilizar un anticuerpo anti-PAD4 humanizado como anticuerpo anti-PAD4 desde el punto de vista de la seguridad y del aumento de los efectos sinérgicos cuando el anticuerpo anti-PAD4 y un inhibidor del TNF α se utilizan en combinación para tratar la AR o la artritis.

Cuando un anticuerpo anti-PAD4 y un inhibidor de TNF α se usan en combinación, ejemplos del tipo del inhibidor de TNF α pueden incluir, pero no se limitan particularmente a, un anticuerpo anti-TNF α , una proteína de fusión de receptor de TNF, un mutante dominante negativo del TNF α , y una molécula de ARNi, molécula de miARN, o ácido nucleico antisentido contra el TNF α , y polinucleótidos que codifican la molécula de ARNi, molécula de miARN, o ácido nucleico antisentido contra el TNF α . Ejemplos del anticuerpo anti-TNF α pueden ser infliximab, adalimumab, golimumab, certolizumab pegol, ozoralizumab y ABT0122 (anticuerpo biespecífico anti-IL-17/anti-TNF α). Ejemplos de la proteína de fusión del receptor TNF pueden incluir etanercept. La forma de la molécula de RNAi puede ser siRNA o shRNA y su fabricación puede llevarse a cabo como un servicio de una empresa de servicios (por ejemplo, TAKARA BIO INC.). Cualquiera de estos preparados biológicos puede utilizarse como inhibidor del TNF α utilizado. Es preferente utilizar un anticuerpo anti-TNF α o una proteína de fusión del receptor del TNF como inhibidor del TNF α desde el punto de vista del aumento de los efectos sinérgicos cuando un anticuerpo anti-PAD4 y el inhibidor del TNF α se utilizan en combinación para tratar la AR o la artritis. Es preferente especialmente una proteína de fusión del receptor del TNF.

Una realización de la presente invención proporciona una composición farmacéutica que contiene anticuerpo anti-PAD4 utilizada cuando el anticuerpo anti-PAD4 y un inhibidor de TNF α se utilizan en combinación. El uso de esta composición farmacéutica permite el tratamiento de la AR o la artritis. Obsérvese que un prospecto adjunto a la composición farmacéutica anterior puede indicar el uso de la combinación.

Una realización de la presente invención proporciona una composición farmacéutica que contiene inhibidor de TNF α utilizada cuando un anticuerpo anti-PAD4 y el inhibidor de TNF α se utilizan en combinación. El uso de esta composición farmacéutica permite el tratamiento de la AR o la artritis. Obsérvese que un prospecto adjunto a la composición farmacéutica anterior puede indicar el uso de la combinación.

Una realización de la presente invención proporciona un producto que comprende una composición farmacéutica que contiene anticuerpo anti-PAD4 y un envase o prospecto que indica el uso de una combinación del anticuerpo anti-PAD4 y un inhibidor del TNF α . Una realización de la presente invención proporciona un producto que comprende una composición farmacéutica que contiene inhibidor de TNF α y un envase o prospecto que indica el uso de una combinación de un anticuerpo anti-PAD4 y el inhibidor de TNF α . El uso de este producto permite el tratamiento de la AR o la artritis.

Una realización de la presente invención proporciona un kit de tratamiento que comprende un anticuerpo anti-PAD4 y un inhibidor de TNF α . El uso de este kit permite el tratamiento de la AR o la artritis. Este kit puede contener además, por ejemplo, un tampón, un prospecto que describa información sobre un principio activo, un recipiente para almacenar el principio activo o un envase.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "utilizado en combinación" significa que un anticuerpo anti-PAD4 y un inhibidor del TNF α pueden administrarse simultáneamente o por separado. Además, la expresión "utilizado en combinación" incluye una forma de dosificación en la que un anticuerpo anti-PAD4 y un inhibidor del TNF α se administran como combinación. Además, la expresión "utilizado en combinación" incluye el uso durante la terapia combinada. Mientras tanto, en cuanto al orden de administración, se puede administrar primero un anticuerpo anti-PAD4 o un inhibidor del TNF α . Una realización de la presente invención proporciona una combinación que comprende un anticuerpo anti-PAD4 y un inhibidor de TNF α . Una realización de la presente invención proporciona el uso de un anticuerpo anti-PAD4 en la fabricación de una composición farmacéutica utilizada cuando el anticuerpo anti-PAD4 y un inhibidor de TNF α se utilizan en combinación. Una realización de la presente invención proporciona el uso de un inhibidor de TNF α en la fabricación de una composición farmacéutica utilizada cuando un anticuerpo anti-PAD4 y el inhibidor de TNF α se utilizan en combinación.

Una realización de la presente invención proporciona un procedimiento de tratamiento que comprende una etapa de administrar, a un sujeto, un anticuerpo anti-PAD4 y un inhibidor de TNF α . El uso de este procedimiento de tratamiento permite tratar la AR o la artritis. La combinación del anticuerpo anti-PAD4 y el inhibidor del TNF α puede ejercer un efecto terapéutico sinérgico en la AR o artritis. En vista de lo anterior, puede decirse que esta combinación de dos componentes es muy excelente como fármaco de dos componentes seleccionado cuando se utiliza la terapia combinada para el tratamiento de la AR o la artritis. Además, una realización de la presente invención proporciona un procedimiento de tratamiento que comprende una etapa de administrar, a un sujeto, un anticuerpo anti-PAD4 y/o un inhibidor de TNF α . Además, una realización de la presente invención proporciona el uso de un anticuerpo anti-PAD4 y/o un inhibidor de TNF α en la fabricación de una composición farmacéutica. El sujeto puede ser un paciente que ya ha recibido un anticuerpo anti-PAD4 o un inhibidor del TNF α .

Como se utiliza en el presente documento, el término "tratamiento" incluye ejercer un efecto profiláctico, un efecto inhibidor o un efecto de mejora de los síntomas sobre una enfermedad de un paciente o sobre uno o más síntomas relacionados con la enfermedad. Como se utiliza en el presente documento, el "fármaco terapéutico" puede ser una composición farmacéutica que contiene un principio activo y al menos un portador farmacológicamente aceptable. Como se utiliza en el presente documento, la "composición farmacéutica" puede producirse por medio de cualquier proceso conocido en la técnica de la formulación de fármacos. Ejemplos del proceso incluyen: mezclar un ingrediente activo con el portador anterior. Además, la forma de dosificación de la composición farmacéutica no está limitada siempre que la composición farmacéutica pueda utilizarse para el tratamiento. La composición farmacéutica puede ser un principio activo solo o una mezcla de un principio activo y cualquier componente. Además, los ejemplos de la forma de dosificación del portador anterior incluyen, pero no se limitan particularmente a, un sólido y un líquido (por ejemplo, un tampón). El contenido del soporte anterior puede ser, por ejemplo, una dosis farmacéuticamente eficaz. Esta dosis eficaz puede ser una cantidad suficiente desde el punto de vista de la administración o de la seguridad farmacéutica del principio activo. Por ejemplo, un tampón es eficaz para estabilizar el principio activo en un vial.

Para la composición farmacéutica se utiliza preferentemente una vía de administración eficaz en el tratamiento. Ejemplos de la vía de administración incluyen la administración intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal y oral. Ejemplos de la forma de dosificación pueden incluir una inyección, una cápsula, una tableta y gránulos. Cuando se administra un anticuerpo, el uso de una inyección es eficaz. Una solución acuosa para una inyección puede almacenarse, por ejemplo, en un vial o en un recipiente inoxidable. Además, la solución acuosa para una inyección puede formularse, por ejemplo, con una solución salina, un azúcar (por ejemplo, trehalosa), NaCl o NaOH. Además, la composición farmacéutica puede formularse con cantidades eficaces de, por ejemplo, un tampón (por ejemplo, un tampón fosfato), un modificador del pH y/o un estabilizador.

Los ejemplos de la dosis incluyen, pero no están particularmente limitados a, 0,01 a 200 mg/kg de peso corporal por dosificación. El intervalo de administración no está particularmente limitado, y el fármaco puede dosificarse, por ejemplo, una o dos veces cada 1 a 28 días. Además, la dosis, el intervalo de administración y el procedimiento de administración pueden seleccionarse adecuadamente en función de la edad, el peso corporal, el síntoma, el órgano afectado, etc., de un paciente. Además, la composición farmacéutica contiene preferentemente una cantidad terapéuticamente eficaz o una dosis, que es eficaz para ejercer un efecto deseado, de un principio activo. Cuando un anticuerpo anti-PAD4 y un inhibidor del TNF α se utilizan en combinación, la dosis de cada fármaco puede ser inferior a la cantidad terapéuticamente eficaz cuando estos fármacos se dosifican por separado.

El efecto terapéutico de la composición farmacéutica puede evaluarse mediante el uso de, por ejemplo, una puntuación de artritis, una puntuación de AR, un tamaño de inflamación, imágenes diagnósticas, una puntuación Total Sharp modificada o un marcador de enfermedad. Cuando se utiliza el tamaño de la hinchazón para la evaluación, puede determinarse que existe un efecto terapéutico cuando la disminución del tamaño de la hinchazón de un lugar afectado durante la administración de la composición farmacéutica es significativamente mayor que la disminución del tamaño de la hinchazón en el caso sin administración. Alternativamente, puede determinarse que existe un efecto terapéutico cuando la disminución del tamaño de la hinchazón de un lugar afectado durante la administración de la composición farmacéutica es significativamente mayor que la disminución del tamaño de la hinchazón de un lugar afectado durante la administración de una sustancia de control negativa. La disminución anterior puede ser, por ejemplo, del 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100%. El número puede estar comprendido entre dos de los valores anteriores.

Como se utiliza en el presente documento, los ejemplos de "paciente" incluyen mamíferos humanos y no humanos (por ejemplo, al menos uno de un ratón, un conejillo de indias, un hámster, una rata, un ratón, un conejo, un cerdo, una oveja, una cabra, una vaca, un caballo, un gato, un perro, un títí, un mono y un chimpancé). Mientras tanto, el paciente puede ser un paciente al que se le diagnostica AR o artritis. Además, el paciente puede ser un paciente al que se le ha diagnosticado una enfermedad cuyo tratamiento puede conseguirse por medio de la inhibición de la citrulinación.

Una realización de la presente invención proporciona un procedimiento para promover un efecto de tratamiento o una función inhibidora de la actividad de citrulinación de una composición, que comprende una etapa para aumentar la proporción composicional de un anticuerpo anti-PAD4 que se une específicamente a un epítipo que contiene las posiciones 345, 347 y 348 de PAD4. Una realización de la presente invención proporciona una composición que contiene anticuerpos anti-PAD4 en la que al menos el 90% del anticuerpo anti-PAD4 de la composición es un anticuerpo anti-PAD4 que se une específicamente a un epítipo que contiene las posiciones 345, 347 y 348 de PAD4. Una realización de la presente invención proporciona una población que contiene anticuerpos anti-PAD4 en la que al menos el 90% del anticuerpo anti-PAD4 es un anticuerpo anti-PAD4 que se une específicamente a un epítipo que contiene las posiciones 345, 347 y 348 de PAD4. El término anterior "al menos 90%" puede significar que el número es, por ejemplo, 90, 95, 96, 97, 98, 99% o más, o 100%. El número puede estar comprendido entre dos de los valores anteriores.

Como se utiliza en el presente documento, el término "enlace" puede ser un enlace covalente o un enlace no covalente, y entre los ejemplos de enlace se incluyen un enlace iónico, un enlace de hidrógeno, una interacción hidrofóbica y una interacción hidrofílica.

Como se utiliza en el presente documento, el término "significativamente" puede incluir un caso de $p < 0,05$ o $p < 0,01$ cuando se utiliza la prueba t de Student (unilateral o bilateral), por ejemplo, para evaluar una diferencia estadísticamente significativa. Asimismo, el término puede incluir un estado en el que exista una diferencia sustancial.

Como se utiliza en el presente documento, el término "o" puede utilizarse cuando puede emplearse "al menos una" materia enumerada en el texto de la especificación. Lo mismo ocurre con el término "o". Como se utiliza en el presente documento, cuando se indica la expresión "entre dos valores cualesquiera de los anteriores", los dos valores son inclusivos en el intervalo. Como se utiliza en el presente documento, la frase "de A a B" significa "A o más y B o menos".

Como se ha descrito anteriormente, se han ilustrado las realizaciones de la presente invención. Estas realizaciones son ejemplos de la presente invención. Por consiguiente, pueden adoptarse otras configuraciones distintas de las anteriores. Además, también pueden emplearse combinaciones entre las realizaciones descritas anteriormente.

Ejemplos

En adelante en la presente memoria, la presente invención se ilustra con más detalle haciendo referencia a los Ejemplos. Sin embargo, la presente invención no se limita a ellos.

<Ejemplo 1> Generación de anticuerpos anti-PAD4

En primer lugar, tres pollos Boris Brown de 3 meses de edad fueron inmunizados por vía intraperitoneal con 333 μg de TA0096 modificado con KLH (SEQ ID NO: 1). TA0096 es un antígeno peptídico que corresponde a las posiciones 340 a 356 de PAD4 (SEQ ID NO: 2). Junto con el antígeno, se utilizó adyuvante de Freund completo (Wako, 014-09541) para la primera inmunización y adyuvante de Freund incompleto (Wako, 011-09551) para la segunda y tercera inmunización. En la cuarta inmunización, se inyectó por vía intravenosa el antígeno diluido en PBS (solución salina tamponada con fosfato). Se extrajo sangre de la vena del ala cada dos semanas y se utilizó ELISA para determinar el título de anticuerpos. Tres pollos fueron inmunizados tres veces y el pollo con el título de anticuerpos más alto fue inmunizado cuatro veces. Esta cuarta inmunización fue la última. Tres días después de la inmunización final, se recogió el bazo del pollo. A continuación, se llevó a cabo una centrifugación en gradiente de densidad mediante el uso de Ficoll paque PLUS (GE Healthcare, 17-1440-03) para aislar los linfocitos, de los que se extrajo el ARN mediante el uso de un reactivo TRIzol (Life Technologies, 15596026). El ARN extraído se sometió a RT-PCR mediante el uso de un kit PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis (TAKARA, 6210A) para sintetizar ADNc y a continuación se construyó una biblioteca de fagos scFv. Se utilizó un vector de expresión pPDS en el que se insertó una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena λ de pollo en lugar de una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena κ de ratón. La

biblioteca de fagos scFv se construyó de acuerdo con el procedimiento descrito en un documento de referencia: "Nakamura et al., J Vet Med Sci., 2004, julio, 66(7), 807-814".

La biblioteca de anticuerpos fago scFv se utilizó para el paneo mediante el uso de una placa en la que se inmovilizó un antígeno peptídico modificado con BSA. El paneo se realizó de acuerdo con el procedimiento descrito en un documento de referencia: "Nakamura et al., J Vet Med Sci., 2004, julio, 66(7), 807-814". Tras el quinto paneo, se examinó la reactividad de la biblioteca por medio de ELISA mediante el uso de una placa en la que se inmovilizó un antígeno peptídico modificado con BSA. La biblioteca con mayor reactividad se sometió al cribado de fagos. En el cribado, *E. coli* se infectó con fagos y se sembró en placas de 2 × YT Agar con 50-µg/ml de ampicilina (nacalai, 02739-32). La colonia resultante se cultivó en un medio líquido 2 × YT que contenía ampicilina. Tras la infección con fagos ayudantes, los fagos de interés se indujeron en un medio líquido 2 × YT que contenía 50 µg/ml de ampicilina, 25 µg/ml de kanamicina (Meiji Seika Pharma Co., Ltd., GS1-RSS) y 100 µg/ml de IPTG (nacalai, 19742-94). La reactividad de cada anticuerpo fago scFv en el sobrenadante de cultivo resultante se determinó por medio de ELISA mediante el uso de una placa inmovilizada con antígeno. Los clones positivos resultantes se secuenciaron con un secuenciador de ADN (Applied Biosystems, ABI PRISM 3100-Genetic Analyzer) para determinar sus secuencias.

Con respecto a cada uno de los clones con secuencias diferentes, se utilizó una cadena de ADN que codifica su anticuerpo scFv como molde para amplificar por PCR el gen que codifica una región variable de la cadena H y una región variable de la cadena L de un anticuerpo de pollo. A continuación, los productos de la PCR se digirieron con las enzimas de restricción SacII (BioLabs Inc., Cat#R0157S) y NheI (BioLabs Inc., Cat#R0 131S). Asimismo, los vectores de expresión de anticuerpos quiméricos de ratón (IgG 1) (vector de expresión de la cadena H: pcDNA4/myc-His; vector de expresión de la cadena L: pcDNA3/myc-His, Invitrogen) fueron digeridos por las enzimas de restricción para clonar las respectivas secuencias de la región variable de la cadena H y de la cadena L en los vectores respectivos. Una vez transfectadas las células CHO con las construcciones de cadena H y cadena L preparadas, se examinó la reactividad de cada sobrenadante de cultivo por medio de ELISA mediante el uso de una placa en la que se inmovilizó un antígeno peptídico modificado con BSA o una proteína PAD4 recombinante de longitud completa. Como vector de expresión de anticuerpos quiméricos de ratón, se utilizó el vector descrito en Tateishi et al., J Vet Med Sci. 2008 Abr;70(4): 397-400. De los clones de anticuerpos obtenidos de este modo, A11, E9, G6, G8, G9 y H7 se utilizaron en los experimentos siguientes. Con respecto a A11, E9, G6, G8, G9 y H7, las secuencias de aminoácidos de sus regiones variables de cadena pesada se exponen en SEQ ID Nros.: 3 a 8; y las secuencias de ADN se establecen en SEQ ID Nros.: de 9 a 14 años. Las secuencias de aminoácidos de sus regiones variables de cadena ligera se exponen en SEQ ID Nros.: 15 a 20; y las secuencias de ADN se exponen en SEQ ID Nros.: del 21 al 26. En adelante en la presente memoria, estos anticuerpos se denominarán en general "A11, etc."

Para la producción en masa de cada uno de los clones de anticuerpos como A11, etc., los vectores de expresión de cadena H y cadena L construidos se transfectaron mediante el uso de un sistema de Expresión Expi293 (Invitrogen, A14635). A continuación, el anticuerpo expresado se purificó mediante el uso de Proteína G Sepharose 4 Fast Flow (GE healthcare, 17-018-02). El Ejemplo 2 demuestra la reactividad de cada anticuerpo purificado frente a PAD4.

<Ejemplo 2> Evaluación de la reactividad de cada anticuerpo anti-PAD4

(1) ELISA

La prueba ELISA se llevó a cabo en las siguientes condiciones para evaluar la reactividad de cada uno de los A11, etc. hacia la PAD4 humana o de ratón.

(1-1) Materiales

- Antígeno: PAD4 humano o de ratón recombinante de longitud completa
- Anticuerpos: un anticuerpo anti-dinitrofenilo (DNP) (control negativo), L207 (un anticuerpo anti-PAD4 L207-11 descrito en los Ejemplos de WO2012/026309), A11, E9, G6, G8, G9 y H7

(1-2) Condiciones experimentales

45

Tabla 1

1	Inmovilización de antígenos en fase sólida:	50 µl/pocillo	O/N, a 4°C	5 µg/mL de PAD4 humano o PAD4 de ratón
2	Bloqueo:	250 µl/pocillo	60 min, a 37°C	25% Bloque Ace/PBS
3	Anticuerpo primario:	50 µl/pocillo	60 min, a 37°C	1 pg/mL de cada anticuerpo se diluyó 4 veces/ 10% Block Ace

ES 2 952 132 T3

4	Anticuerpo secundario:	50 µl/pocillo	60 min, a 37°C	IgG anti-ratón marcada con HRP (H + L) en 10% Block Ace/PBS (1:1000)
5	Sustrato cromogénico:	50 µl/pocillo	30 min, a RT	Solución OPD
6	Solución Stop:	50 µl/pocillo		2 NH ₂ SO ₄
7	Medición:	Longitud de onda de 490 nm/630 nm		

Tablas 2 y 3 y FIGS. 1 a 3 muestran los resultados de ELISA. Como se desprende de los resultados, cualquiera de A11, etc., mostró una afinidad mayor que L207.

[Tabla 2]

Afinidad con PAD4 humano (ELISA)								
Concentración de anticuerpos (pg/mL)	A11	E9	G6	G8	G9	H7	L207	Anticuerpo anti-DNP
1	2,154	2,108	2,113	2,120	2,105	2,107	2,157	0,020
0,25	2,107	2,085	2,068	2,098	2,083	2,113	2,143	0,025
0,0625	2,150	2,123	2,120	2,125	2,110	2,118	2,099	0,023
0,015625	2,084	2,080	2,012	2,082	2,070	2,066	1,272	0,027
0,0039063	1,307	1,356	1,164	1,340	1,359	1,354	0,399	0,026
0,0009766	0,511	0,489	0,437	0,544	0,534	0,537	0,116	0,023
0,0002441	0,206	0,176	0,166	0,184	0,187	0,217	0,055	0,024
6.104E-05	0,063	0,070	0,075	0,100	0,082	0,111	0,042	0,009

[Tabla 3]

Afinidad con PAD4 de ratón (ELISA)								
Concentración de anticuerpos (µg/mL)	A11	E9	G6	G8	G9	H7	L207	Anticuerpo anti-DNP
1	2,242	2,235	2,275	2,264	2,304	2,304	2,28	0,028
0,25	2,246	2,231	2,27	2,252	2,252	2,308	2,094	0,023
0,0625	2,243	2,185	2,158	2,221	2,236	2,292	1,236	0,020
0,015625	2,017	1,859	1,353	2,255	2,208	2,264	0,459	0,018
0,0039063	1,072	0,956	0,550	1,417	1,385	1,414	0,137	0,024
0,0009766	0,386	0,416	0,200	0,555	0,542	0,550	0,066	0,021
0,0002441	0,152	0,122	0,071	0,205	0,181	0,224	0,043	0,034
6.104E-05	0,045	0,051	0,044	0,122	0,079	0,103	0,029	0,011

5 (2) Ensayo de afinidad

Biacore (GE Healthcare, Biacore T200) se llevó a cabo para evaluar la afinidad de A11 etc., hacia PAD4 humano. Para el ensayo de afinidad se utilizó un kit de captura de anticuerpos de ratón (GE Healthcare, BR-1008-38). Específicamente, de acuerdo con el protocolo estándar proporcionado por la fabricación, se utilizó NHS/EDC y un procedimiento de acoplamiento de amina, en el que se fija un grupo carboxilo libre en una superficie de un chip CM5,

para inmovilizar un anticuerpo policlonal de conejo anti-ratón en la superficie de un chip CM5. A continuación, A11, etc., fueron capturados cada uno por el anticuerpo policlonal de conejo anti-ratón. L207 también fue capturado. A continuación, la PAD4 humana a cada concentración se sometió a la medición Biacore T200 para crear un sensorgrama cinético.

- 5 Tabla 4 y FIG. 4 muestran los resultados del ensayo de afinidad. Como se desprende de los resultados, cualquiera de A11, etc., mostró una afinidad mayor que L207. Cuando se determinó la KD (M) de la misma, en particular, cualquiera de A11 etc. tenía una alta afinidad de $9,0 \times 10^{-9}$ o menos.

[Tabla 4]

Afinidad hacia PAD4 humano (ensayo Biacore)			
	kd (1/s)	ka (1/Ms)	KD (M)
A11	5.66E-04	1.29E+05	4.37E-09
E9	8.37E-04	1.52E+05	5.52E-09
G6	3.89E-04	4.45E+04	8.74E-09
G8	2.43E-04	1.04E+05	2.34E-09
G9	2.84E-04	9.00E+04	3.16E-09
H7	7.91E-04	1.05E+05	7.56E-09
L207	1.35E-03	1.29E+05	1.04E-08

<Ejemplo 3> Evaluación de epítomos

- 10 El epítomo de cada uno de los A11, etc., se identificó mediante escaneo de alanina. Concretamente, se llevaron a cabo los siguientes procedimientos (i) a (iii). (i) Cada residuo de aminoácido de la secuencia de antígeno (SEQ ID NO: 1) se sustituyó por otro aminoácido de uno en uno, y 17 mutantes Ala diferentes (SEQ ID Nros.: 27 a 43). (ii) Se evaluó la reactividad de cada uno de los mutantes Ala frente a un anticuerpo de prueba (ELISA). (iii) Con respecto a cada uno de los mutantes Ala con los que el anticuerpo de prueba no reaccionó significativamente, se determinó un residuo de aminoácido original antes de la sustitución Ala como parte de un epítomo.
- 15

La Tabla 5 muestra las condiciones experimentales de ELISA. El "96 pAb" designado en la tabla se refiere al antisuero obtenido inmunizando un pollo con TA0096 (SEQ ID NO: 1). El 96 pAb, que es un anticuerpo policlonal anti-PAD4, puede mantener sustancialmente la afinidad hacia PAD4 incluso si se sustituye alguno de los aminoácidos individuales de PAD4. Cuando la afinidad del anticuerpo de prueba hacia un mutante Ala era del 50% o menos que la afinidad del 96 pAb hacia el mutante Ala, se determinó que el anticuerpo de prueba no presentaba reactividad significativa.

20

[Tabla 5]

1	Inmovilización de antígenos en fase sólida:	50 µl/pocillo	O/N, a 4°C	10 µg/mL de un péptido
2	Bloqueo:	250 µl/pocillo	60 min, a 37°C	25% Bloque Ace/PBS
3	Anticuerpo primario:	50 µl/pocillo	60 min, a 37°C	1 pg/mL de cada anticuerpo se diluyó 4 veces/ 10% Block Ace (96 pAb fue una excepción)
				96 pAb (antisuero) se diluyó 1000 veces/ 10% Block Ace
4	Anticuerpo secundario:	50 µl/pocillo	60 min, a 37°C	IgG anti-ratón marcada con HRP (H+L) en 10% Block Ace/PBS (1: 1000) Anti-pollo marcado con HRP IgG (H+L) en 10% Block Ace/PBS (1: 1000)
5	Sustrato cromogénico:	50 µl/pocillo	30 min, a RT	Solución OPD

ES 2 952 132 T3

6	Solución Stop:	50 µl/pocillo		2 NH ₂ SO ₄
7	Medición:	Longitud de onda de 490 nm/630 nm		

La Tabla 6 muestra los resultados de ELISA y FIG. 5 muestra los resultados de la exploración de alanina. Como se desprende de los resultados, A11 etc. no reaccionaron significativamente con los mutantes Ala, cada uno de los cuales tenía una mutación en una posición correspondiente a la posición 345, 347 o 348 de PAD4. Esto reveló que A11 etc. se unen específicamente a un epítipo que contiene las posiciones 345, 347 y 348 de PAD4.

- 5 Por el contrario, L207 no reaccionó significativamente con los mutantes Ala, cada uno con una mutación en una posición correspondiente a la posición 350, 354, o 355 de PAD4. Es decir, se reveló que L207 reconoce un epítipo diferente al de A11, etc.

- 10 Obsérvese que, como experimentos adicionales, 6 mutantes Ala diferentes con sustitución de 3 aminoácidos (SEQ ID Nros.: 44 a 49) también se examinaron en los experimentos. Los resultados demostraron que todos los A11 etc. no reaccionaban significativamente con los mutantes Ala, cada uno de los cuales tenía una mutación(es) en una(s) posición(es) correspondiente(s) a la posición 345, 347, y/o 348 de PAD4.

[Tabla 6]

S N A l m E Q I D O de a u t a n t	A11	E9	G6	G8	G9	H7	L207	96 pAb	Anticuerpo AntiDNP
27	1,954	1,892	1,913	1,955	1,926	1,900	1,418	1,922	0,007
28	2,001	1,995	1,987	1,941	1,963	1,952	1,552	1,965	0,001
29	2,054	1,922	1,951	1,907	1,944	1,904	1,570	1,970	0,001
30	2,030	1,914	1,922	1,927	2,034	1,952	1,409	1,868	0,009
31	1,667	1,381	1,774	1,854	1,479	0,462	1,485	1,890	0,004
32	0,628	0,177	0,035	0,083	0,039	0,033	1,530	1,833	0,012
33	2,086	1,925	1,978	1,975	1,981	1,871	1,486	1,949	0,011
34	0,021	0,047	0,042	0,040	0,038	0,066	1,320	1,497	0,017
35	0,023	0,017	0,015	0,233	0,253	0,065	1,325	1,552	0,011
36	1,907	1,904	1,849	1,918	1,874	1,867	1,534	1,938	0,008
37	1,799	1,201	1,846	1,878	1,878	1,857	0,025	1,939	0,010
38	1,885	1,910	1,915	1,906	1,955	1,990	1,269	1,976	0,012
39	1,893	1,771	1,835	1,875	1,874	1,810	1,437	1,905	0,008
40	1,855	1,819	1,861	1,892	1,883	1,859	1,485	1,902	0,011
41	1,853	1,804	1,866	1,847	1,887	1,828	0,010	1,938	0,010
42	1,875	1,833	1,871	1,860	1,852	1,851	0,143	1,963	0,017
43	1,924	1,877	1,871	1,918	1,881	1,874	1,350	1,878	0,057
44	1,984	1,903	1,919	1,896	1,919	1,904	1,522	1,910	0,054
45	0,039	0,022	0,018	0,065	0,019	0,016	1,504	1,294	0,061
46	0,043	0,027	0,083	0,178	0,131	0,044	0,094	1,720	0,052
47	1,253	1,336	1,729	1,856	1,849	1,667	0,031	1,878	0,052
48	1,870	1,815	1,852	1,883	1,885	1,867	0,014	1,867	0,052

49	1,886	1,852	1,880	1,862	1,918	1,864	0,934	1,896	0,065
1	1,806	1,794	1,866	1,877	1,855	1,818	1,341	1,889	0,052

<Ejemplo 4> Evaluación de la función inhibidora de la actividad de citrulinación.

Se utilizaron las siguientes condiciones para evaluar la capacidad de cada uno de los A11 etc. para inhibir la actividad de citrulinación de PAD4.

(1) Materiales

- 5 • Proteína recombinante: PAD4 humana o de ratón recombinante de longitud completa
- Sustrato: BAEE (hidrocloruro de éster etílico de N α -benzoniil-L-arginina)
- Anticuerpos: una IgG de ratón (control negativo), un anticuerpo anti-DNP (control negativo), L207, A11, E9, G6, G8, G9 y H7

(2) Condiciones experimentales

- 10 Para cada uno de los anticuerpos anti-PAD4 (L207, A11, E9, G6, G8, G9 y H7) generados, la IgG de ratón (control negativo) y el anticuerpo anti-DNP (control negativo), se preparó una solución de anticuerpo 40-nM. Esta solución de anticuerpo se mezcló con 5 μ l de 3,75 ng/ μ l (50 nM) de PAD4 humana o de ratón en una solución tampón Tris-HCl 20 mM (pH 7,6) que contenía 1 mM de EDTA y 1 mM de DTT, de forma que el volumen total fuera de 44 μ l. La solución resultante se dejó reposar toda la noche. A continuación, se añadieron 5 μ l de 100 mM BAEE (éster etílico de benzoilo arginina) bajo agitación y 1 μ l de CaCl₂ 0,5 M y se agitó bien (el volumen total: 50 μ l; la concentración final de BAEE: 10 mM; la concentración final de ion calcio: 10 mM). Esta solución se dejó reposar (en un baño de agua caliente) a 37°C durante 3 h. Después, se añadieron 12,5 μ l de ácido perclórico 5 M para detener la reacción. Esta solución se dejó reposar 5 min en hielo y se centrifugó a 4°C durante 5 min (a 15.000 rpm). Por último, el BAEE citrulinado incluido en el sobrenadante se sometió a un ensayo cuantitativo colorimétrico.
- 15
- 20 Tabla 7 y FIG. 6 muestran los resultados de la evaluación de la función inhibidora de la actividad de citrulinación. Los valores de FIG. 6 indican la actividad de citrulinación de cada anticuerpo cuando el valor en el caso de utilizar PBS se fijó en 100. Cualquiera de los A11, etc., mostró una mayor función inhibidora de la actividad de citrulinación que el L207.

[Tabla 7]

	Actividad relativa de citrulinación
IgG de ratón	106
L207	92
A11	64
E9	59
G6	69
G8	63
G9	68
H7	35
PBS	100

- 25 La FIG. 7 muestra los resultados obtenidos al cambiar la concentración de anticuerpos en condiciones experimentales sustancialmente idénticas a las anteriores. Los valores de FIG. 7 indican cada uno la actividad de citrulinación de G8 o H7 cuando el valor en el caso de utilizar el anticuerpo anti-DNP se fijó en 100. G8 y H7 mostraron una función inhibidora de la actividad de citrulinación dependiente de la concentración.

<Ejemplo 5> Evaluación de la eficacia

30 (1) Evaluación de empeines y articulaciones

Se utilizaron ratones modelo de artritis inducida por anticuerpos de colágeno (CAIA) para evaluar la eficacia de G8. El ratón modelo CAIA es un modelo de ratón para la artritis reumatoide (AR) y la artritis. El procedimiento para generar

un ratón modelo CAIA se ajustó a un protocolo que utiliza un cóctel de anticuerpos (Chondrex Inc., 53040) para desencadenar la artritis en ratones. La FIG. 8 muestra un esquema de las condiciones experimentales. En el día 0, se inyectó una mezcla de anticuerpos anticolágeno (1,5 mg) en una vena de la cola de ratones Balb/c hembra de 8 semanas de edad (5 a 7 ratones/grupo). El día 3, se administraron por vía intraperitoneal 37,5 µg de LPS (sustancia inductora de la inflamación). En los días 0, 2, 4, 6 y 8, se administró por vía intraperitoneal G8, el anticuerpo anti-DNP, o PBS como sustancia de ensayo (a 1 mg/ratón). Entre los días 1 y 10, se midió el tamaño de la hinchazón de cada empeine (almohadilla del pie) o de cada articulación (tobillo). El valor numérico del tamaño de la inflamación se designó como la media de los valores de las extremidades izquierda y derecha. Entre los días 0 y 10, la artritis de la extremidad posterior se puntuó de acuerdo con la Tabla 8 (el valor máximo fue 8/ratón).

Tabla 8

Signo de artritis (observado macroscópicamente)	Puntuación de artritis
Había hinchazones de 1 a 2 dedos.	1
Había hinchazones de 3 a 5 dedos.	2
Se observó hinchazón moderada en todas las extremidades.	3
Se observó hinchazón severa en todas las extremidades.	4

Tablas 9 a 10 y FIG. 9 muestran los resultados de la evaluación del tamaño de la hinchazón. Tabla 11 y FIG. 10 muestran los resultados de la evaluación de la puntuación de artritis. Como se desprende de los resultados, el G8 ejerció un mayor efecto terapéutico sobre la AR. Obsérvese que los presentes inventores demostraron, en otro experimento, que el L207 no ejercía ningún efecto terapéutico significativo sobre la AR.

[Tabla 9]

El tamaño de la hinchazón de un empeine (PBS: n = 5; el anticuerpo anti-DNP y G8:n = 7)											
Media (mm)											
Día	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
PBS	2,37	2,36	2,39	2,48	2,45	2,72	3,09	3,23	3,25	3,36	3,37
Anticuerpo anti-DNP	2,39	2,44	2,43	2,45	2,28	2,55	2,99	3,12	3,10	3,15	3,15
G8	2,31	2,39	2,31	2,41	2,27	2,62	2,76	2,77	2,75	2,61	2,66
SEM											
Día	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
PBS	0,04	0,06	0,12	0,19	0,23	0,26	0,27	0,31	0,34	0,32	0,33
Anticuerpo anti-DNP	0,06	0,05	0,08	0,04	0,06	0,12	0,19	0,27	0,27	0,31	0,29
G8	0,04	0,03	0,04	0,06	0,05	0,16	0,17	0,21	0,18	0,14	0,22

[Tabla 10]

El tamaño de la inflamación de una articulación (PBS: n = 5; el anticuerpo anti-DNP y G8: n = 7)											
Media (mm)											
Día	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
PBS	3,23	3,24	3,32	3,37	3,35	3,57	3,72	3,87	4,01	4,03	4,08
Anticuerpo anti-DNP	3,27	3,35	3,31	3,25	3,20	3,34	3,63	3,75	3,90	3,95	3,95
G8	3,31	3,23	3,31	3,22	3,21	3,37	3,48	3,41	3,52	3,44	3,53

SEM											
Día	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
PBS	0,02	0,03	0,06	0,08	0,07	0,11	0,16	0,14	0,20	0,15	0,15
Anticuerpo anti-DNP	0,04	0,06	0,04	0,02	0,05	0,02	0,06	0,08	0,10	0,09	0,09
G8	0,03	0,02	0,03	0,04	0,04	0,05	0,05	0,05	0,07	0,08	0,08

[Tabla 11]

Puntuación de artritis (PBS: n = 5; el anticuerpo anti-DNP y G8: n = 7)											
Media											
Día	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
PBS	0,00	0,00	0,20	0,40	1,00	2,20	4,40	4,80	5,20	5,40	5,40
Anticuerpo anti-DNP	0,00	0,00	0,14	0,00	0,43	2,00	3,86	4,71	4,57	5,00	5,14
G8	0,00	0,00	0,00	0,14	0,14	1,43	2,71	2,14	1,57	1,71	1,71
SEM											
Día	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
PBS	0,00	0,00	0,20	0,24	0,55	0,49	0,75	0,73	0,97	0,87	0,87
Anticuerpo anti-DNP	0,00	0,00	0,14	0,00	0,20	0,58	0,51	0,42	0,43	0,49	0,46
G8	0,00	0,00	0,00	0,14	0,14	0,43	0,61	0,51	0,65	0,52	0,42

(2) Evaluación del título del anticuerpo anti-CCP

Bajo las mismas condiciones experimentales que en el caso anterior (1), se extrajo sangre en los días 0, 2, 5, 8 y 10, y se midió el título de anticuerpos anti-CCP en el suero. En ese momento, se utilizó G8 o el anticuerpo anti-DNP como sustancia de ensayo.

5

Tabla 12 y FIG. 11 muestran los resultados de la medición del título del anticuerpo anti-CCP. Como se desprende de los resultados, G8 suprimió el aumento del título de anticuerpos anti-CCP. Es decir, G8 inhibió la actividad de citrulinación de PAD4.

[Tabla 12]

Título de anticuerpos anti-CCP (anticuerpos anti-DNP y G8: n = 7)					
Media (unidad/mL)					
Día	0	2	5	8	10
Anticuerpo anti-DNP	3,27	4,39	7,62	9,11	8,53
G8	2,42	3,27	3,43	6,81	5,23
SEM					
Día	0	2	5	8	10
Anticuerpo anti-DNP	0,45	0,46	1,35	1,12	0,93
G8	0,15	0,38	0,49	0,66	0,53

10 **(3) Análisis histológico**

Bajo las mismas condiciones experimentales que en el caso anterior (1), una extremidad posterior extraída en el día 10 se fijó en formaldehído al 4%, se deshidrató y luego se incrustó en parafina. Se realizó una tinción con hematoxilina/eosina para examinar la inflamación de una articulación. En ese momento, se utilizó G8, el anticuerpo anti-DNP, o PBS como sustancia de ensayo.

5 La FIG. 12 muestra los resultados del análisis histológico. Los paneles izquierdos de la FIG. 12 son fotografías en o cerca de una articulación del dedo. En cuanto al grupo de administración de PBS o anticuerpos anti-DNP, células inflamatorias tales como neutrófilos y/o macrófagos invadieron la articulación y sus alrededores, de forma que la membrana sinovial resultó dañada. Por el contrario, en el caso de G8, las células inflamatorias no invadieron. Los paneles de la derecha son vistas ampliadas de las regiones recuadradas de las fotografías anteriores y muestran la superficie de una capa de cartílago. Como indican las cabezas de flecha, la superficie estaba dañada y mellada en el grupo de administración de PBS o de anticuerpos anti-DNP. Por el contrario, en el caso del grupo de administración de G8, se mantuvo una capa de cartílago lisa. En vista de lo anterior, se demostró que el G8 ejerce un efecto terapéutico en la AR.

<Ejemplo 6> Evaluación de la eficacia

15 Se utilizaron ratones modelo de artritis inducida por anticuerpos de colágeno (CAIA) para evaluar la eficacia de G8 o H7. El ratón modelo CAIA es un modelo de ratón para la artritis reumatoide (AR) y la artritis. El procedimiento para generar un ratón modelo CAIA se ajustó a un protocolo que utiliza un cóctel de anticuerpos (Chondrex Inc., 53040) para desencadenar la artritis en ratones. La FIG. 13 muestra un esquema de las condiciones experimentales. En el día 0, se inyectó una mezcla de anticuerpos anticolágeno (1,5 mg) en una vena de la cola de ratones Balb/c hembra de 8 semanas de edad (5 a 7 ratones/grupo). El día 3, se administraron por vía intraperitoneal 37,5 µg de LPS (sustancia inductora de la inflamación). En los días 0, 2, 4, 6 y 8, se administró por vía intraperitoneal G8, H7 o el anticuerpo anti-DNP como sustancia de ensayo (a 1mg/ratón). Entre los días 1 y 10, se midió el tamaño de la hinchazón de cada empeine (almohadilla del pie) o de cada articulación (tobillo). El valor numérico del tamaño de la inflamación se designó como la media de los valores de las extremidades izquierda y derecha. En los días 0 a 10, la puntuación de la artritis se determinó de acuerdo con los siguientes puntos (i) a (iii). (i) Los lugares de evaluación incluían cada uno de los dedos, empeines y articulaciones de las extremidades posteriores izquierda y derecha. (ii) La artritis se puntuó de acuerdo con la Tabla 13. (iii) La puntuación de artritis (el valor máximo fue 28/ratón) se obtuvo promediando la puntuación total de los dedos, empeines y articulaciones de las extremidades posteriores izquierda y derecha.

[Tabla 13]

Signo de artritis (observado macroscópicamente)	Puntuación de artritis
Hinchazón moderada	1
Hinchazón severa	2

30 Tablas 14 a 15 y FIG. 14 muestran los resultados de la evaluación del tamaño de la hinchazón. Tabla 16 y FIG. 15 muestran los resultados de la evaluación de la puntuación de artritis. Como se desprende de los resultados, G8 y H7 ejercieron un mayor efecto terapéutico sobre la AR.

[Tabla 14]

El tamaño de la hinchazón de un empeine (el anticuerpo anti-DNP: n = 5; G8: n = 7; H7: n = 5)											
Media (mm)											
Día	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Anticuerpo anti-DNP	2,90	2,93	3,13	3,15	3,18	3,07	3,45	3,41	3,42	3,34	3,44
G8	2,90	2,95	3,04	3,08	3,13	3,11	3,13	3,05	3,02	2,93	3,05
H7	2,85	2,98	3,00	3,04	3,07	2,91	2,94	2,88	2,94	2,95	3,08
SEM											
Día	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Anticuerpo anti-DNP	0,02	0,02	0,07	0,11	0,10	0,09	0,11	0,07	0,15	0,08	0,13
G8	0,02	0,02	0,06	0,05	0,04	0,06	0,13	0,10	0,12	0,10	0,11

H7	0,02	0,03	0,02	0,03	0,01	0,06	0,13	0,06	0,09	0,08	0,08
----	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------

[Tabla 15]

El tamaño de la inflamación de una articulación (el anticuerpo anti-DNP: n = 5; G8: n = 7; H7: n = 5)											
Media (mm)											
Día	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Anticuerpo anti-DNP	3,5 7	3,6 3	3,65	3,69	3,79	3,83	4,31	4,55	4,8 5	4,9 2	4,88
G8	3,5 4	3,6 3	3,61	3,59	3,66	3,62	3,80	3,76	3,8 0	3,7 4	3,82
H7	3,5 7	3,6 7	3,64	3,76	3,83	3,59	3,80	3,87	3,8 9	3,9 7	4,02
SEM											
Día	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Anticuerpo anti-DNP	0,0 1	0,0 3	0,02	0,04	0,03	0,09	0,18	0,19	0,2 4	0,2 4	0,24
G8	0,0 2	0,0 2	0,04	0,04	0,04	0,05	0,10	0,11	0,11	0,1 6	0,15
H7	0,0 2	0,0 1	0,01	0,05	0,05	0,04	0,17	0,19	0,2 2	0,2 7	0,27

[Tabla 16]

Puntuación de artritis (el anticuerpo anti-DNP: n = 5; G8: n = 7; H7: n = 5)											
Media											
Día	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Anticuerpo anti-DNP	0	3,0	5,4	5,8	4,6	7,0	12,8	17,2	14,6	16,2	16, 2
G8	0	3,6	6,0	5,1	4,6	7,1	8,9	10,4	10,1	9,6	11,9
H7	0	3,8	5,4	5,8	2,6	5,4	6,6	8,0	7,4	8,0	8,8
SEM											
Día	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Anticuerpo anti-DNP	0	0,6	0,4	0,5	0,9	0,5	1,4	1,9	1,5	1,8	2,1
G8	0	0,8	0,4	0,6	0,2	0,4	1,4	2,4	2,6	2,4	2,6
H7	0	1,0	0,7	1,1	0,6	0,9	1,6	1,9	2,0	2,1	2,3

<Ejemplo 7> Evaluación de anticuerpos humanizados anti-PAD4

(1) Generación de anticuerpos humanizados anti-PAD4 (IgG1κ)

- 5 Los anticuerpos se humanizaron con referencia a Nishibori et al., Mol Immunol. 2006 Feb;43(6):634-42. Cuando se utilizaron G8 y H7 para generar anticuerpos humanizados anti-PAD4, se utilizó para cada cadena H la plantilla de 4,00, 4,15 o 4,32 descrita en las bibliografías anteriores. En cuanto a la cadena L de G8, se utilizó una plantilla de 4,00, 4,06, 4,17 o 4,29. En cuanto a la cadena L del H7, se utilizó una plantilla de 4,00, 4,06, 4,15, 4,17 o 4,29. Las regiones variables de los anticuerpos humanizados se diseñaron de forma que con respecto a las secuencias de las CDR 1, 2

y 3 de las cadenas H y L de cada anticuerpo, las CDR respectivas se insertan en sitios correspondientes a cada plantilla. Las regiones variables diseñadas se sintetizaron mediante el uso de un servicio de Invitrogen, Inc. Las secuencias de nucleótidos que codifican las regiones variables del G8 o H7 así diseñadas se exponen en los respectivos SEQ ID Nros.: del 135 al 146. Las secuencias de la región variable sintetizadas se amplificaron por PCR mediante el uso de: los cebadores (1) y (2) para amplificar cada región variable de la cadena H; y los cebadores (3) y (4) para amplificar cada región variable de la cadena L.

Cebador directo de la cadena H (1)
5'-ATATAGGCGCGCCGAGGTGCAGCTGTTGGAG-3' (SEQ ID NO: 147)

Cebador inverso (2)
5'-TATATGGATCCTCACCTGAGGAGACGGTGA-3' (SEQ ID NO: 148)

Cebador directo de la cadena L (3)
5'-ATATAGGCGCGCCAGCTATGAGCTGACTCAGCCA-3' (SEQ ID NO: 149)

Cebador inverso (4)
5'- TATATGGATCCACTACCCAGGACGGTCAG-3' (SEQ ID NO: 150)

Cada producto de amplificación PCR y los vectores de expresión en los que se clonó una región constante IgG1 humana fueron digeridos por Ascl y BamHI (R0558S, R0136S) y se utilizaron para subclonación. Los vectores de expresión que tienen una secuencia de región constante de cadena H o de cadena L se divulgaron en JP-A-2005-245337. Las construcciones finales se secuenciaron para confirmar que cada una tenía una secuencia de interés. En estas construcciones, la secuencia de la cadena H se convirtió en la forma IgG1 y la secuencia de la cadena L se convirtió en la forma κ. Asimismo, se construyeron las construcciones correspondientes para A11 y G9. La secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la A11 o G9 así diseñada se expone en SEQ ID NO: 151 (A11-H4.00) o 152 (G9-L4.29), respectivamente. Finalmente, todos los anticuerpos de tipo IgG1κ tenían una cadena H con estructura H4.00 y una cadena L con estructura L4.29. Obsérvese que A11 y G9 comparten la secuencia de la cadena L y G8, G9 y H7 comparten la secuencia de la cadena H.

La figura 16 muestra las secuencias de aminoácidos de las regiones constantes de la cadena H (IgG1) y la cadena L (κ) de un anticuerpo humanizado. La FIG. 17 muestra las secuencias de las regiones variables de un anticuerpo humanizado G8. La FIG. 18 muestra las secuencias de las regiones variables de un anticuerpo humanizado H7 (la secuencia de la cadena H es la misma que la de G8). Las FIGS. 19 y 20 muestran las secuencias de aminoácidos de longitud completa de anticuerpos humanizados derivados de G8, H7, A11 y G9. Las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada de cada uno de los anticuerpos humanizados derivados de G8, H7, A11 y G9 son las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID Nros.: 172, 176, 170 y 174, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera son las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID Nros.: 173, 177, 171 y 175, respectivamente.

Los respectivos vectores de expresión de anticuerpos humanizados anti-PAD4 obtenidos por medio de los experimentos anteriores se utilizaron para preparar anticuerpos purificados. En cuanto a la técnica, los vectores de expresión de las cadenas H y L se transfectaron en células de cultivo de mamíferos mediante el uso de un sistema de Expresión Expi293 (Thermo Fisher Scientific, A14635). A continuación, cada anticuerpo expresado se purificó mediante el uso de rProtein A Sepharose Fast Flow (GE healthcare, 17-127-902). El anticuerpo purificado resultante se utilizó para ELISA mediante el uso de PAD4 humano como antígeno para examinar su reactividad.

(2) Reactividad de cada anticuerpo humanizado anti-PAD4 frente a PAD4 humano

Los anticuerpos humanizados anti-PAD4 derivados de G8 y H7 se utilizaron cada uno para ELISA para examinar su reactividad. En aquella época, se utilizaban tres tipos de cadena H y cuatro tipos de cadena L (Tabla 17). La clase de cada anticuerpo era IgG1κ. El cuadro 18 muestra las condiciones experimentales. Los resultados experimentales se muestran en las FIGS. del 21 al 23. Cualquiera de los anticuerpos humanizados anti-PAD4 mostró una alta afinidad hacia el PAD4 humano.

[Tabla 17]

G8	
VH	VL
H4.00	L4.00
H4.00	L4.06
H4.00	L4.17
H4.00	L4.29
H4.15	L4.00

H4.15	L4.06
H4.15	L4.17
H4.15	L4.29
H4.32	L4.00
H4.32	L4.06
H4.32	L4.17
H4.32	L4.29
H7	
VH	VL
H4.00	L4.00
H4.00	L4.06
H4.00	L4.15
H4.00	L4.17
H4.15	L4.00
H4.15	L4.06
H4.15	L4.15
H4.15	L4.17
H4.32	L4.00
H4.32	L4.06
H4.32	L4.15
H4.32	L4.17

[Tabla 18]

1	Inmovilización de antígenos en fase sólida:	50 µl/pocillo	O/N a 4°C	5 µg/mL PAD4 humano
2	Bloqueo:	250 µl/pocillo	60 min a 37°C	25% Bloque Ace/PBS
3	Ab. primario	50 µl/pocillo	60 min a 37°C	Cada anticuerpo a 1µg/mL se diluyó 2 veces/ 10% Bloque Ace
4	Secundaria Ab:	50 µl/pocillo	60 min a 37°C	IgG antihumana marcada con HRP (H+L) en 10% Block Ace/PBS (1:1000)
5	Sustrato cromogénico:	50 µl/pocillo	30 min a RT	Solución OPD
6	Solución Stop:	50 µl/pocillo		2 NH ₂ SO ₄
7		Longitud de onda 490 nm/630 nm		

(3) Reactividad del anticuerpo humanizado anti-PAD4 frente a PAD4 humano

Los anticuerpos humanizados anti-PAD4 derivados de G8, H7, A11 y G9 se utilizaron cada uno para ELISA para examinar su reactividad. En aquel momento, la combinación de los marcos de la región variable era tal que el marco

de la cadena H era H4.00 y el marco de la cadena L era L4.293. La clase de cada anticuerpo era IgG1κ. La tabla 19 muestra las condiciones experimentales. Los resultados experimentales se muestran en la FIG. 24. Cualquiera de los anticuerpos humanizados anti-PAD4 mostró una alta afinidad hacia el PAD4 humano.

[Tabla 19]

1	Inmovilización de antígenos en fase sólida:	50 µl/pocillo	O/N a 4°C	5 µg/mL PAD4 humano
2	Bloqueo:	250 µl/pocillo	60 min a 37°C	25% Bloque Ace/PBS
3	Ab. primario	50 µl/pocillo	60 min a 37°C	Cada anticuerpo a 1µg/mL se diluyó 5 veces/ 10% Bloque Ace
4	Secundaria Ab:	50 µl/pocillo	60 min a 37°C	IgG antihumana marcada con HRP (H+L) en 10% Block Ace/PBS (1:1000)
5	Sustrato cromogénico:	50 µl/pocillo	30 min a RT	Solución OPD
6	Solución Stop:	50 µl/pocillo		2 N H ₂ SO ₄
7		Longitud de onda 490 nm/630 nm		

5 (4) Generación del anticuerpo humanizado anti-PAD4 (IgG4λ) y evaluación de su reactividad

Se utilizó el mismo procedimiento que el anterior "(1) Generación de anticuerpos anti-PAD4 humanizados (IgG1κ)" para generar un anticuerpo anti-PAD4 humanizado (IgG4λ) derivado de H7. A este respecto, sin embargo, las cadenas de ADN mostradas en la FIG. 25 se sintetizaron para la construcción de vectores. La FIG. 26 muestra las secuencias de aminoácidos de la región variable y la región constante de la cadena H y la región variable y la región constante de la cadena ligera.

A continuación, el anticuerpo humanizado anti-PAD4 derivado de H7 (IgG4λ) se utilizó para ELISA para examinar su reactividad. En ese momento, la combinación de los marcos de la región variable era tal que el marco de la cadena H era H4.00 y el marco de la cadena L era L4.29. La clase del anticuerpo era IgG4λ. El cuadro 20 muestra las condiciones experimentales. Los resultados experimentales se muestran en la FIG. 27. El anticuerpo humanizado anti-PAD4 derivado del H7 (IgG4λ) mostró una gran afinidad por el PAD4 humano.

[Tabla 20]

1	Antígeno en fase sólida	50 µl/pocillo	O/N a 4°C	5 µg/mL PAD4 humano
	inmovilización:			
2	Bloqueo:	250 µl/pocillo	60 min a 37°C	25% Bloque Ace/PBS
3	Ab. primario	50 µl/pocillo	60 min a 37°C	Cada anticuerpo a 1µg/mL se diluyó 5 veces/ 10% Bloque Ace
4	Secundaria Ab:	50 µl/pocillo	60 min a 37°C	IgG antihumana marcada con HRP (H+L) en 10% Block Ace/PBS (1:1000)
5	Sustrato cromogénico:	50 µl/pocillo	30 min a RT	Solución TMB
6	Solución Stop:	50 µl/pocillo		Solución de parada TMB
7		Longitud de onda 450 nm/650 nm		

(5) Ensayo de afinidad

Los anticuerpos humanizados anti-PAD4 derivados de G8 y H7 se sometieron al ensayo Biacore (GE Healthcare, Biacore T200) para evaluar su afinidad. En aquel momento, la combinación de las estructuras era tal que la estructura de la cadena H era H4.00 y la estructura de la cadena L era L4.29. La clase de cada anticuerpo utilizado fue IgG1κ.

Se utilizó como antígeno PAD4 humano recombinante de longitud completa. Para el ensayo de afinidad se utilizó un kit de captura de anticuerpos humanos (GE Healthcare, BR-1008-39). Concretamente, de acuerdo con el protocolo estándar proporcionado por la fabricación, se utilizó NHS/EDC y un procedimiento de acoplamiento con aminas, en el que se fija un grupo carboxilo libre en una superficie de un chip CM5, para inmovilizar un anticuerpo policlonal antihumano de conejo en la superficie de un chip CM5. A continuación, cada uno de los anticuerpos humanizados anti-PAD4 fue capturado por el anticuerpo policlonal de conejo anti-humano. La PAD4 humana a cada concentración se sometió a la medición Biacore T200 para crear un sensorgrama cinético.

La Tabla 21 muestra los resultados del ensayo de afinidad. Como se desprende de los resultados, cualquiera de los anticuerpos humanizados anti-PAD4 derivados de G8 y H7 mostró una alta afinidad. Cuando se midió la KD (M) de los mismos, en particular, cualquiera de ellos tenía una alta afinidad de $9,0 \times 10^{-9}$ o menos.

[Tabla 2 1]

	kd (1/s)	ka (1/Ms)	KD (M)
Ab humanizado #G8-H4.00/L4.29	2.00E-04	1.03E+05	1.95E-09
Ab humanizado #H7-H4.00/L4.29	5.07E-04	6.13E+05	8.28E-09

(6) Evaluación de la función inhibidora de la actividad de citrulinación.

Se utilizaron las siguientes condiciones para evaluar la capacidad de cada uno de los anticuerpos humanizados anti-PAD4 derivados de A11 etc. para inhibir la actividad de citrulinación de PAD4.

(6-1) Materiales

- Proteína recombinante: PAD4 humana recombinante de longitud completa
- Sustrato: BAEE (hidrocloruro de éster etílico de N α -benzoniil-L-arginina)
- Anticuerpos: un anticuerpo humanizado anti-DNP (control negativo), clones de anticuerpos humanizados anti-PAD4 derivados de A11, G8, G9 y H7 (la combinación de todos los marcos de cada anticuerpo era H4.00-L4.29; la clase de cada anticuerpo era IgG1 κ)

(6-2) Condiciones experimentales

Se preparó una solución de anticuerpo que contenía 120, 60, 30, 15 o 7,5 nM de cada uno de los anticuerpos humanizados anti-PAD4 generados (derivados de A11, G8, G9 y H7) y el anticuerpo anti-DNP (control negativo). Esta solución de anticuerpo se mezcló con 5 μ l de 3,75 ng/ μ l (50 nM) de PAD4 humano en una solución tampón Tris-HCl 20 mM (pH 7,6) que contenía 1 mM de EDTA y 1 mM de DTT, de forma que el volumen total fuera de 44 μ l. La solución resultante se dejó reposar a 37°C durante 30 min. A continuación, se añadieron 5 μ l de 100 mM BAEE (éster etílico de benzoilo arginina) bajo agitación y 1 μ l de CaCl₂ 0,5 M y se agitó bien (el volumen total: 50 μ l; la concentración final de BAEE: 10 mM; la concentración final de ion calcio: 10 mM). Esta solución se dejó reposar (en un baño de agua caliente) a 37°C durante 3 h. Después, se añadieron 12,5 μ l de ácido perclórico 5 M para detener la reacción. Esta solución se dejó reposar 5 min en hielo y se centrifugó a 4°C durante 5 min (a 15.000 rpm). Por último, el BAEE citrulinado incluido en el sobrenadante se sometió a un ensayo cuantitativo colorimétrico.

(6-3) Condiciones experimentales

La FIG. 28 muestra la actividad relativa cuando la cantidad (4,9 nmol/16 μ l de una solución de reacción) de producción de citrulina mediante el uso de 0 nM del anticuerpo anti-DNP se fijó en el 100%. Cada anticuerpo humanizado anti-PAD4 mostró una función inhibidora de la actividad de citrulinación dependiente de la concentración.

<Ejemplo 8> Estudio sobre la administración combinada de anticuerpo humanizado anti-PAD4 e inhibidor de TNF α

(1) Materiales

El anticuerpo humanizado anti-PAD4 (IgG1 κ) clon derivado de H7 y un inhibidor de TNF α Etanercept se utilizaron para llevar a cabo un experimento para probar un efecto inhibidor de la artritis en ratones D1CC (un mamífero no humano transgénico en el que se puede reproducir la patología de la artritis reumatoide humana; WO2005/085438).

(2) Condiciones

Como primera inmunización, se administró a cada ratón adyuvante completo de Freund que contenía colágeno bovino de tipo II (10 ng). Como segunda inmunización, se administró adyuvante incompleto de Freund que contenía el mismo colágeno bovino de tipo II (10 ng). Tras la segunda inmunización, se administró cada una de las sustancias de ensayo

mencionadas por vía intraperitoneal dos veces por semana durante 8 semanas. Tras la administración, se observó macroscópicamente la hinchazón de una porción articular y se puntuó.

(3) Grupos de prueba

- α DNP Ab: 500 pg/ratón (25 mg/kg)
- 5 • α PAD4 Ab. 100 μ g: 100 μ g (5 mg/kg)
- α PAD4 Ab. 500 páginas: 500 μ g (25 mg/kg)
- ETN. 100 págs: 100 μ g (5 mg/kg)
- ETN. 500 μ g: 500 μ g (25 mg/kg)
- Combinación: α PAD4 Ab. 100 μ g + ETN. 100 μ g

10 **(4) Resultados**

Se observó que la administración combinada del anticuerpo humanizado anti-PAD4 y el inhibidor del TNF α proporciona un beneficio terapéutico significativamente mayor que la dosificación de un solo fármaco ($p < 0,05$). Además, también se observó que esta administración combinada ejercía un efecto terapéutico sinérgico en comparación con la dosificación de un solo fármaco. Esto demostró que el uso combinado del anticuerpo humanizado anti-PAD4 y el inhibidor del TNF α permitía una configuración de dosis baja y posibilitaba un tratamiento con una seguridad y eficacia excelentes. Además, no se observaron efectos secundarios claros debidos a la administración del anticuerpo.

<Discusión>

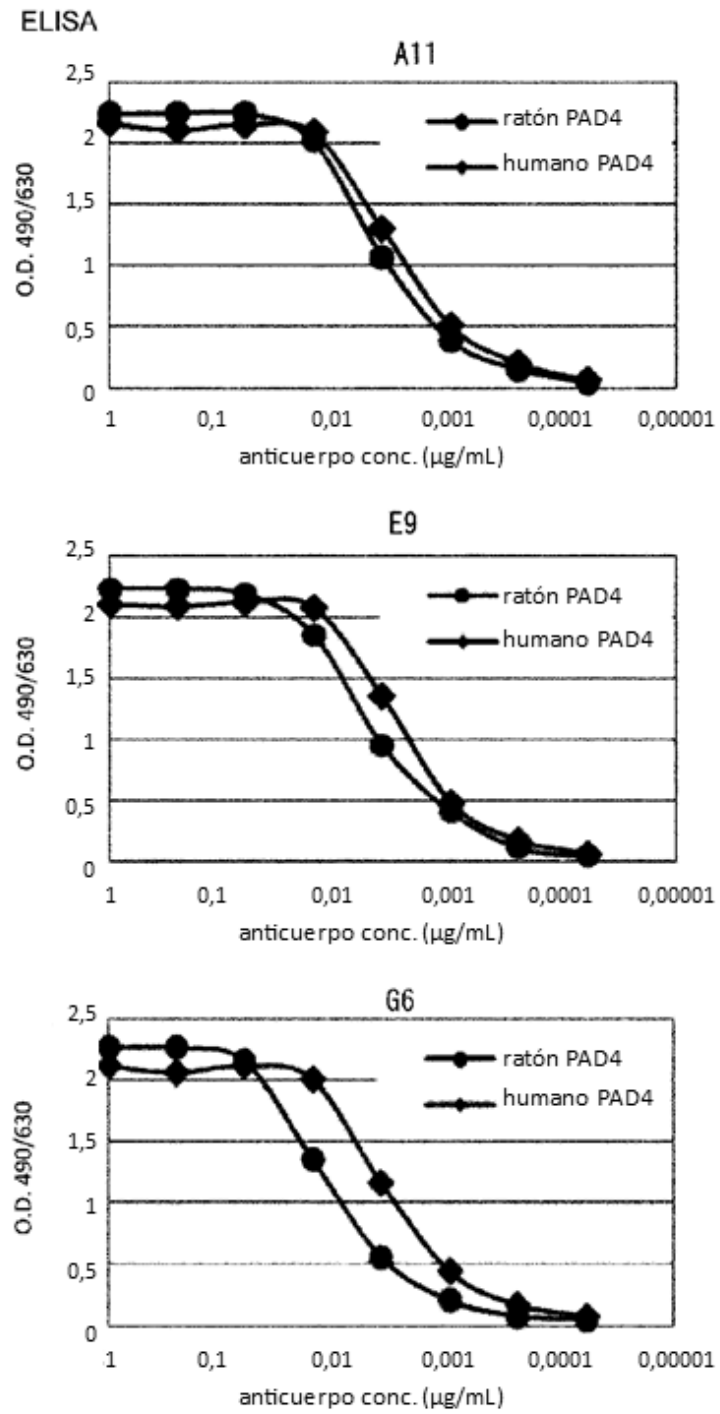
Los Ejemplos anteriores han revelado que los anticuerpos anti-PAD4 que se unen específicamente a un epítipo que contiene las posiciones 345, 347 y 348 de PAD4 ejercen potentes efectos terapéuticos sobre la AR. Además, estos anticuerpos tienen mayor afinidad hacia PAD4 y mayor función inhibidora de la actividad de citrulinación que el conocido anticuerpo convencional L207.

Se reveló además que la administración combinada del anticuerpo anti-PAD4 y el inhibidor del TNF α ejercía un efecto terapéutico sinérgico sobre la AR.

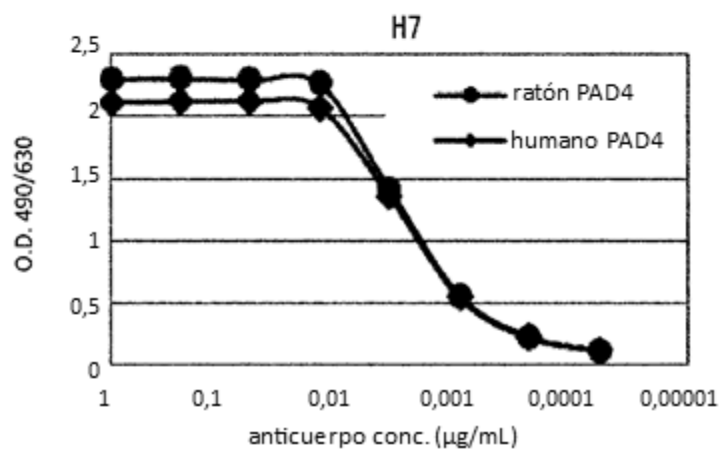
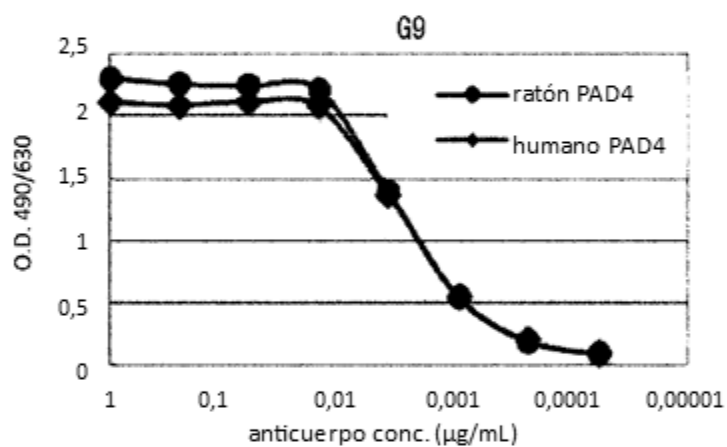
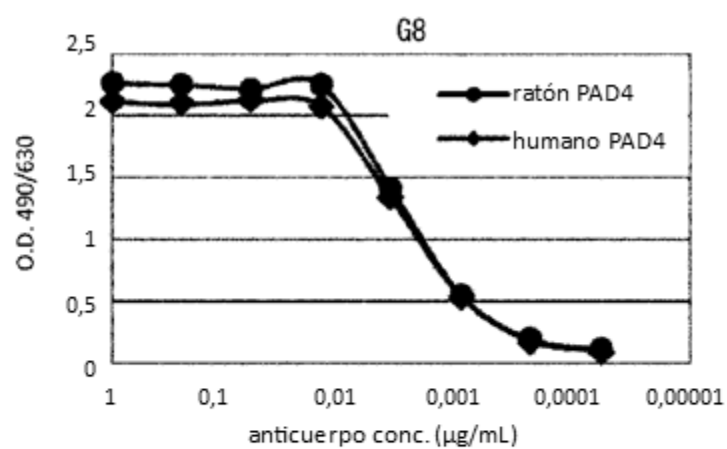
REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal anti-PAD4 (peptidylarginina deiminasa 4), en el que el anticuerpo se une específicamente a un péptido cuya secuencia de aminoácidos se establece en SEQ ID NO: 1, y no se une a un péptido cuya secuencia de aminoácidos se establece en SEQ ID NO: 32, 34, o 35; y en el que el anticuerpo inhibe la actividad de citrulinación de PAD4.
2. El anticuerpo monoclonal anti-PAD4 de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.
3. El anticuerpo monoclonal anti-PAD4 de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo es:
 - un anticuerpo monoclonal en el que las CDRs 1 a 3 de la cadena pesada y las CDRs 1 a 3 de la cadena ligera comprenden secuencias de aminoácidos establecidas en los respectivos SEQ ID Nros.: de 50 a 55 años;
 - un anticuerpo monoclonal en el que las CDRs 1 a 3 de la cadena pesada y las CDRs 1 a 3 de la cadena ligera comprenden secuencias de aminoácidos establecidas en los respectivos SEQ ID Nros.: 56 a 61;
 - un anticuerpo monoclonal en el que las CDRs 1 a 3 de la cadena pesada y las CDRs 1 a 3 de la cadena ligera comprenden secuencias de aminoácidos establecidas en los respectivos SEQ ID Nros.: 62 a 67;
 - un anticuerpo monoclonal en el que las CDRs 1 a 3 de la cadena pesada y las CDRs 1 a 3 de la cadena ligera comprenden secuencias de aminoácidos establecidas en los respectivos SEQ ID Nros.: 68 a 73;
 - un anticuerpo monoclonal en el que las CDRs 1 a 3 de la cadena pesada y las CDRs 1 a 3 de la cadena ligera comprenden secuencias de aminoácidos establecidas en los respectivos SEQ ID Nros.: 74 a 79; o
 - un anticuerpo monoclonal en el que las CDRs 1 a 3 de la cadena pesada y las CDRs 1 a 3 de la cadena ligera comprenden secuencias de aminoácidos establecidas en los respectivos SEQ ID Nros.: del 80 al 85.
4. El anticuerpo monoclonal anti-PAD4 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el anticuerpo es un fragmento de unión a antígeno.
5. Un polinucleótido o vector que codifica el anticuerpo monoclonal anti-PAD4 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
6. El anticuerpo monoclonal anti-PAD4 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en el tratamiento de la AR o la artritis.

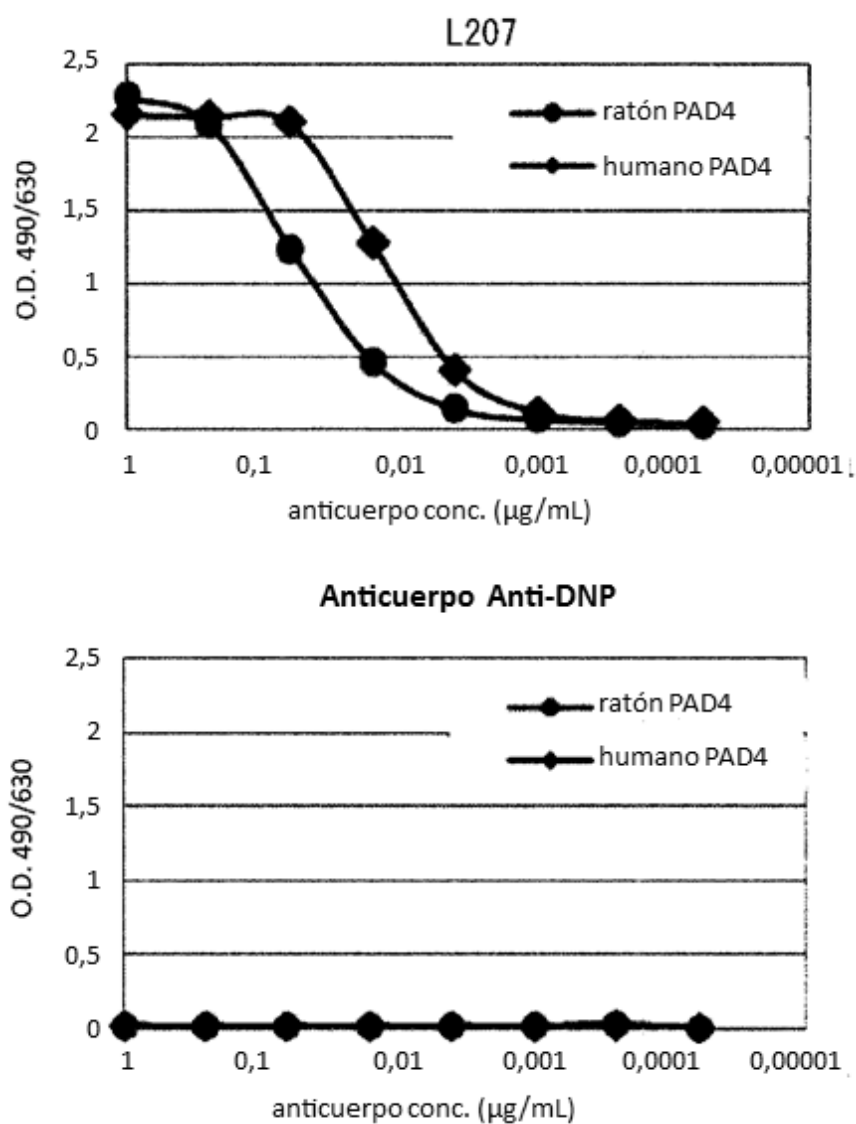
[Fig.1]



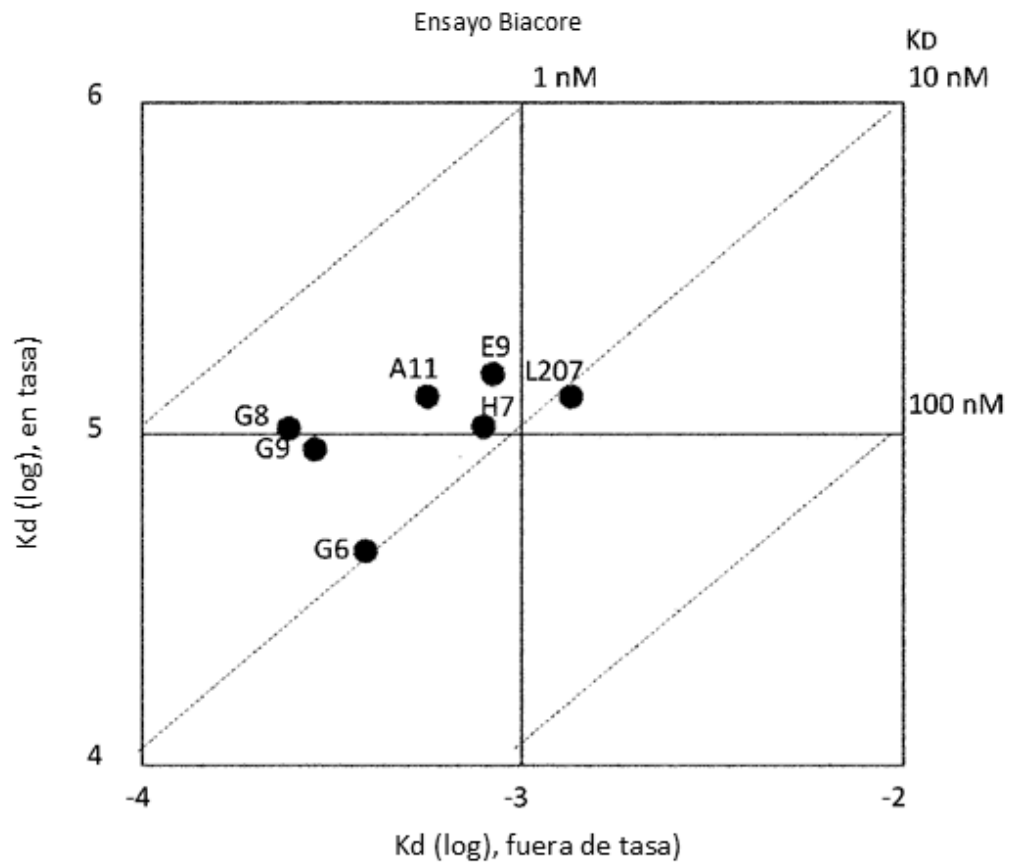
[Fig.2]



[Fig.3]



【Fig.4】



[Fig. 5]

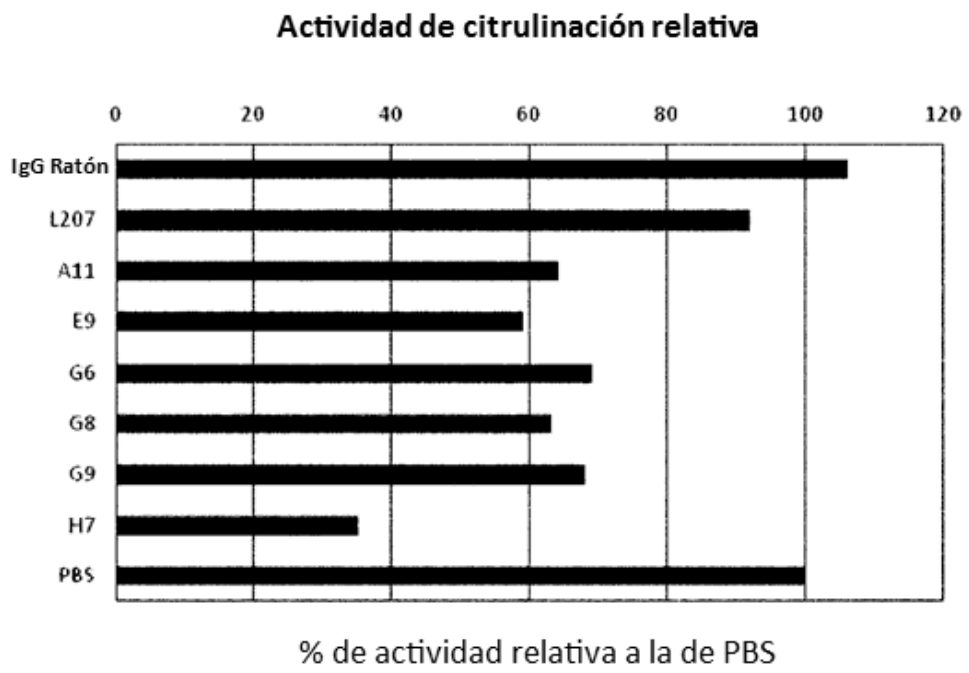
Aminoácido No.	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356
Aminoácido	E	E	N	M	D	D	Q	W	M	Q	D	E	M	E	I	G	Y
A11	1.954	2.001	2.054	2.03	1.667	0.628	2.086	0.021	0.023	1.907	1.799	1.885	1.893	1.855	1.853	1.875	1.924
	1.984				0.039		0.043			1.253		1.87				1.886	
E9	1.892	1.995	1.922	1.914	1.381	-0.177	1.925	0.047	0.017	1.904	1.201	1.91	1.771	1.819	1.804	1.833	1.877
	1.903				0.022		0.027			1.336		1.815				1.852	
G6	1.913	1.987	1.951	1.922	1.774	-0.035	1.978	0.042	0.015	1.849	1.846	1.915	1.835	1.861	1.866	1.871	1.871
	1.919				0.018		0.083			1.729		1.852				1.88	
G8	1.955	1.941	1.907	1.927	1.854	-0.083	1.975	0.04	0.233	1.918	1.878	1.906	1.875	1.992	1.847	1.96	1.918
	1.896				0.065		0.178			1.856		1.883				1.862	
G9	1.926	1.963	1.944	2.034	1.479	-0.039	1.981	0.038	0.253	1.874	1.878	1.955	1.874	1.883	1.887	1.852	1.891
	1.919				0.019		0.131			1.849		1.885				1.918	
H7	1.9	1.952	1.904	1.952	0.482	-0.033	1.871	0.066	0.065	1.867	1.857	1.99	1.81	1.859	1.828	1.851	1.874
	1.904				0.016		0.044			1.667		1.867				1.864	
L207	1.418	1.552	1.57	1.409	1.485	1.53	1.486	1.32	1.325	1.534	0.025	1.269	1.437	1.485	0.01	0.143	1.35
	1.522				1.504		0.094			0.031		0.014				0.934	

*Las regiones sombreadas son residuos de aminoácidos en los que se observó una reactividad poco significativa después de la exploración de Alanina.

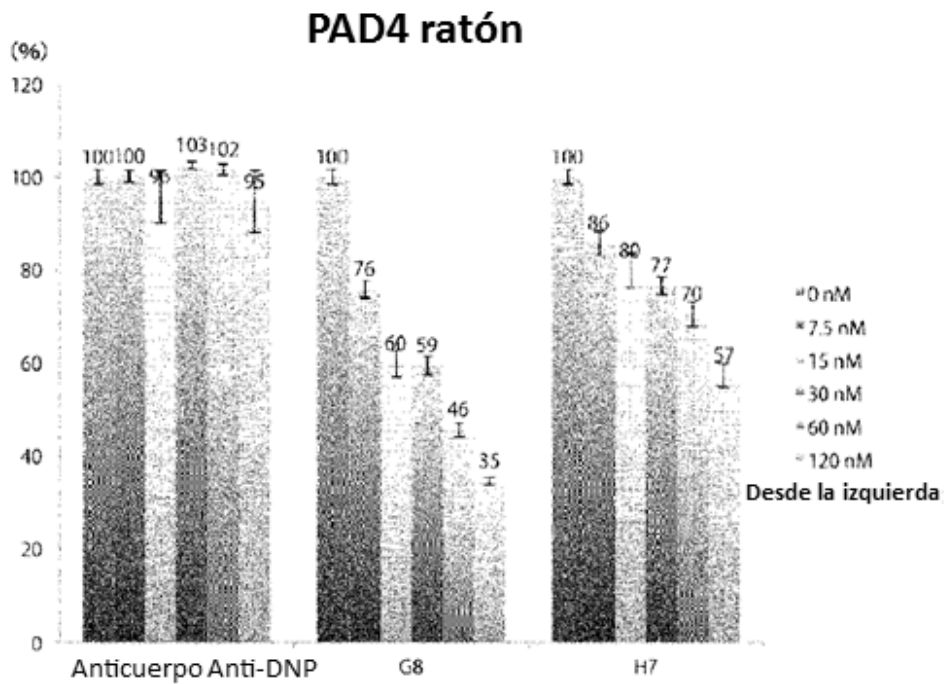
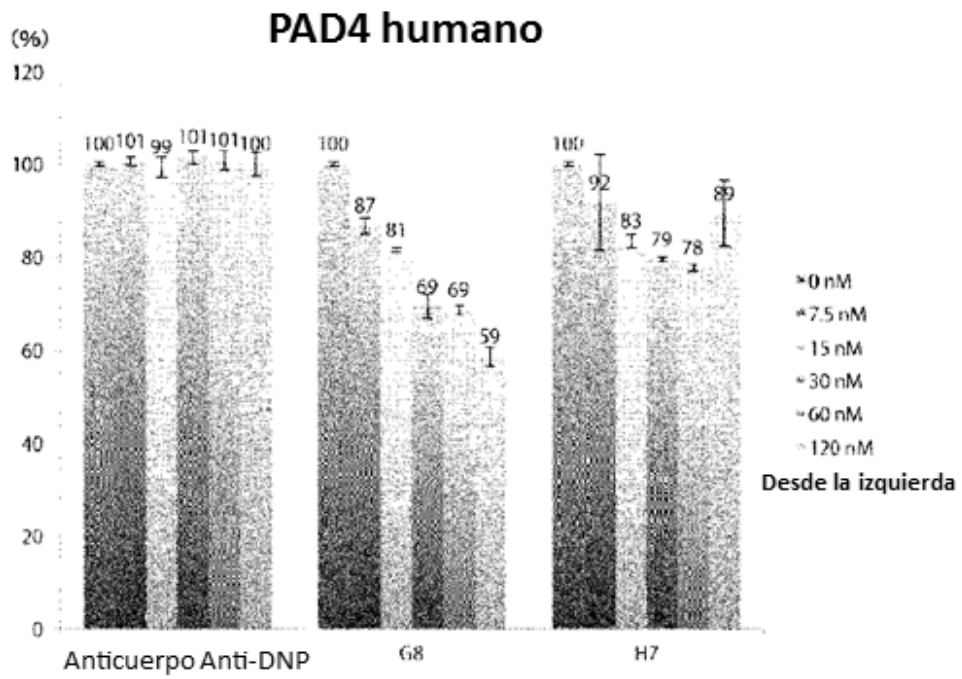
*Las filas superiores representan el caso de un aminoácido de sustitución simple y las filas inferiores representa el caso de 3 aminoácidos de sustitución.

*El umbral de corte es 50% de la afinidad del anticuerpo policlonal anti-PAD4.

【Fig.6】



[Fig.7]



【Fig.8】

Experimento *in vivo* mediante el uso de modelo de ratón CAIA

-Muestras-

- Anticuerpo Anti-PAD4 (G8), n = 7
- Anticuerpo Anti-DNP, n = 7
- vehículo (PBS), n = 5

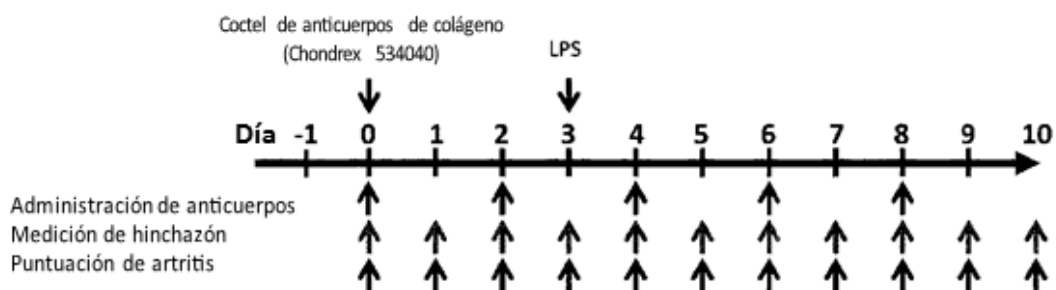
-Modelo de inflamación-

- Modelo de artritis de ratón inducida por anticuerpos de colágeno
- Dosaje/Procedimiento: 1mg/cuerpo (50mg/kg) x 5/administración intraperitoneal

-Puntos finales-

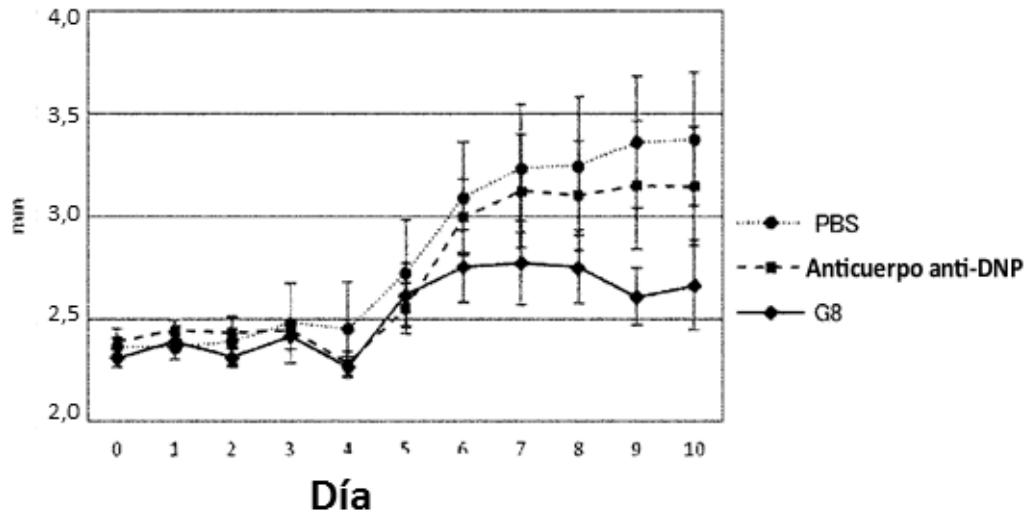
- Puntuación de artritis
- Medición de hinchazón (empeines y articulaciones)

-Cronograma-

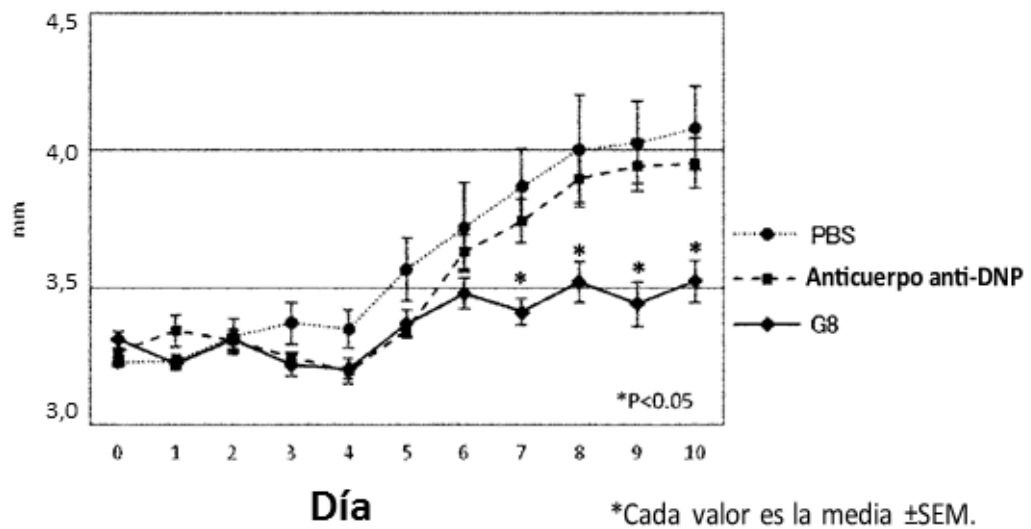


[Fig.9]

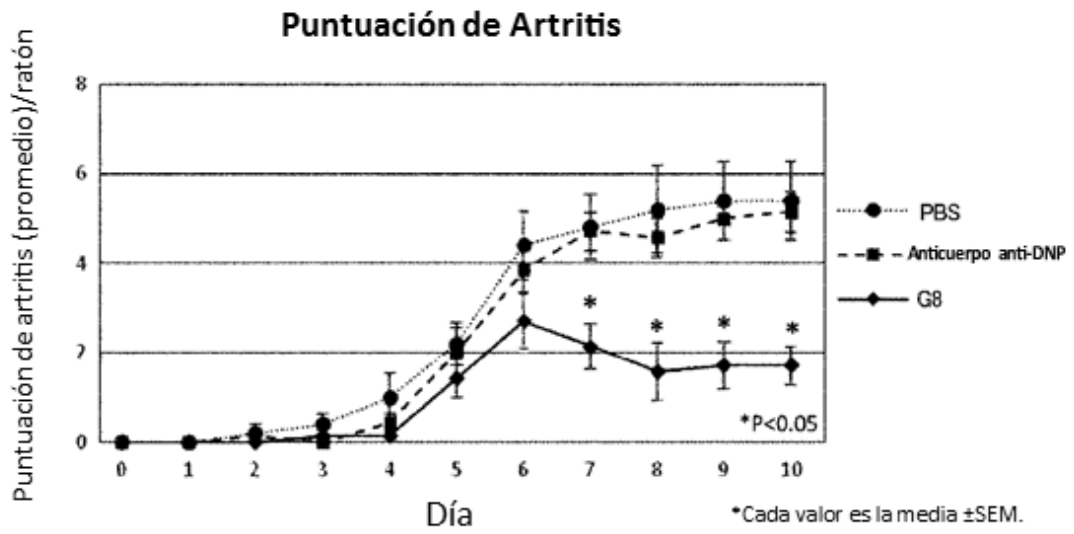
Tamaño de hinchazón de empeine



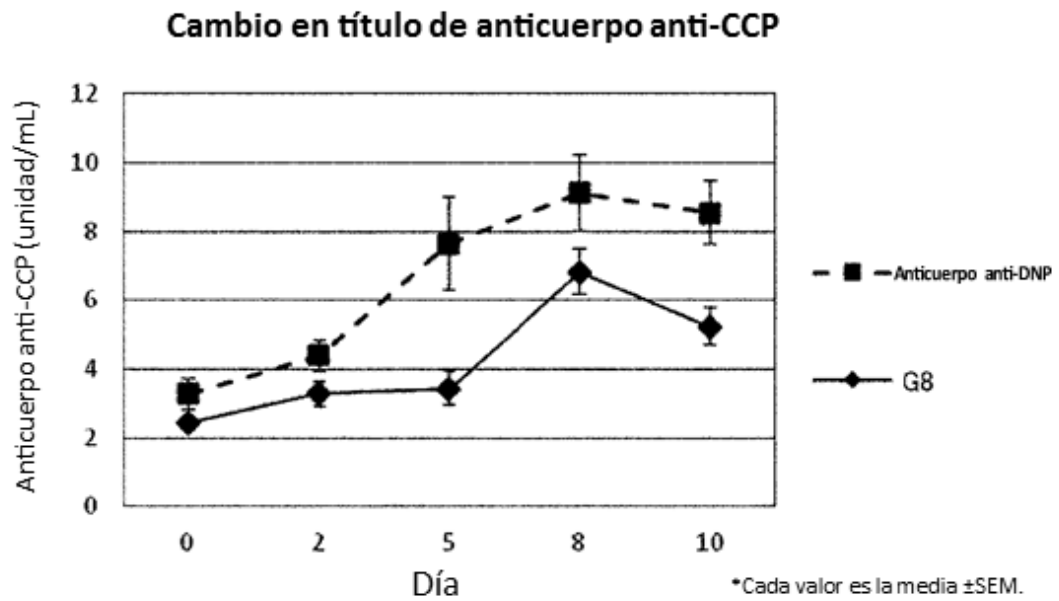
Tamaño de hinchazón de articulación



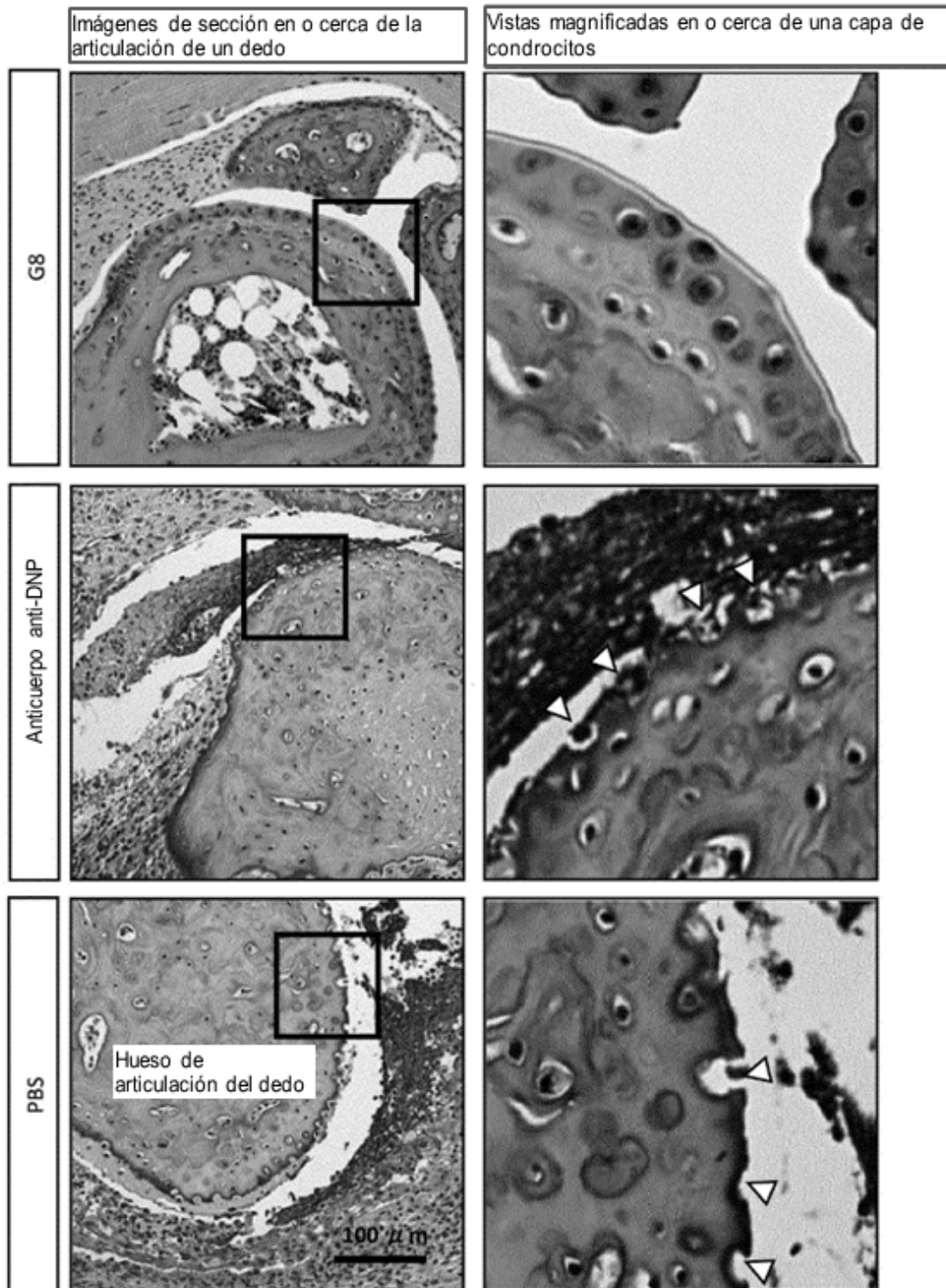
【Fig.10】



【Fig.11】



[Fig.12]



【Fig.13】

Experimento *in vivo* mediante el uso de modelo de ratón CAIA

-Muestras-

- Anticuerpo Anti-PAD4 (G8), n = 7
- Anticuerpo Anti-PAD4 (H7), n = 5
- Anticuerpo Anti-DNP, n = 5

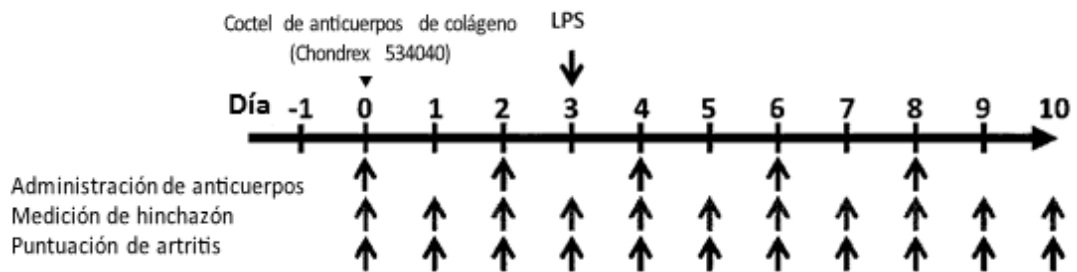
-Modelo de inflamación-

- Modelo de artritis de ratón inducida por anticuerpos de colágeno
- Dosaje/Procedimiento: 1mg/cuerpo (50mg/kg) x 5/administración intraperitoneal

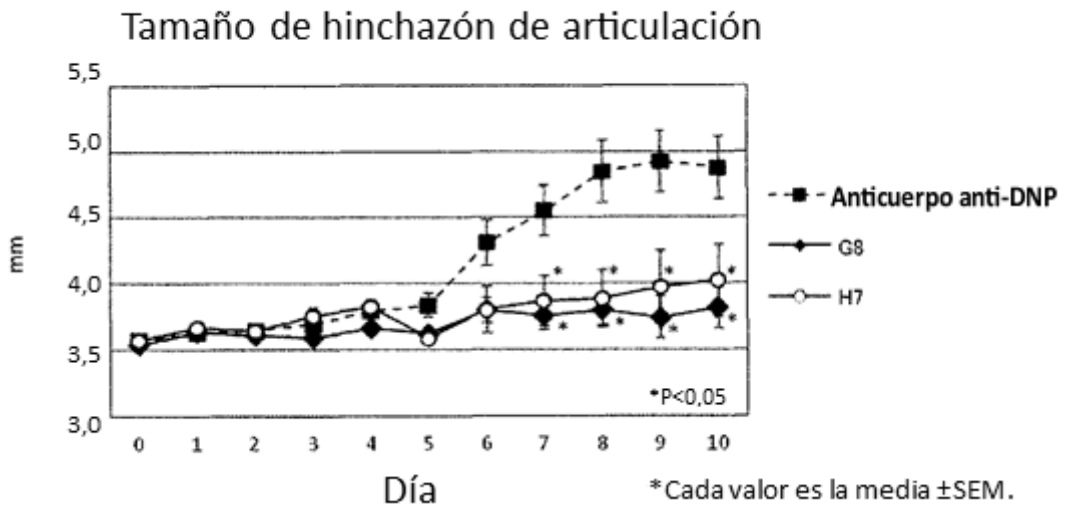
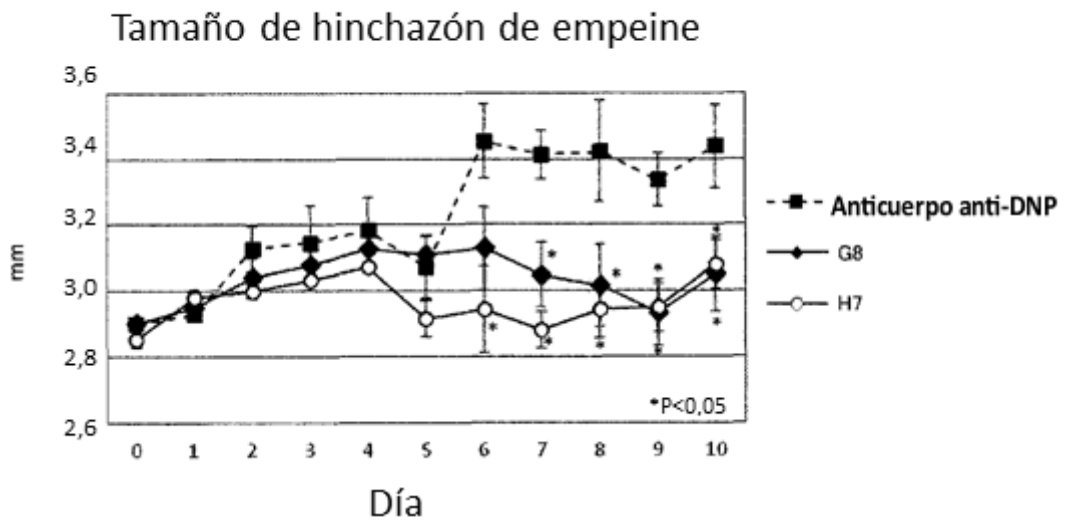
-Puntos finales-

- Puntuación de artritis
- Medición de hinchazón (empeines y articulaciones)

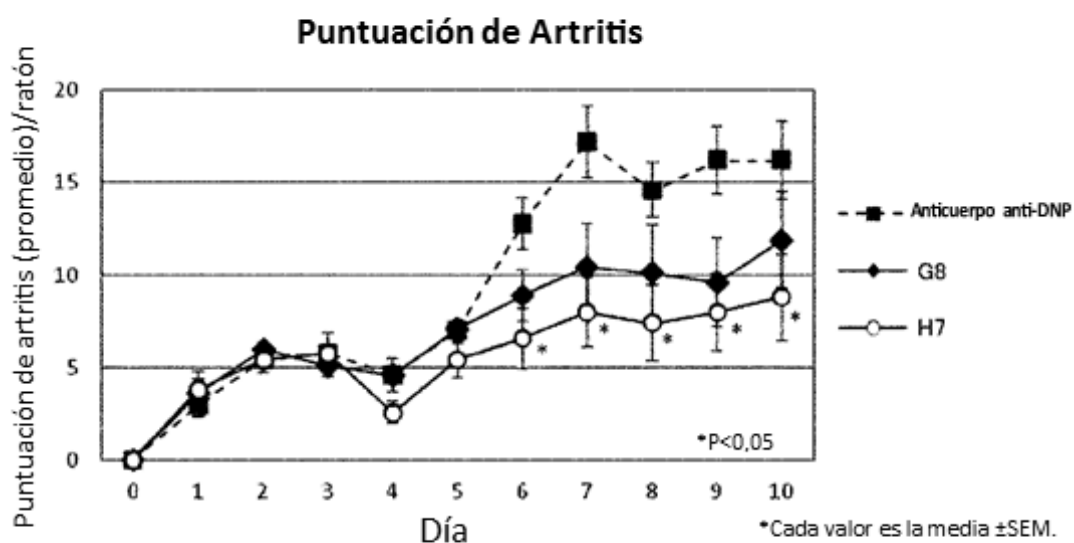
-Cronograma-



[Fig.14]



[Fig.15]



[Fig.16]

>Cadena-H región constante (SEQ ID Nro.: 153)

```
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSN
TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVLHQDMLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
```

>Cadena-L región constante (SEQ ID Nro.: 154)

```
GTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH
QGLSSPVTKSFNRGEC
```

【Fig.17】

>G8H7-H4. 00 (SEQ ID NO:155)
 EVOLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMGWVROAPGKGLEFVAAIRNDGSWTGYGAAVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDT
 AVYYCAKYTGSSGGGSGAWGGGLTVVSS

>G8H7-H4. 15 (SEQ ID NO:156)
 EVOLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMGWVROAPGKGLEFVSAIRNDGSWTGYGAAVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDT
 AVYYCAKYTGSSGGGSGAWGGGLTVVSS

>G8H7-H4. 32 (SEQ ID NO:157)
 EVOLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMGWVROAPGKGLEFVAAIRNDGSWTGYGAAVKGRVTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDT
 AVYYCAKYTGSSGGGSGAWGGGLTVVSS

>G8-L4. 00 (SEQ ID NO:158)
 SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGGNRNYYYGWYQKPGQAPVLIYANDKRPSGIPERFSGSSSGTTVTLTISGVQAEDEADYYCGTADT
GKYVFGGGTKLTVL

>G8-L4. 06 (SEQ ID NO:159)
 SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGGNRNYYYGWYQKPGQAPVTVIYANDKRPSGIPERFSGSYSGNTTTLTISGVQAEDEADYYCGTADT
GKYVFGGGTKLTVL

>G8-L4. 17 (SEQ ID NO:160)
 SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGGNRNYYYGWYQKPGQAPVTVIYANDKRPSGIPERFSGSTSGNTTTLTISGVQAEDEADYYCGTADT
GKYVFGGGTKLTVL

>G8-L4. 29 (SEQ ID NO:161)
 SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGGNRNYYYGWYQKPGQAPVTVIYANDKRPSGIPERFSGSNSGTTTLTISGVQAEDEADYYCGTADT
GKYVFGGGTKLTVL

Las CDR están subrayadas.

【Fig.18】

```

>G8H7-H4. 00 (SEQ ID NO:162)
EVQLLESGGGLVOPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMGWVROAPGKGLEFVAAIRNDGSWTGYGAAVKGRFTISRDNSKNTLYLOMNSLRAEDT
AVYYCAKYTGSSGGSIGAWGOGTLTVSS
>G8H7-H4. 15 (SEQ ID NO:163)
EVQLLESGGGLVOPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMGWVROAPGKGLEFVSAIRNDGSWTGYGAAVKGRFTISRDNSKNTVYLOMNSLRAEDT
AVYYCAKYTGSSGGSIGAWGOGTLTVSS SEQ ID NO:
>G8H7-H4. 32 (SEQ ID NO:164)
EVQLLESGGGLVOPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMGWVROAPGKGLEFVAAIRNDGSWTGYGAAVKGRVTISRDNSKNTVYLOMNSLRAEDT
AVYYCAKYTGSSGGSIGAWGOGTLTVSS
>H7-L4. 00 (SEQ ID NO:165)
SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGGSGRYYYGWYQKPGQAPVTVIYSS1THRPSGIPERFSGSSGTTVTLTISGVQAEDEADYYCGTADS
SSYVFGGGTKLTVL
>H7-L4. 06 (SEQ ID NO:166)
SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGGSGRYYYGWYQKPGQAPVTVIYSS2THRPSGIPERFSGSYSGNTTTLTISGVQAEDEADYYCGTADS
SSYVFGGGTKLTVL
>H7-L4. 15 (SEQ ID NO:167)
SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGGSGRYYYGWYQKPGQAPVTVIYSS3THRPSGIPERFSGSNSGNTTTLTISGVQAEDEADYYCGTADS
SSYVFGGGTKLTVL
>H7-L4. 17 (SEQ ID NO:168)
SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGGSGRYYYGWYQKPGQAPVTVIYSS4THRPSGIPERFSGSTSGNTTTLTISGVQAEDEADYYCGTADS
SSYVFGGGTKLTVL
>H7-L4. 29 (SEQ ID NO:169)
SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGGSGRYYYGWYQKPGQAPVTVIYSS5THRPSGIPERFSGSNSGSTTTLTISGVQAEDEADYYCGTADS
SSYVFGGGTKLTVL

```

Las CDR están subrayadas.

[Fig.19]

A11

Tipo-IgG1 longitud total (H4, 00) SEQ ID Nro.: 170

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYGMGWVROAPGKGLEFVAAIRNDGSNTGYGAAVKGRFTISRDNKNTLYLOMNSLRAEDT
AVYYCAKTTGSRGGSIDAWGGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVMNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQGGNVFSCVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK*

Cadena L tipo-K longitud total (L4.29) (la secuencia de la cadena L es la misma que G9) SEQ ID Nro.: 171

SYELTQPPSVSVSPGOTARITCSGGGRYYGWIYQOKPGQAPVTVIYANDKRPSGIPERFSGSNSGSTTLTISGVQAEDEADYYCGSAETS
SYVFGGGTKLTVLGTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSSSTLTLSKAD
YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*

G8

Tipo IgG1 longitud total (H4.00) (la secuencia de la cadena H es idéntica entre G8, G9, y H7) (SEQ. ID Nro.: 172)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMGWVROAPGKGLEFVAAIRNDGSNTGYGAAVKGRFTISRDNKNTLYLOMNSLRAEDT
AVYYCAKTYGSSGGSIGAWGGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVMNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQGGNVFSCVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK*

Cadena L tipo-K longitud total (L4.29) SEQ ID Nro.: 173

SYELTQPPSVSVSPGOTARITCSGGNRNYYGWIYQOKPGQAPVTVIYANDKRPSGIPERFSGSNSGSTTLTISGVQAEDEADYYCGTADT
GKYVFGGGTKLTVLGTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSSSTLTLSKA
DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*

Las CDR están subrayadas.

Las regiones constantes están subrayadas doble.

【Fig.20】

G9

Tipo IgG1 longitud total (H4.00) (la secuencia de la cadena H es idéntica entre G8, G9, y H7) (SEQ. ID Nro.: 174)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMGWVROAPGKGLEFVAAIRNDGSWTGYGAAVKGRFTISRNSKNTLYLQMNLSRAEDT
AVYYCAKYTGSSGGSIGAWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YLSSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHDDWLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPOVYTLPPSRDELTKN
QVSLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGGPPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*

Cadena L tipo-K longitud total (L4.29) (la secuencia de la cadena L es la misma que A11) SEQ ID Nro.: 175
SYELTQPPSVSVSPGQATARITCSGGGRYYYGWYQOKPGQAPVTVIYANDKRPSGIPERFSGSNGSSTTLTISGVQAEDEADYYCGSAETS
SSYVFGGGTKLTVLGTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWQVDNALOSGNSQESVTEQDSKDYSLSSTLTLSKAD
YEKHKVYACEVTHOGLSSPVTKSFNRGEC*

H7

Tipo IgG1 longitud total (H4.00) (la secuencia de la cadena H es idéntica entre G8, G9, y H7) (SEQ. ID Nro.: 176)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMGWVROAPGKGLEFVAAIRNDGSWTGYGAAVKGRFTISRNSKNTLYLQMNLSRAEDT
AVYYCAKYTGSSGGSIGAWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YLSSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHDDWLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPOVYTLPPSRDELTKN
QVSLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGGPPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*

Cadena L tipo-K longitud total (L4.29) SEQ ID Nro.: 177

SYELTQPPSVSVSPGQATARITCSGGGRYYYGWYQOKPGQAPVTVIYSSTRPSPGIPERFSGSNGSSTTLTISGVQAEDEADYYCGTADS
SSYVFGGGTKLTVLGTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWQVDNALOSGNSQESVTEQDSKDYSLSSTLTLSKA
DYEKHKVYACEVTHOGLSSPVTKSFNRGEC*

Las CDR están subrayadas.

Las regiones constantes están subrayadas doble.

[Fig.21]

G8

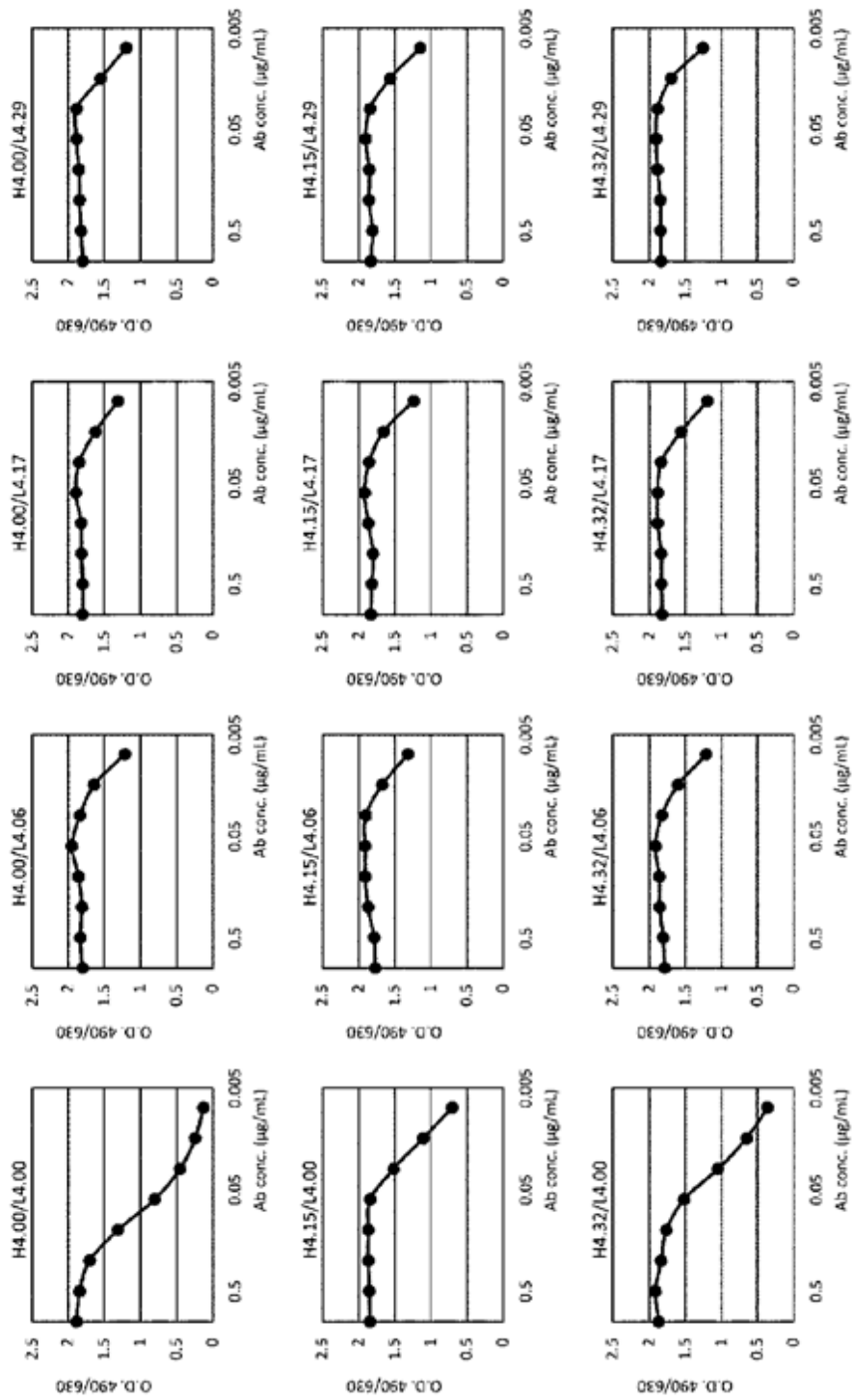
Ab conc. (µg/mL)	H4.00/L4.00	H4.00/L4.06	H4.00/L4.17	H4.00/L4.29	H4.15/L4.00	H4.15/L4.06	H4.15/L4.17	H4.15/L4.29	H4.32/L4.00	H4.32/L4.06	H4.32/L4.17	H4.32/L4.29
1	1.881	1.801	1.798	1.796	1.846	1.775	1.835	1.837	1.867	1.786	1.825	1.837
0.5	1.839	1.83	1.8	1.82	1.859	1.79	1.822	1.811	1.913	1.811	1.831	1.843
0.25	1.7	1.807	1.813	1.841	1.87	1.874	1.807	1.862	1.836	1.853	1.834	1.848
0.125	1.311	1.854	1.819	1.851	1.869	1.913	1.868	1.858	1.763	1.861	1.885	1.886
0.0625	0.806	1.946	1.891	1.882	1.843	1.915	1.925	1.906	1.52	1.913	1.884	1.902
0.03125	0.454	1.834	1.845	1.881	1.517	1.902	1.858	1.846	1.052	1.825	1.835	1.882
0.015625	0.247	1.64	1.622	1.549	1.107	1.68	1.658	1.564	0.649	1.601	1.56	1.693
0.0078125	0.131	1.217	1.312	1.196	0.707	1.315	1.236	1.146	0.364	1.211	1.199	1.259

H7

Ab conc. (µg/mL)	H4.00/L4.00	H4.00/L4.06	H4.00/L4.15	H4.00/L4.17	H4.15/L4.00	H4.15/L4.06	H4.15/L4.15	H4.15/L4.17	H4.32/L4.00	H4.32/L4.06	H4.32/L4.15	H4.32/L4.17
1	1.924	1.86	1.861	1.857	1.865	1.837	1.819	1.772	1.823	1.767	1.789	1.791
0.5	1.914	1.859	1.869	1.848	1.879	1.824	1.83	1.817	1.815	1.806	1.782	1.81
0.25	1.894	1.892	1.891	1.864	1.897	1.816	1.84	1.814	1.848	1.863	1.839	1.861
0.125	1.882	1.868	1.873	1.872	1.844	1.839	1.83	1.814	1.772	1.823	1.866	1.856
0.0625	1.716	1.997	1.916	1.907	1.708	1.829	1.867	1.897	1.648	1.936	1.935	1.975
0.03125	1.209	1.896	1.891	1.853	1.23	1.822	1.821	1.813	1.173	1.901	1.891	1.948
0.015625	0.752	1.749	1.713	1.707	0.764	1.68	1.653	1.633	0.713	1.644	1.767	1.771
0.0078125	0.441	1.258	1.31	1.298	0.429	1.215	1.245	1.31	0.389	1.22	1.337	1.284

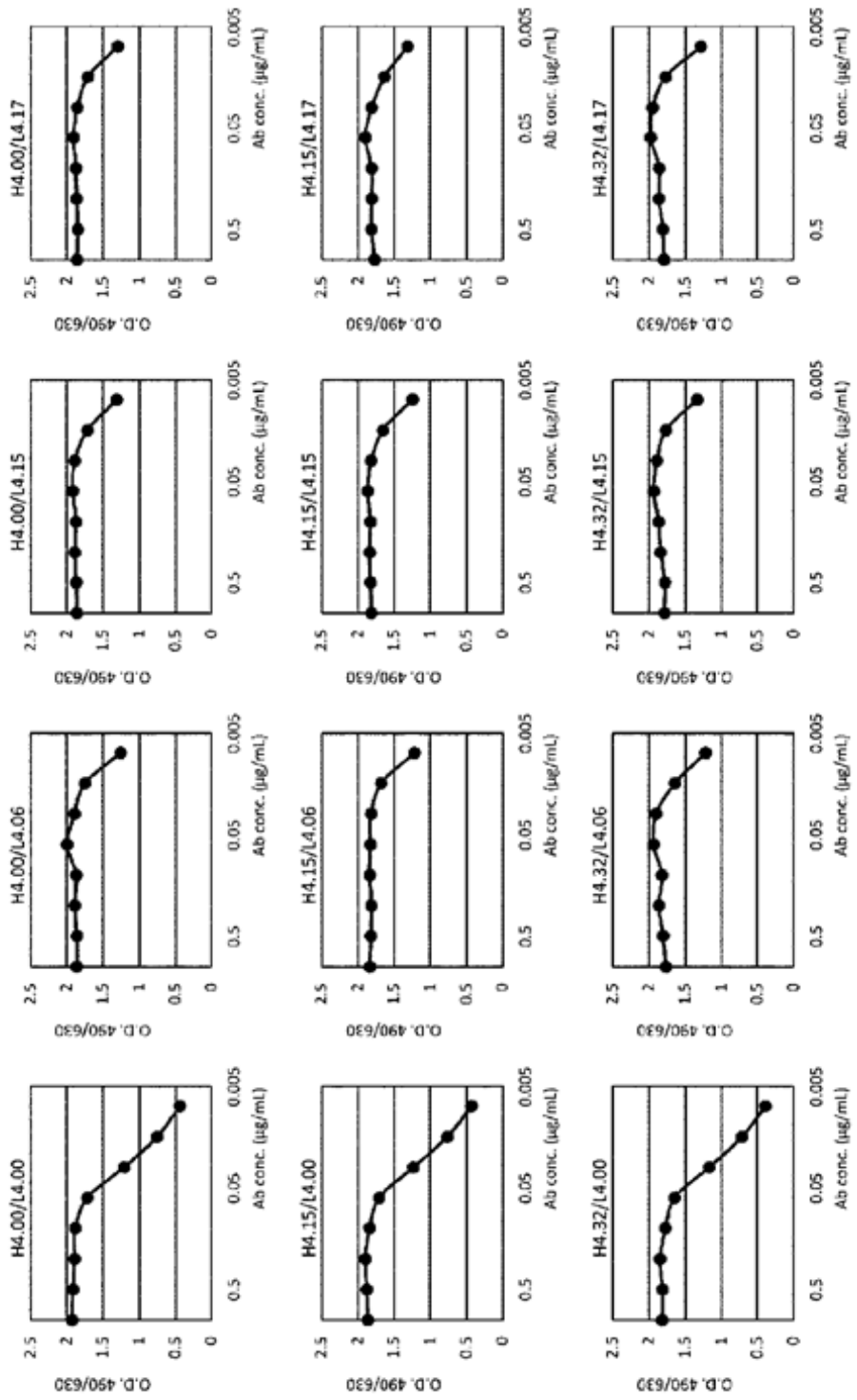
[Fig.22]

Resultados de G8

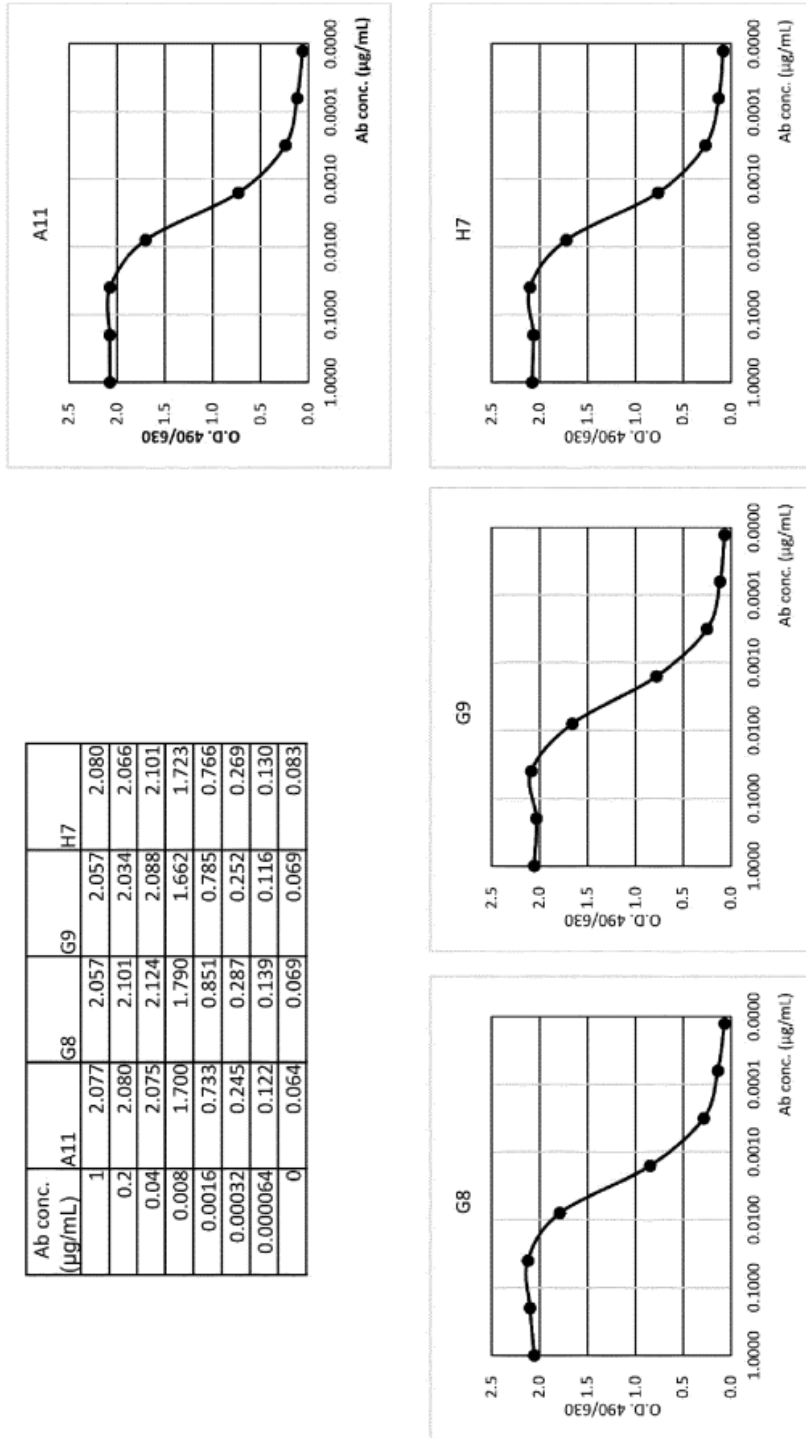


[Fig.23]

Resultados de H7



[Fig.24]



【Fig.25】

>Cadena de región variable H (SEQ: ID Nro.178)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCGGAAGCCTGAGACTGTCTTGTGCCGCCAGCGGCTTACCTTCAGCA
 CCTATGCCATGGGCTGGGTGCGCCAGGCCCTGGAAAGGGCTGGAATTTGTGGCCGCATCCGGAACGATGGCAGCTGGACAGGATATGG
 CGCCGCTGTGAAGGGCCGGTTACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACC
 GCCGTGTACTACTGTGCCAAGTACACCGGCAGCAGCGGCGGCTCTATTGGAGCTTGGGACAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCCTCA

>Cadena de región H constante (SEQ: ID Nro.179)

GCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTCCCTCTGGCCCTTGTAGCAGAAGCACCAGCGAGTCTACAGCCGCCCTGGGCTGCCTCGTGAAGG
 ACTACTTCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTGGAAGTCTGGCGCTCTGACAAGCGCGTGCACACCTTCCAGCCGTGCTGCAGAGCAGCGG
 CCTGTACTCTCTGAGCAGCGTGTGACTGTGCCAGCAGCTCTCTGGGACCAAGACCTACACCTGTAACGTGGACCACAAGCCAGCAAC
 ACCAAGGTGGACAAGCGGGTGAATCTAAGTACGGCCCTCCCTGCCCTCCTTGCCAGCCCTGAATTTCTGGCGGACCCCTCCGTGTTCC
 TGTCCGCCCAAAGCCCAAGGACACCCGTGATGATCAGCGGACCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCAGGAAGATCCCGA
 GGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGAAGTGACAACGCCAAGCAAGCCTAGAGAGGAACAGTTCAACAGCACCTACCGGGT
 GTGTCCGTGCTGACAGTGTGCATCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGAAGGTGTCCAACAAGGGCTGCCAGCTCCATCG
 AGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCGGAACCCAGGTGTACACACTGCCTCCAAGCCAGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGT
 GTCCCTGACCTGTCTCGTAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACACTACAAGACA
 ACCCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTATTCTTCTGTACAGCAGACTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGGAAGGCAACGTGTTCA
 GCTGCAGCGTATGCACAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCTGAGCCTGGGCAAGTGA

>Cadena de región L variable (SEQ: ID Nro.180)

AGCTATGAGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCAGTGTCTCCTGGCCAGACCCGAGAATCACATGTAGCGGGCCAGCGGCCGGTACTACT
 ACGGCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCCTGTGACCGTATCTACAGCAGCACCCACAGACCCAGCGGCATCCCGAGAGATTGAG
 CGGCAGCAATAGCGGCTCCACCACCACCCTGACAATCAGCGGAGTGCAGGCCGAGGACGAGGCCGATTACTACTGTGGCACCGCCGACAGC
 AGCAGTACGTGTTCCGGCGGAGGAACCAAGCTGACCGTCTCTG

>Cadena de región L variable (SEQ: ID Nro.181)

GGTCAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTCTCATAA
 GTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACCACCCCTCAAACA
 AAGCAACAACAAGTACGGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCTGAGCAGTGGAAAGTCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTACCCAT
 GAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCTACAGAATGTTTCATAG

[Fig.26]

>Cadena de región variable H (SEQ: ID Nro.182)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMGWVRQAPGKGLEFVAAIRNDGSWTGYGAAVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDT
AVYYCAKYTGSSGGSIGANGQGTLVTVSS

>Cadena de región H constante (SEQ: ID Nro.183)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTKTYTCNVDHKPSN
TKVDKRVESKYGPPCPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPOVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSGCSVMHEALHNHYTOKLSLSLGLK

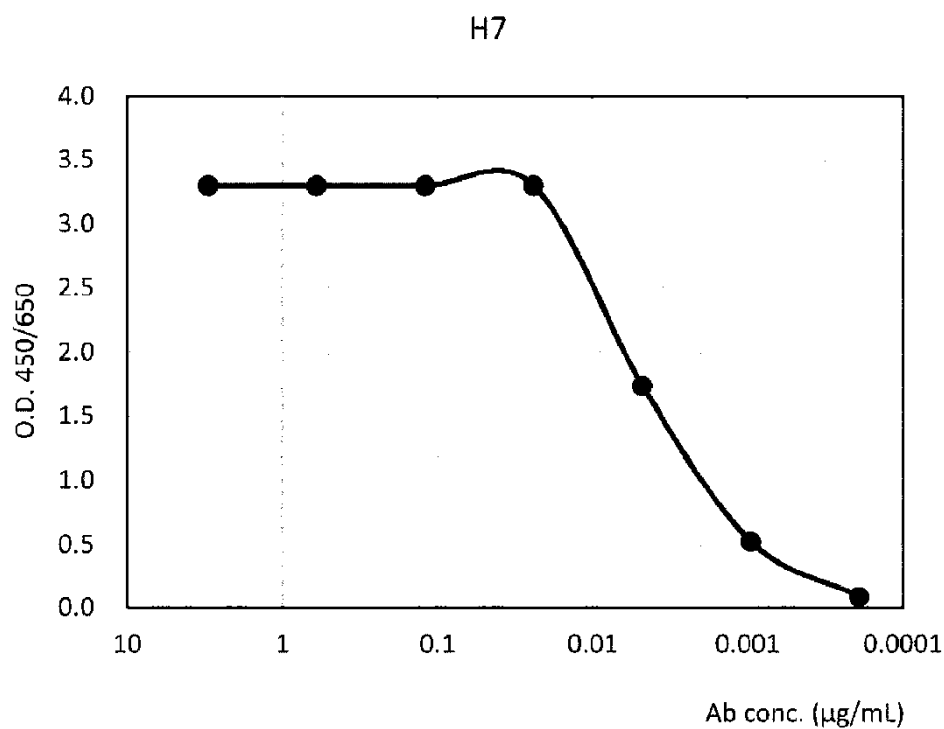
>Cadena de región L variable (SEQ: ID Nro.184)

SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGGSGRYYYGWYQQKPGQAPVTVIYSSTHRPSGIPERFSGSNGSSTTLTISGVQAEDEADYYCGTADS
SSYVFGGGTKLTVL

>Cadena de región L constante (SEQ: ID Nro.185)

GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVANKADSSPVKAGVETTPSKQSNKKAASSYLSLTPEQWKSHRYSQCQVTH
EGSTVEKTVAPTECS.

[Fig.27]



Ab conc. (µg/mL)	H7
3	3.300
0.6	3.300
0.12	3.300
0.024	3.300
0.0048	1.741
0.00096	0.527
0	0.087

[Fig.28]

