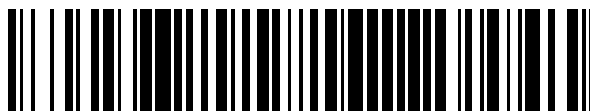


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 427 147**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.06.2005** **E 05789212 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2013** **EP 1768999**

54 Título: **Anticuerpo sHlgM12 útil para tratar esclerosis múltiple**

30 Prioridad:

30.06.2004 US 881661

05.11.2004 US 983104

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

29.10.2013

73 Titular/es:

**MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION
AND RESEARCH (100.0%)
OFFICE OF TECHNOLOGY
COMMERCIALIZATION, 200 FIRST STREET
SOUTHWEST
ROCHESTER, MINNESOTA 55905, US**

72 Inventor/es:

**PEASE, LARRY R.;
RADHAKRISHNAN, SURESH;
VAN KEULEN, VIRGINIA;
CIRIC, BOGOLJUB;
IIJIMA, KOJI y
KITA, HIROHITO**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 427 147 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

Anticuerpo sHlgM12 útil para tratar esclerosis múltiple

Campo técnico

Este documento se refiere a un anticuerpo.

5 Antecedentes

Los anticuerpos IgM decavalentes presentan avidez de unión a antígenos cuantificable, aunque la afinidad de unión pueda ser baja. La estructura multivalente de IgM pentamérica proporciona el potencial para reticular objetivos de superficie celular, dotando a los anticuerpos solubles con potencial biológico normalmente no asociado con función inmune.

- 10 Las células dendríticas (DC) son células de presentación de antígenos (APC) eficientes. Estas células expresan moléculas de presentación de péptidos del complejo principal de histocompatibilidad de clase I y de clase II (MHC) en sus superficies celulares, junto con una serie de moléculas coestimuladoras (Banchereau y Steinman (1998) Nature 392: 245-252). Los linfocitos T no inmunizados expresan receptores para estos ligandos de DC. Tras el reconocimiento de péptido-antígeno presentado en el contexto de las moléculas de clase I o de clase II, la estructura de la membrana del linfocito T se reorganiza, llevando conjuntamente los elementos del receptor de linfocitos T con otras moléculas de superficie celular, incluyendo los co-receptores CD4 o CD8 y los receptores coestimuladores CD28 y CTLA-4 (Monks y cols. (1998) Nature 395: 82-86; y Wulfig y Davis (1998) Science 282: 2266-2269). Las interacciones con los complejos macromoleculares recién formados determinan el resultado de eventos inductivos transducidos en linfocitos T por DC.
- 15
- 20 Las DC residen en una diversidad de tejidos y presentan fenotipos asociados a tejidos distintos (Strunk y cols. (1997) J. Exp. Med. 185: 1131-1136; Caux y cols. (1996) J. Exp. Med. 184: 695-706; Wu y cols. (1996) J. Exp. Med. 184: 903-911; y Horn y cols. (1992) J. Exp. Med. 176: 47-58). Las relaciones entre los linajes celulares de estos subgrupos diferentes de células no están establecidas firmemente. Un cuerpo grande de trabajo ha emergido centrado en DC generado *in vitro* a partir de la médula ósea o de los precursores de sangre (Mayordomo y cols. (1995) Nat. Med. 1: 1297-1302; Nonacs y cols. (1992) J. Exp. Med. 176: 519-529; Steinman y Witmer (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 75: 5132-5136; y Young y Steinman (1990) J. Exp. Med. 171: 1315-1332). Las células generadas *in vitro* expresan niveles altos de antígenos de clase I y las series de ligandos coestimuladores asociadas con DC endógenos (Fagnoni y cols. (1995, Neuroscience 113 (85): 467-474) y Sanna y cols. (2000) Annu. Rev. Immunol. 18: 767-811). De forma importante, son capaces de activar eficientemente linfocitos T vírgenes, una función que es la firma de las DC.
- 25
- 30 El asma es principalmente una enfermedad inflamatoria crónica de las vías respiratorias. Esta inflamación primaria causa dos síntomas secundarios: (a) bronquios excesivamente reactivos que son más sensibles a diversos activadores de asma tales como alérgenos, aire frío y seco, humo y virus y (b) obstrucción del flujo de aire (es decir, dificultad para mover aire dentro y fuera de los pulmones). Estos síntomas se manifiestan típicamente por tos, respiración sibilante, falta de aire o respiración rápida y opresión pectoral.
- 35
- El asma alérgica es la forma más común de asma. Muchos de los síntomas del asma alérgica y del asma no alérgica son los mismos. El asma alérgica se activa inhalando alérgenos tales como ácaros del polvo, caspa de mascotas, pólenes o moho. A través de una reacción compleja, estos alérgenos causan después que se inflamen e hinchen los pasos de las vías respiratorias en los pulmones, dando como resultado síntomas de asma.
- 40
- El asma alérgica se caracteriza por infiltración inflamatoria pulmonar e hiperreactividad a una diversidad de irritantes pulmonares y estímulos tales como metacolina. El rasgo característico de asma alérgica es la expansión anormal de células Th2 en los pulmones (Wills-Karp (1999) Annu. Rev. Immunol. 17: 255-281; y Ray y Cohn (1999) J. Clin. Invest. 104: 985-993). Las DC actúan como las células de presentación de antígenos principales a linfocitos T vírgenes en los órganos linfoides (Steinman (1991) Annu. Rev. Immunol. 9: 271-296). DC están presentes en el tracto respiratorio y tras aislamiento a partir de la tráquea, los bronquios y la pleura visceral, son capaces de presentación de antígenos a linfocitos T (Holt y Schon-Hegrad (1987) Immunol. 62: 349-356; y Sertl y cols. (1986) J. Exp. Med. 163: 436-451).
- 45
- Además, se ha demostrado usando un modelo de ovoalbúmina (OVA) de asma alérgica que las DC pulmonares sensibilizan los linfocitos T, induciendo un fenotipo Th2. El tratamiento de ratones con GM-CSF modula este efecto hacia una polaridad de Th1, con un incremento adjunto en mensaje por IL-12 (Stumbles y cols. (1998) J. Exp. Med. 188: 2019-2031).
- 50
- Sumario**
- Como tales, se proporcionan en el presente documento polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos que son similares o idénticas a la secuencia de aminoácidos del anticuerpo sHlgM12. También se proporcionan en el presente documento moléculas que codifican polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos similares o idénticas a la secuencia de aminoácidos de sHlgM12. Los procedimientos proporcionados en el presente documento pueden ser
- 55
- útiles para tratar o reducir desarrollo de condiciones que implican una respuesta inmune patológica (por ejemplo, enfermedad del colon irritable o esclerosis múltiple).

En un aspecto, este documento presenta un polipéptido purificado que contiene una secuencia de aminoácidos que es al menos idéntica al 95,0 % (por ejemplo, al 99,1 % o 99,2 %) a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N.º: 6 o SEC ID N.º: 8. El polipéptido purificado puede adicionalmente contener una secuencia de aminoácidos que es al menos idéntica al 80,0 % a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N.º: 7, SEC ID N.º: 9, SEC ID N.º: 10, SEC ID N.º: 11, o SEC ID N.º: 12.

En otro aspecto, este documento presenta un ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos idéntica al 95,0 % (por ejemplo, al 99,1 % o 99,2 %) a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N.º: 6 o SEC ID N.º: 8. El polipéptido codificado puede contener adicionalmente una secuencia de aminoácidos que es idéntica entre el 80,0 % y el 99,9 % a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N.º: 7, SEC ID N.º: 9, SEC ID N.º: 10, SEC ID N.º: 11, o SEC ID N.º: 12.

En otro aspecto, este documento presenta una composición que contiene un polipéptido y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en la que el polipéptido contiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica entre el 95 % y el 99,9 % a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N.º: 6 o la SEC ID N.º: 8. El polipéptido puede contener adicionalmente una secuencia de aminoácidos que es idéntica entre el 80,0 % y el 99,9 % a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N.º: 7, SEC ID N.º: 9, SEC ID N.º: 10, SEC ID N.º: 11, o SEC ID N.º: 12.

En aún otro aspecto, este documento presenta una composición que contiene una molécula de ácido nucleico y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en la que el ácido nucleico codifica un polipéptido que contiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica entre el 95 % y el 99,9 % a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N.º: 6 o la SEC ID N.º: 8. El polipéptido codificado puede contener adicionalmente una secuencia de aminoácidos que es idéntica entre el 80,0 % y el 99,9 % a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N.º: 7, SEC ID N.º: 9, SEC ID N.º: 10, SEC ID N.º: 11, o SEC ID N.º: 12.

En otro aspecto, este documento presenta un ácido nucleico aislado que contiene una secuencia nucleotídica que es la secuencia nucleotídica expuesta en la SEC ID N.º: 13 o SEC ID N.º: 14.

A menos que se los defina de otro modo, todos los términos científicos y técnicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto en la técnica a la que se refiere esta invención. Aunque se pueden usar materiales y procedimientos similares o equivalentes a aquellos descritos en el presente documento para llevar a la práctica la invención, se describen más adelante procedimientos y materiales adecuados. Además, los materiales, procedimientos y ejemplos son solamente ilustrativos y no se pretende que sean limitantes.

Los detalles de una o más realizaciones de la invención se exponen en los dibujos adjuntos y en la descripción más adelante. Otras características, objetos y ventajas de la invención serán patentes a partir de la descripción y de los dibujos y a partir de las reivindicaciones.

Descripción de los dibujos

La FIG. 3 es un mapa de un vector de expresión que se puede usar para producir anticuerpos.

La FIG. 1A muestra las secuencias de aminoácidos de los dominios variables (Vk) y constantes (Ck) (SEC ID N.ºs: 6 y 7, respectivamente) de la cadena ligera de sHlgM12. La FIG. 1B muestra las secuencias de los dominios variables (Vh) y constantes (CH1, CH2, CH3, CH4) (SEC ID N.ºs: 8, 9, 10, 11 y 12, respectivamente) de la cadena pesada de sHlgM12. La FIG. 2 muestra secuencias de ácidos nucleicos que codifican los dominios Vk y Vh (SEC ID N.ºs: 13 y 14, respectivamente) de sHlgM12.

Descripción detallada

Se proporcionan en el presente documento polipéptidos que contienen una secuencia de aminoácidos que es similar o idéntica a una secuencia de aminoácidos presente dentro del anticuerpo sHlgM12. También se proporcionan en el presente documento moléculas que codifican polipéptidos que contienen una secuencia de aminoácidos similar o idéntica a la secuencia de aminoácidos del anticuerpo sHlgM12.

1. Moléculas

Las moléculas proporcionadas en el presente documento están típicamente purificadas. El término "purificado" como se usa en el presente documento se refiere a una molécula que está separada o aislada de otros componentes celulares por los que está naturalmente acompañada (por ejemplo, otras proteínas celulares, polinucleótidos, o componentes celulares), o separada de la mayoría o de todos los otros componentes presentes en una mezcla de reacción cuando la molécula se sintetiza *in vitro*. "Purificada" como se usa en el presente documento también comprende moléculas que están parcialmente purificadas, de tal forma que al menos algunos de los componentes por los que la molécula está acompañada se retiran. Típicamente, una molécula se considera "purificada" cuando está al menos libre al 50 % (por ejemplo, al 55 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, o 99 %), en peso seco, de las proteínas y otras moléculas orgánicas o componentes con los que está asociada de forma natural o con los que está acompañada en una reacción de síntesis.

2. Polipéptidos y anticuerpos

Las moléculas proporcionadas en el presente documento son polipéptidos. Como se usa en el presente documento, un polipéptido es una cadena de aminoácidos, independientemente de la longitud o de la modificación postraducciona (por ejemplo, fosforilación o glucosilación).

- 5 Los polipéptidos presentados en el presente documento contienen una secuencia de aminoácidos que es similar o idéntica a la secuencia de aminoácidos de sHlgM12. Por ejemplo, un polipéptido puede contener una secuencia de aminoácidos que es al menos idéntica al 95 % (por ejemplo idéntica al 95,0 %, 97,0 %, 97,5 %, 98,0 %, 98,5 %, 99,0 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, o 99,9 %) a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N.º: 6 o SEC ID N.º: 8. En algunas realizaciones, un polipéptido puede contener adicionalmente una
- 10 secuencia de aminoácidos que es al menos idéntica al 80,0 % (por ejemplo, idéntica al 80,0 %, 85,0 %, 90,0 %, 95,0 %, 97,0 %, 97,5 %, 98,0 %, 98,5 %, 99,0 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, o 99,9 %) a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N.º: 7, SEC ID N.º: 9, SEC ID N.º: 10, SEC ID N.º: 11, o SEC ID N.º: 12. La identidad de secuencia en porcentaje se calcula determinando el número de posiciones apareadas en secuencias de ácidos nucleicos alineados, dividiendo el número de posiciones apareadas por el número total de nucleótidos alineados y multiplicando por 100. Una posición apareada se refiere a una posición en la que nucleótidos idénticos se dan en la misma posición en secuencias de ácidos nucleicos alineados. El porcentaje de identidad de secuencia se puede determinar también para cualquier secuencia de aminoácidos.

- Para determinar el porcentaje de identidad de secuencia, un ácido nucleico objetivo o una secuencia de aminoácidos objetivo se comparan con el ácido nucleico identificado o con la secuencia de aminoácidos identificada usando el
- 20 programa BLAST 2 Sequences (B12seq) de la versión independiente de BLASTZ que contiene BLASTN versión 2.0.14 y BLASTP versión 2.0.14. Esta versión independiente de BLASTZ se puede obtener del sitio web de Fish & Richardson (World Wide Web en fr.com/blast) o del sitio web del Centro Nacional para Información Biotecnológica del gobierno de los EE.UU. (World Wide Web en ncbi.nlm.nih.gov). Las instrucciones que explican como usar el programa B12seq se pueden encontrar en el fichero Léame que acompaña a BLASTZ.

- B12seq lleva a cabo una comparación entre dos secuencias usando bien el algoritmo BLASTN o bien el algoritmo BLASTP. BLASTN se usa para comparar secuencias de ácidos nucleicos, mientras que BLASTP se usa para comparar secuencias de aminoácidos. Para comparar dos secuencias de ácidos nucleicos, las opciones se ajustan como sigue: -i se ajusta a un fichero que contiene la primera secuencia de ácidos nucleicos a comparar (por ejemplo, C:\seq1.txt); -j se ajusta a un fichero que contiene la segunda secuencia de ácidos nucleicos a comparar (por ejemplo, C:\seq2.txt); -p se ajusta a blastn; -o se ajusta a cualquier nombre de fichero deseado (por ejemplo, C:\output.txt); -q se ajusta a -1; -r se ajusta a 2; y todas las otras opciones se dejan en su ajuste por defecto. Por ejemplo, el siguiente comando se puede usar para generar un fichero de salida que contiene una comparación entre dos secuencias:
- 30 C:\B12seq -i c:\seq1.txt -j c:\seq2.txt -p blastn -o c:\output.txt -q -1 -r 2. Para comparar dos secuencias de aminoácidos, las opciones de B12seq se ajustan como sigue: -i se ajusta a un fichero que contiene la primera secuencia de aminoácidos a compararse (por ejemplo, C:\seq1.txt); -j se ajusta a un fichero que contiene la segunda secuencia de aminoácidos a compararse (por ejemplo, C:\seq2.txt); -p se ajusta a blastp; -o se ajusta a cualquier nombre de fichero deseado (por ejemplo, C:\output.txt); y todas las otras opciones se dejan en su ajuste por defecto. Por ejemplo, el siguiente comando se puede usar para generar un fichero de salida que contiene una comparación entre dos secuencias de aminoácidos: C:\B12seq -i c:\seq1.txt -j c:\seq2.txt -p blastp -o c:\output.txt. Si las dos secuencias comparadas comparten homología, entonces el fichero de salida designado presentará esas regiones de homología como secuencias alineadas. Si las dos secuencias comparadas no comparten homología, después el fichero de salida designado no presenta secuencias alineadas.
- 40

- Una vez alineadas, el número de apareamientos se determina contando el número de posiciones donde un residuo nucleotídico o de aminoácido idéntico está presente en ambas secuencias. La identidad de secuencia en porcentaje se determina dividiendo el número de apareamientos bien por la longitud de la secuencia expuesta en la secuencia identificada (por ejemplo, SEC ID N.º: 6), o bien por una longitud articulada (por ejemplo, 100 nucleótidos consecutivos o residuos aminoácidos a partir de una secuencia expuesta en una secuencia identificada), seguido por multiplicar el valor resultante por 100. Por ejemplo, una secuencia de ácidos nucleicos que tiene 98 apareamientos cuando se alinea con la secuencia expuesta en la SEC ID N.º: 6 es idéntica al 92,5 por ciento a la secuencia expuesta en la SEC ID N.º: 6 (es decir, $(98/106) * 100 = 92,5$). Se destaca que el valor de identidad de secuencia porcentual está redondeado a la décima más cercana. Por ejemplo, 75,11, 75,12, 75,13 y 75,14 se redondean hacia abajo a 75,1, mientras que 75,15, 75,16, 75,17, 75,18 y 75,19 se redondean hacia arriba a 75,2. Se destaca también que el valor de la longitud será siempre un número entero.
- 50

- Las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos proporcionados en el presente documento pueden tener sustituciones, deleciones o adiciones con respecto a las secuencias de aminoácidos expuestas en la SEC ID N.º: 6 y 8. Un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que está modificada (por ejemplo, por sustitución) con respecto a SEC ID N.º: 6 y/o SEC ID N.º: 8 puede tener sustancialmente las mismas calidades o cualidades mejoradas comparado con un polipéptido que contiene la secuencia de aminoácidos idéntica a aquella expuesta en la SEC ID N.º: 6 y SEC ID N.º: 8. Una sustitución puede ser una sustitución conservada. Como se usa en el presente documento, una "sustitución conservada" es una sustitución de un aminoácido por otro aminoácido que tiene una cadena de tamaño similar. Una sustitución conservada puede ser típicamente una sustitución por un aminoácido que hace el menor
- 60

cambio posible en la carga del aminoácido o en el tamaño de la cadena lateral del aminoácido (alternativamente, en el tamaño, la carga o la clase del grupo químico dentro de la cadena lateral) de tal forma que el péptido general retiene esencialmente su conformación espacial pero tiene actividad biológica alterada. Ejemplos de cambios conservados incluyen, sin limitación, Asp a Glu, Asn o Gln; His a Lys, Arg o Phe; Asn a Gln, Asp o Glu y Ser a Cys, Thr o Gly. La alanina se usa comúnmente para sustituir otros aminoácidos. Los 20 aminoácidos esenciales se pueden agrupar como sigue: alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina que tienen cadenas laterales no polares; glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparragina y glutamina que tienen cadenas laterales polares no cargadas; aspartato y glutamato que tienen cadenas laterales ácidas; y lisina, arginina e histidina que tienen cadenas laterales básicas (véase, por ejemplo, Stryer, *Biochemistry* (2ª edición) W. H. Freeman and Co. San Francisco (1981), páginas 14-15; y Lehninger, *Biochemistry* (2ª edición, 1975), páginas 73-75). Las sustituciones conservadoras pueden incluir sustituciones hechas con estos grupos.

Las moléculas proporcionadas en el presente documento son anticuerpos. Los términos "anticuerpo" y "anticuerpos" comprenden moléculas intactas así como fragmentos de las mismas. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanizados o quiméricos, fragmentos de anticuerpos Fv de cadena individual, fragmentos Fab y fragmentos F(ab)₂. Los anticuerpos policlonales son poblaciones heterogéneas de moléculas de anticuerpos que son específicas para un antígeno particular, mientras que los anticuerpos monoclonales son poblaciones homogéneas de anticuerpos para un epítipo particular contenido dentro de un antígeno.

Un anticuerpo puede ser de cualquier clase de inmunoglobulina (Ig), incluyendo IgM, IgA, IgD, IgE, e IgG y cualquier subclase de las mismas. Los anticuerpos de la clase IgM (por ejemplo, sHlgM12) típicamente son pentavalentes y son particularmente útiles. Los complejos inmunes que contienen moléculas de Ig que están reticuladas (por ejemplo, IgG reticuladas) y son así multivalentes también pueden ser particularmente útiles.

Como se usa en el presente documento, un "epítipo" es una porción de una molécula antigénica a la que se une el anticuerpo. Los antígenos pueden presentar más de un epítipo al mismo tiempo. Para antígenos polipeptídicos, un epítipo típicamente es de aproximadamente cuatro a seis aminoácidos de longitud y puede incluir aminoácidos modificados (por ejemplo, fosforilados o glicosilados). Dos inmunoglobulinas diferentes pueden tener la misma especificidad de epítopos si se unen al mismo epítipo o grupo de epítopos.

Los anticuerpos policlonales están contenidos en los sueros de animales inmunizados. Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar usando, por ejemplo, tecnología de hibridoma estándar. En particular, los anticuerpos monoclonales se pueden obtener por cualquier técnica que mantenga la producción de moléculas de anticuerpos por líneas celulares continuas en cultivo como se describe, por ejemplo, por Kohler y cols. (1975) *Nature* 256: 495-497, por la técnica de hibridoma de linfocitos B humanos de Kosbor y cols. (1983) *Science* 4: 72; y Cote y cols. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 80: 2026-2030 y por la técnica de EBV-hibridoma de Cole y cols., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R Liss, Inc. páginas 77-96 (1983). Un hibridoma que produce anticuerpos monoclonales se puede cultivar *in vitro* o *in vivo*.

Los anticuerpos proporcionados en el presente documento pueden aislarse también a partir de, por ejemplo, el suero de un individuo. El anticuerpo sIDgM12, por ejemplo, se aisló de suero humano como se describe en el Ejemplo 1 en el presente documento. Los procedimientos adecuados para aislamiento incluyen purificación a partir de suero de mamíferos usando técnicas que incluyen, por ejemplo, cromatografía.

Anticuerpos tales como sHlgM12 también se pueden producir recombinantemente. La secuencia de aminoácidos (por ejemplo, la secuencia de aminoácidos parcial) de un anticuerpo proporcionado en el presente documento se puede determinar por técnicas estándar y un ADNc que codifica el anticuerpo o una porción del anticuerpo se puede aislar a partir del suero del sujeto (por ejemplo, el paciente humano o el animal huésped inmunizado) a partir del que se aisló el anticuerpo originalmente. El ADNc puede clonarse dentro de un vector de expresión usando técnicas estándar. El vector de expresión se puede transfectar dentro de una célula huésped apropiada (por ejemplo, una célula de ovario de hámster chino, una célula COS, o una célula de hibridoma) y el anticuerpo puede expresarse y purificarse. Véase, por ejemplo, el Ejemplo 2 en el presente documento.

Los fragmentos de anticuerpos que retienen función de reticulación también pueden generarse por técnicas tales como aquellas divulgadas anteriormente. Tales fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, fragmentos F(ab')₂ que se pueden producir por digestión con pepsina de una molécula de anticuerpo y fragmentos Fab que pueden generarse reduciendo los puentes disulfuro de fragmentos de F(ab')₂. Alternativamente, se pueden construir bibliotecas de expresión de Fab. Véase, por ejemplo, Huse y cols. (1989) *Science* 246: 1275-1281. Los anticuerpos monocatenarios se forman uniendo los fragmentos de cadena pesada y ligera de la región de Fv por medio de un puente de aminoácidos (por ejemplo, de 15 a 18 aminoácidos), dando como resultado un polipéptido de cadena individual. Los fragmentos de anticuerpo Fv de cadena individual se pueden producir por técnicas estándar, tales como aquellas divulgadas en la patente de los EE.UU. N.º: 4.946.778. Tales fragmentos se pueden volver multivalentes por biotilación y reticulación, por ejemplo.

3. Ácidos nucleicos, vectores y células huésped

En el presente documento se proporcionan ácidos nucleicos que codifican moléculas (por ejemplo, polipéptidos y anticuerpos tales como aquellos descritos en el presente documento). Como se usa en el presente documento, el término "ácido nucleico" hace referencia tanto a ARN como a ADN, incluyendo ADNc, ADN genómico y ADN sintético (por ejemplo, químicamente sintetizado). Una molécula de ácido nucleico puede ser de hebra doble o de hebra individual (es decir, una hebra individual de sentido correcto o una hebra individual antisentido). Los ácidos nucleicos pueden incluir, por ejemplo, ADNc que codifican las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo sHlgM12.

Un "ácido nucleico aislado" se refiere a un ácido nucleico que está separado de otras moléculas de ácido nucleico que normalmente flanquean uno o ambos lados del ácido nucleico en el genoma en el que se encuentra normalmente. El término "aislado" como se usa en el presente documento con respecto a ácidos nucleicos incluye también cualquier secuencia de ácidos nucleicos que no se dé en la naturaleza, dado que tales secuencias que no se dan en la naturaleza no se encuentran en la naturaleza y no tienen secuencias inmediatamente contiguas en un genoma que se dé en la naturaleza.

Un ácido nucleico aislado puede ser, por ejemplo, una molécula de ADN, siempre que una de las secuencias de ácidos nucleicos encontradas normalmente flanqueando de forma inmediata esa molécula de ADN en su genoma que se da en la naturaleza esté eliminada o ausente. Así, un ácido nucleico aislado incluye, sin limitación, una molécula de ADN que existe como una molécula aparte (por ejemplo, un ácido nucleico sintetizado químicamente, o un fragmento de ADNc o de ADN genómico producido por PCR o tratamiento de endonucleasas de restricción) independiente de otras secuencias así como ADN que se incorpora dentro de un vector, un plásmido que se replica autónomamente, un virus (por ejemplo, un retrovirus, lentivirus, adenovirus, o herpesvirus), o dentro del ADN genómico de un procarionte o eucariote. Además, un ácido nucleico aislado puede incluir un ácido nucleico manipulado genéticamente tal como una molécula de ADN que sea parte de un ácido nucleico híbrido o de fusión. Un ácido nucleico existente entre miles a millones de otros ácidos nucleicos dentro de, por ejemplo, bibliotecas de ADNc o bibliotecas genómicas, o láminas de gel que contienen una digestión de restricción de ADN genómico, no se considera un ácido nucleico aislado.

Los ácidos nucleicos aislados divulgados en el presente documento pueden codificar polipéptidos. Por ejemplo, un ácido nucleico aislado puede codificar una secuencia de aminoácidos que es similar o idéntica a una secuencia de aminoácidos encontrada en las regiones variables o constantes de sHlgM12. En una realización, un ácido nucleico puede codificar un polipéptido que contiene una secuencia de aminoácidos que es al menos idéntica al 95,0 % (por ejemplo, al 95,0 %, 97,0 %, 97,5 %, 98,0 %, 98,5 %, 99,0 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, o 99,9 %) a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N.º: 6 o SEC ID N.º: 8. El polipéptido codificado puede contener adicionalmente una secuencia de aminoácidos que es al menos idéntica al 80,0% (por ejemplo, al 80,0 %, 85,0 %, 90,0 %, 95,0 %, 97,0 %, 97,5 %, 98,0 %, 98,5 %, 99,0 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, o 99,9 %) a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N.º: 7, SEC ID N.º: 9, SEC ID N.º: 10, SEC ID N.º: 11, o SEC ID N.º: 12. En otra realización, un ácido nucleico aislado puede contener una secuencia nucleotídica que es idéntica a la secuencia nucleotídica expuesta en la SEC ID N.º: 13 o SEC ID N.º: 14. El procedimiento para determinar la identidad de secuencia en porcentaje se proporciona en el presente documento.

Las moléculas de ácido nucleico aisladas proporcionadas en el presente documento se pueden producir por técnicas estándar, incluyendo, sin limitación, clonación molecular común y técnicas químicas de síntesis de ácidos nucleicos. Por ejemplo, se pueden usar las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para obtener una molécula de ácido nucleico aislada que codifique un anticuerpo tal como sHlgM12. Los ácidos nucleicos aislados también pueden sintetizarse químicamente, bien como una molécula de ácido nucleico individual (por ejemplo, usando síntesis de ADN automatizada en la dirección 3' a 5' usando tecnología de fosforamidita) o bien como una serie de polinucleótidos. Por ejemplo, se pueden sintetizar uno o más pares de polinucleótidos largos (por ejemplo, > 100 nucleótidos) que contienen la secuencia deseada, con cada par conteniendo un segmento corto de complementariedad (por ejemplo, aproximadamente 15 nucleótidos) de tal manera que se forma un dúplex cuando el par de polinucleótidos está fusionado. La ADN polimerasa se usa para prolongar los polinucleótidos, dando como resultado una molécula de ácido nucleico de doble hebra, individual por par de polinucleótidos.

También se proporcionan en el presente documento vectores que contienen ácidos nucleicos tales como aquellos descritos anteriormente. Como se usa en el presente documento, un "vector" es un replicón, tal como un plásmido, fago, o cósmido, dentro del que se puede insertar otro segmento de ADN tal como para llevar a cabo la replicación del segmento insertado. Los vectores proporcionados en el presente documento pueden ser vectores de expresión. Un "vector de expresión" es un vector que incluye una o más secuencias de control de expresión y una "secuencia de control de expresión" es una secuencia de ADN que controla y regula la transcripción y/o traducción de otra secuencia de ADN.

En los vectores de expresión proporcionados en el presente documento, un ácido nucleico (por ejemplo, un ácido nucleico que codifica las cadenas ligeras y/o pesadas de sHlgM12) está unido operablemente a una o más secuencias de control de expresión. Como se usa en el presente documento, "unido operativamente" significa incorporado dentro de una construcción genética de tal forma que las secuencias de control de expresión controlen de forma efectiva la expresión de una secuencia codificante de interés. Ejemplos de secuencias de control de expresión incluyen promotores, potenciadores y regiones de terminación de la transcripción. Un promotor es una secuencia de control de

expresión compuesta de una región de una molécula de ADN, típicamente en 100 a 500 nucleótidos corriente arriba del punto en el que se inicia la transcripción (generalmente cerca del sitio de iniciación para ARN polimerasa II). Para llevar a una secuencia codificante sometida al control de un promotor, es necesario colocar el sitio de iniciación de traducción de la fase de lectura traduccional del polipéptido entre uno y aproximadamente cincuenta nucleótidos corriente abajo del promotor. Los potenciadores proporcionan especificidad de expresión en términos de tiempo, localización y nivel. A diferencia de los promotores, los potenciadores pueden funcionar cuando están situados a diversas distancias desde el sitio de transcripción. Un potenciador también puede localizarse corriente abajo del sitio de iniciación de transcripción. Una secuencia codificante está "operativamente unida" y "sometida al control" de secuencias de control de expresión en una célula cuando la ARN polimerasa es capaz de transcribir la secuencia dentro del ARNm, que después puede traducirse en la proteína codificada por la secuencia codificante. Los vectores de expresión proporcionados en el presente documento son así útiles para producir sHlgM12, así como otras moléculas proporcionadas en el presente documento.

Los vectores de expresión adecuados incluyen, sin limitación, plásmidos y vectores virales derivados de, por ejemplo, bacteriófagos, baculovirus, virus del mosaico del tabaco, herpesvirus, citomegalovirus, retrovirus, virus de la vacuna, adenovirus y virus adenoasociados. Numerosos vectores y sistemas de expresión están comercialmente disponibles en corporaciones tales como Novagen (Madison, WI), Clontech (Palo Alto, CA), Stratagene (La Jolla, CA) e Invitrogen/Life Technologies (Carlsbad, CA).

Un vector de expresión puede incluir una secuencia de marca diseñada para facilitar la manipulación subsiguiente de la secuencia de ácidos nucleicos expresada (por ejemplo, purificación o localización). Las secuencias de marca, tales como secuencias de proteína fluorescente verde (GFP), glutatión S-transferasa (GST), polihistidina, c-myc, hemaglutinina, o marca Flag™ (Kodak, New Haven, CT) se expresan típicamente como una fusión con el polipéptido codificado. Tales marcas pueden insertarse en cualquier sitio dentro del polipéptido incluyendo en cualquiera de los extremos carboxiloterminales o aminoterminales.

Se proporcionan también las células huésped que contienen vectores según se describen en el presente documento. El término "célula huésped" se desea para incluir células procariotas y eucariotas dentro de las que se puede introducir un vector de expresión recombinante. Como se usa en el presente documento, "transformado" y "transfectado" abarcan la introducción de una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, un vector) dentro de una célula por una de una serie de técnicas. Aunque no limitadas a una técnica particular, una serie de estas técnicas están bien establecidas en la técnica. Las células procariotas pueden transformarse con ácidos nucleicos, por ejemplo, por electroporación o por transformación mediada por cloruro de calcio. Los ácidos nucleicos pueden transfectarse dentro de células de mamíferos por técnicas que incluyen, por ejemplo, coprecipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, lipofección, electroporación, o microinyección. Procedimientos adecuados para transformar y transfectar células huésped se encuentran en Sambrook y cols., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª edición), Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York (1989) y reactivos para transformación y/o transfección están comercialmente disponibles (por ejemplo, Lipofectin® (Invitrogen/Life Technologies); Eugene (Roche, Indianápolis, IN); y SuperFect (Qiagen, Valencia, CA)).

4. Composiciones

Las moléculas descritas en el presente documento se pueden usar en la elaboración de un medicamento. Así, las moléculas descritas en el presente documento (por ejemplo, anticuerpos tales como sHlgM12) se pueden incorporar en composiciones. Tales composiciones se proporcionan en el presente documento.

Los procedimientos para formular y administrar subsiguientemente composiciones terapéuticas se conocen bien por aquellos expertos en la técnica. Las dosificaciones típicamente son dependientes de la respuesta del sujeto a la molécula, con el curso del tratamiento durante desde varios días hasta varios meses, o hasta que se logra una respuesta inmune adecuada. Las personas de habilidad ordinaria en la técnica determinan de forma rutinaria dosificaciones óptimas, metodologías de dosificación y velocidades de repetición. Las dosis óptimas pueden variar dependiendo de la potencia relativa de un anticuerpo y pueden estimarse en general sobre la base de las CE₅₀ que se ha encontrado que son eficaces en modelos animales in vitro e in vivo. La dosificación típicamente es desde 0,01 mg hasta 100 g por kg de peso corporal (por ejemplo, desde 1 mg hasta 100 mg, desde 10 mg hasta 10 mg, o desde 50 mg hasta 500 mg por kg de peso corporal). Las composiciones que contienen las moléculas proporcionadas en el presente documento pueden darse una vez o más diariamente, semanalmente, mensualmente, o incluso menos a menudo.

Además de las moléculas proporcionadas en el presente documento, las composiciones descritas en el presente documento pueden contener adicionalmente antígenos que facilitarán una respuesta inmune específica. Los antígenos adecuados incluyen, por ejemplo, polipéptidos o fragmentos de polipéptidos expresados por tumores y organismos patógenos. Virus y bacterias muertos, además de componentes de virus y bacterias muertos, son también antígenos útiles. Tales antígenos pueden estimular respuestas inmunes contra tumores o patógenos.

Las composiciones pueden incluir también DC que se han aislado a partir de, por ejemplo, tejido de médula ósea, de bazo o de timo. Las líneas de DC también son útiles en las composiciones proporcionadas en el presente documento.

Las moléculas presentadas en el presente documento (por ejemplo, anticuerpos tales como sHlgM12) pueden

mezclarse, encapsularse, conjugarse o asociarse de otro modo con otras moléculas, estructuras moleculares o mezclas de compuestos tales como, por ejemplo, liposomas, moléculas dirigidas a receptor, o formulaciones orales, tópicas o de otro tipo para asistir en la captación, distribución y/o absorción.

En algunas realizaciones, una composición puede contener una molécula proporcionada en el presente documento (por ejemplo, sHlgM12, un polipéptido que contiene una secuencia de aminoácidos que es al menos idéntica al 95,0 % a SEC ID N.º: 6 o SEC ID N.º: 8, un ácido nucleico que codifica un polipéptido que contiene una secuencia de aminoácidos idéntica al menos al 95,0 % a la secuencia expuesta en la SEC ID N.º: 6 o SEC ID N.º: 8, o una molécula de ácido nucleico que contiene una secuencia de nucleótidos que es una secuencia expuesta en la SEC ID N.º: 13 o SEC ID N.º: 14) en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos farmacéuticamente aceptables son disolventes farmacéuticamente aceptables, agentes de suspensión, o cualesquiera otros vehículos farmacéuticamente inertes para administrar anticuerpos a un sujeto. Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden ser líquidos o sólidos y pueden seleccionarse con la manera planeada de administración en mente tal como para mantener la masa deseada, la consistencia deseada y otras propiedades de transporte y químicas pertinentes deseadas, cuando se combinan con uno o más compuestos terapéuticos y cualesquiera otros componentes de una composición farmacéutica dada. Los vehículos farmacéuticamente aceptables típicos incluyen, sin limitación: agua; solución salina; aglutinantes (por ejemplo, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); cargas (por ejemplo, lactosa y otros azúcares, gelatina, o sulfato de calcio); lubricantes (por ejemplo, almidón, polietilenglicol, o acetato de sodio); disgregantes (por ejemplo, almidón o glicolato sódico de almidón); y humectantes (por ejemplo, lauril sulfato de sodio).

Las composiciones farmacéuticas que contienen moléculas proporcionadas en el presente documento se pueden administrar por una serie de procedimientos, dependiendo de si se desea tratamiento local o sistémico. La administración puede ser, por ejemplo, parenteral (por ejemplo, por inyección subcutánea, intratecal, intraventricular, intramuscular, o intraperitoneal, o por goteo intravenoso (i.v.)); oral; tópica (por ejemplo, transdérmica, sublingual, oftálmica, o intranasal); o pulmonar (por ejemplo, por inhalación o insuflación de polvos o aerosoles). La administración puede ser rápida (por ejemplo, por inyección) o puede tener lugar durante un periodo de tiempo (por ejemplo, por infusión lenta o por administración de formulaciones de liberación lenta). Para administración al sistema nervioso central, los anticuerpos pueden inyectarse o infundirse en el líquido cerebroespinal, típicamente con uno o más agentes capaces de promover penetración a través de la barrera hematoencefálica.

Las composiciones y formulaciones para administración parenteral, intratecal o intraventricular incluyen soluciones acuosas estériles (por ejemplo, solución salina fisiológica estéril), que también pueden contener tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados (por ejemplo, potenciadores de penetración, compuestos vehículo y otros vehículos farmacéuticamente aceptables).

Las composiciones y formulaciones para la administración oral incluyen, por ejemplo, polvos o gránulos, suspensiones o soluciones en agua o medio no acuoso, cápsulas, sobres o comprimidos. Tales composiciones pueden incorporar también espesantes, agentes aromatizantes, diluyentes, emulsionantes, coadyuvantes de dispersión, o aglutinantes.

Las formulaciones para administración tópica incluyen, por ejemplo, soluciones acuosas estériles y no estériles, soluciones no acuosas en disolventes comunes tales como alcoholes, o soluciones en bases oleosas líquidas o sólidas. Tales soluciones pueden contener también tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados. Las composiciones y formulaciones farmacéuticas para la administración tópica pueden incluir parches transdérmicos, ungüentos, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, pulverizaciones, líquidos y polvos. Los vehículos farmacéuticos, bases acuosas, en polvo u oleosas, espesantes y similares convencionales pueden ser útiles.

Las composiciones farmacéuticas incluyen, pero no se limitan a, soluciones, emulsiones, suspensiones acuosas y formulaciones que contienen liposomas. Estas composiciones pueden generarse a partir de una diversidad de componentes que incluyen, por ejemplo, líquidos preformados, sólidos autoemulsionantes y semisólidos emulsionantes. Las formulaciones de emulsión son particularmente útiles para administración oral de composiciones terapéuticas debido a su facilidad de formulación y eficacia de solubilización, absorción y biodisponibilidad. Los liposomas pueden ser particularmente útiles debido a su especificidad y a la duración de la acción que ofrecen a partir del punto de partida de administración de fármacos.

Las moléculas presentadas en el presente documento pueden abarcar cualesquiera sales, ésteres o sales de tales ésteres farmacéuticamente aceptables, o cualquier otro compuesto que, después de la administración a un sujeto, sea capaz de proporcionar (directamente o indirectamente) el metabolito biológicamente activo o un residuo del mismo. De acuerdo con ello, por ejemplo, este documento proporciona sales farmacéuticamente aceptables de moléculas tales como anticuerpos (por ejemplo, sHlgM12), profármacos y sales farmacéuticamente aceptables de tales profármacos y otros bioequivalentes. Un profármaco es un agente terapéutico que se prepara en una forma inactiva que se convierte en una forma activa (es decir, el fármaco) dentro del organismo o de las células del mismo mediante la acción de enzimas endógenas u otros productos químicos y/o condiciones. El término "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales fisiológicamente y farmacéuticamente aceptables de los anticuerpos útiles en procedimientos descritos en el presente documento (es decir, sales que retienen la actividad biológica deseada de los anticuerpos parentales sin impartir efectos toxicológicos indeseados). Ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, sales formadas con cationes (por ejemplo, sodio, potasio, calcio, o poliaminas tales como espermina); sales de adición de ácidos formadas con ácidos inorgánicos (por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido

sulfúrico, ácido fosfórico, o ácido nítrico); sales formadas con ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido acético, ácido cítrico, ácido oxálico, ácido palmítico, o ácido fumárico); y sales formadas con aniones elementales (por ejemplo, bromo, yodo, o cloro).

5 Las composiciones pueden contener adicionalmente otros componentes adjuntos encontrados convencionalmente en composiciones farmacéuticas. Así, las composiciones pueden incluir también materiales farmacéuticamente activos, compatibles, tales como, por ejemplo, antipruríticos, astringentes, anestésicos locales o agentes antiinflamatorios, o materiales adicionales útiles en formular físicamente diversas formas farmacéuticas de las composiciones proporcionadas en el presente documento, tales como tintes, agentes aromatizantes, conservantes, antioxidantes, opacificadores, agentes espesantes y estabilizantes. Además, la composición puede mezclarse con agentes
10 auxiliares, por ejemplo, lubricantes, conservantes, estabilizantes, humectantes, emulsionantes, sales para influir en la presión osmótica, tampones, colorantes, aromatizantes, potenciadores de penetración y sustancias aromáticas. Cuando se añaden, sin embargo, tales materiales no deberían interferir indebidamente con las actividades biológicas de los componentes de PNA dentro de las composiciones proporcionadas en el presente documento.

15 Las formulaciones farmacéuticas según se describen en el presente documento, que pueden estar presentes convenientemente en forma farmacéutica unitaria, pueden prepararse de acuerdo con técnicas convencionales bien conocidas en la industria farmacéutica. Tales técnicas incluyen la etapa de asociar los ingredientes activos (es decir, los anticuerpos) con el/los vehículo(s) farmacéutico(s) deseado(s). Típicamente, las formulaciones pueden prepararse poniendo en contacto uniforme e íntimamente el agente activo con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o con ambos y después, si es necesario, dando forma al producto. Las formulaciones se pueden esterilizar si
20 se desea, dado que el procedimiento de esterilización no interfiere con la efectividad del/de los anticuerpo(s) contenido(s) en la formulación.

Las composiciones se pueden formular en cualquiera de muchas formas farmacéuticas posibles tales como, sin limitación, comprimidos, cápsulas, jarabes líquidos, geles blandos, supositorios y enemas. Las composiciones también pueden formularse como suspensiones en medios acuosos, no acuosos o mezclados. Las suspensiones acuosas
25 pueden contener adicionalmente sustancias que incrementan la viscosidad de la suspensión incluyendo, por ejemplo carboximetilcelulosa sódica, sorbitol y/o dextrano. Las suspensiones también pueden contener estabilizantes.

5. Procedimientos

Los procedimientos proporcionados en el presente documento incluyen típicamente administrar a un mamífero (por ejemplo, un perro, un gato, un caballo, una vaca, un conejo, una rata, un ratón, o un ser humano) una molécula (por
30 ejemplo, un anticuerpo tal como sHlgM 12) o una composición (por ejemplo, una composición que contiene sHlgM12) proporcionada en el presente documento. En algunas realizaciones, los procedimientos también pueden incluir administración de DC que se han puesto en contacto con una molécula o una composición proporcionada en el presente documento (por ejemplo, una composición que contiene sHlgM12 y un antígeno). Tales DC son útiles para potenciar una respuesta inmune en el mamífero al que se están administrando.

35 Como se describe anteriormente, la composición molecular, o el DC activado pueden administrarse por cualquier procedimiento sistémico o local adecuado. Los procedimientos sistémicos de administración incluyen, sin limitación, administración oral, tópica, o parenteral, así como administración por inyección.

6. Artículos manufacturados

40 Los artículos de elaboración proporcionados en el presente documento pueden incluir una o más moléculas y/o composiciones divulgadas en el presente documento. La molécula y/o composición se puede combinar con material de envasado y se puede vender como kits para tratar o reducir el desarrollo del asma alérgica. La molécula y/o composición puede estar en un recipiente tal como un vial, un tubo, o una jeringuilla, por ejemplo y puede estar rodeada al menos parcialmente con material de envasado. Se conocen bien los componentes y procedimientos para producir artículos manufacturados.

45 Los artículos manufacturados pueden combinar una o más de las moléculas expuestas en las secciones anteriores. Por ejemplo, un artículo de manufactura puede contener una composición que incluya una molécula proporcionada en el presente documento (por ejemplo, un anticuerpo tal como sHlgM12). Un artículo manufacturado también puede incluir uno o más antígenos (por ejemplo, un antígeno tumoral o un antígeno de un patógeno) que puedan estimular una respuesta inmune específica. Además, un artículo manufacturado puede contener DC. Un artículo manufacturado
50 también puede incluir, por ejemplo, tampones u otros reactivos de control para potenciar una respuesta inmune. Las instrucciones también pueden estar incluidas en tales kits.

La invención se describirá adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

Ejemplos

Ejemplo 1-Materiales y procedimientos para aislar y caracterizar sHlgM12

Aislamiento de anticuerpos humanos - Se obtuvieron muestras séricas humanas de la clínica de disproteinemia y aquellas que presentaron un pico clonal de Ig de más de 20 mg/ml se eligieron para evaluación adicional. Las muestras seleccionadas fueron de 50 pacientes con una amplia diversidad de afecciones caracterizadas por un enriquecimiento de IgM monoclonal, incluyendo macroglobulinemia de Waldenstrom, linfoma y gammopatía monoclonal de significancia indeterminada. Los sueros se dializaron frente a agua y se recogieron precipitados por centrifugación a 14.000 rpm durante 30 minutos y se disolvieron en medio salino tamponado con fosfato (PBS). Las muestras se centrifugaron y sometieron a cromatografía en una columna de Superosa-6 (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ). Las fracciones de IgM se almacenaron y analizaron por SDS-PAGE y las concentraciones de proteínas se determinaron por lectura absorbancia a 280 nm. Las soluciones de IgM se filtraron y criopreservaron de forma estéril. El anticuerpo sHlgM12 se identificó en base a su capacidad de unirse a DC según se determina por análisis de FACS. El control de anticuerpos IgM humanos policlonales está descrito anteriormente (Miller y cols. (1994) J. Neurosci. 14: 6230-6238).

Se obtuvo sHlgM12 monomérico a partir de la forma pentámera por reducción con ditioneitol 5 mM (Sigma-Aldrich, San Luis, MO) en Tris 200 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM pH 8,0 durante 2 horas a temperatura ambiente. Se llevó a cabo alquilación subsiguiente con yodoacetamida 12 mM durante 1 hora en hielo. Se aislaron monómeros de IgM por cromatografía en una columna Superdex-200 (Amersham Pharmacia) equilibrada con PBS y caracterizada por SDS-PAGE reductora y no reductora.

Ejemplo 2-Producción de anticuerpos IgM humanos recombinantes

Una vez están identificados los anticuerpos de interés tales como sHlgM12, se generan fuentes inmortalizadas manteniendo estos reactivos importantes. Se desarrolló un sistema vector y se usó inmortalizando sHlgM12 así como otro anticuerpo IgM humano (sHlgM22) identificado en el suero de un paciente de macroglobulinemia de Waldenstrom. La secuencia de aminoácidos de los anticuerpos se determinó a partir de fragmentos Fv generados a partir del suero. Dado que linfocitos B malignos circulan en la sangre de pacientes de Waldenstrom, el ADNc que codifica los genes de las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpo sHlgM22 presente en concentraciones de suero más altas se aisló exitosamente. Estas secuencias de ADNc se usaron generando un gen de cadena pesada de IgM humano genómico que codifica la región variable derivada del anticuerpo del paciente y un gen de cadena ligera basado en ADNc expresado sometido al control del promotor de citomegalovirus (CMV). Estas secuencias génicas de anticuerpos se incorporaron en un vector individual (Figura 3) junto con un gen de dhfr seleccionable expresado sometido al control de un promotor SV40. El vector que lleva los genes de anticuerpos sintéticos se introdujo dentro de células de hibridoma por electroporación. Las células resistentes a metotrexato se seleccionaron y amplificaron reforzando la cantidad de metotrexato en el medio de cultivo. Se recuperó un clon que expresa 100 mg de anticuerpo por ml de sobrenadante. El anticuerpo recombinante presentó todas las propiedades funcionales identificadas para el anticuerpo aislado del suero del paciente.

Este mismo procedimiento se usó generando un suministro recombinante de sHlgM12. Se obtuvo un análisis de secuencia de aminoácidos de sHlgM12. Dado que el extremo aminoterminal del anticuerpo se bloqueó, se generaron fragmentos Fv incrementando la eficiencia de obtener una secuencia aminoterminal. Se determinó que la secuencia aminoterminal de la cadena pesada de sHlgM12 es Val-Gln-Leu-Gln-Glu-Ser-Gly-Pro-Gly-Leu-Leu-Lys-Pro-Ser-Glu-Thr-Leu-Arg/Ser-Leu-Thr-Asn (SEC ID N.º: 4), mientras que la secuencia aminoterminal de la cadena ligera se determinó que es Asp-Ile-Gln-Met-Thr-Gln-Ser-Pro-Ser-Ser-Leu-Ser-Ala-Ser-Val-Gly-Asp-Arg-Val (SEC ID N.º: 5).

El ADNc se aisló de las células de la sangre periférica del paciente usándose recuperando las copias de ADNc de longitud total del ARNm que codifica sHlgM12. Con el fin de asegurar que los ADNc recuperados representen verdaderamente el anticuerpo de interés, se determinaron las secuencias de aminoácidos de las regiones CDR3 de sHlgM12. Esto se llevó a cabo por digestión proteolítica de los fragmentos de Fv y por secuenciación de aminoácidos convencionales de los productos de digestión. Una vez se obtuvieron los ADNc de sHlgM12, se insertaron dentro de un vector que era similar a aquel descrito anteriormente pero se modificaron para expresión de anticuerpos IgM/Kappa sustituyendo la región constante de cadena ligera. El sHlgM12 recombinante se expresó después en la línea F3B6 de hibridoma humano/ratón según se describe anteriormente. Las secuencias de aminoácidos para los dominios variables (Vk) y constantes (Clc) de la cadena ligera se establecen en las SEC ID N.ºs: 6 y 7, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos para los dominios variables (Vh) y constantes (CH1, CH2, CH3 y CH4) de la cadena pesada de sHlgM12 se exponen, respectivamente, en la SEC ID N.ºs: 8, 9, 10, 11 y 12. Estas secuencias de aminoácidos se proporcionan también en las Figuras 1A y 1B. Las secuencias nucleotídicas que codifican las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de sHlgM12 se muestran en la FIG. 2 (SEC ID N.ºs: 13 y 14, respectivamente). El vector modificado también se usó exitosamente expresando el anticuerpo humano rHlgM46.

Otras realizaciones

Se entiende que aunque la invención se ha descrito en conjunto con la descripción detallada de la misma, la siguiente descripción se desea para ilustrar y no para limitar el alcance de la invención, que se define como el alcance de las

reivindicaciones adjuntas. Otros aspectos, ventajas y modificaciones están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

Listado de secuencias

<110> Mayo Foundation for Medical Education and Research

5 <120> Anticuerpo de Unión de B7-DC

<130> 07039-558WO1

<150> Documento US 10/983.104

<151> 5-11-2.004

<150> Documento US 10/881.661

10 <151> 30-6-2.004

<160> 14

<170> PastSEQ para Windows versión 4.0

<210> 1

<211> 8

15 <212> PRT

<213> Gallus gallus

<400> 1

Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu
1 5

20

<210> 2

<211> 14

<212> PRT

<213> Gallus gallus

25

<400> 2

Ile Ser Gln Ala Val His Ala Ala His Ala Glu Ile Asn Glu
1 5 10

<210> 3

30 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Oligonucleótido generado sintéticamente

<400> 3

ES 2 427 147 T3

tccatgacgt tcctgacgt 20

<210> 4

<211> 21

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> VARIANTE

10 <222> 18

<223> Xaa = Arg o Ser

<400> 4

	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Leu	Lys	Pro	Ser	Glu	Thr
	1				5					10					15	
15	Leu	Xaa	Leu	Thr	Asn											
				20												

<210> 5

<211> 19

<212> PRT

20 <213> Homo sapiens

<400> 5

	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
	1				5					10					15	
	Asp	Arg	Val													

25

<210> 6

<211> 106

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30

<400> 6

ES 2 427 147 T3

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
          20           25           30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
          35           40           45
Tyr Ala Ala Ser Leu Arg Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
          50           55           60
Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Val Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65           70           75           80
Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr His Thr Pro Trp Thr
          85           90           95
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          100           105

```

<210> 7

<211> 107

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

```

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1           5           10           15
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
          20           25           30
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
          35           40           45
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
          50           55           60
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65           70           75           80
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
          85           90           95
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
          100           105

```

10

<210> 8

<211> 118

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 8

ES 2 427 147 T3

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Leu	Lys	Pro	Ser	Glu
1				5					10					15	
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Gly	Ser	Val	Ser	Leu	Tyr
			20					25					30		
Tyr	Trp	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Ser	Pro	Gly	Lys	Glu	Pro	Glu	Trp	Ile
		35					40					45			
Gly	Tyr	Ile	Tyr	Ser	Ser	Gly	Ser	Thr	Asp	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	Arg
	50					55					60				
Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Leu	Asp	Thr	Ser	Asn	Asn	Arg	Phe	Ser	Leu
65					70					75					80
Asn	Leu	Arg	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Trp	Cys	Ala
				85					90					95	
Arg	Ser	Ala	Ser	Ile	Arg	Gly	Trp	Phe	Asp	Pro	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
			100					105					110		
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser										
			115												

<210> 9

<211> 104

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Gly	Ser	Ala	Ser	Ala	Pro	Thr	Leu	Phe	Pro	Leu	Val	Ser	Cys	Glu	Asn
1				5					10					15	
Ser	Pro	Ser	Asp	Thr	Ser	Ser	Val	Ala	Val	Gly	Cys	Leu	Ala	Gln	Asp
			20					25					30		
Phe	Leu	Pro	Asp	Ser	Ile	Thr	Phe	Ser	Trp	Lys	Tyr	Lys	Asn	Asn	Ser
		35					40					45			
Asp	Ile	Ser	Ser	Thr	Arg	Gly	Phe	Pro	Ser	Val	Leu	Arg	Gly	Gly	Lys
	50					55					60				
Tyr	Ala	Ala	Thr	Ser	Gln	Val	Leu	Leu	Pro	Ser	Lys	Asp	Val	Met	Gln
65					70					75					80
Gly	Thr	Asp	Glu	His	Val	Val	Cys	Lys	Val	Gln	His	Pro	Asn	Gly	Asn
				85					90					95	
Lys	Glu	Lys	Asn	Val	Pro	Leu	Pro								
			100												

10

<210> 10

<211> 112

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 10

ES 2 427 147 T3

Val	Ile	Ala	Glu	Leu	Pro	Pro	Lys	Val	Ser	Val	Phe	Val	Pro	Pro	Arg
1				5					10				15		
Asp	Gly	Phe	Phe	Gly	Asn	Pro	Arg	Lys	Ser	Lys	Leu	Ile	Cys	Gln	Ala
			20					25					30		
Thr	Gly	Phe	Ser	Pro	Arg	Gln	Ile	Gln	Val	Ser	Trp	Leu	Arg	Glu	Gly
		35					40					45			
Lys	Gln	Val	Gly	Ser	Gly	Val	Thr	Thr	Asp	Gln	Val	Gln	Ala	Glu	Ala
	50					55				60					
Lys	Glu	Ser	Gly	Pro	Thr	Thr	Tyr	Lys	Val	Thr	Ser	Thr	Leu	Thr	Ile
65					70					75					80
Lys	Glu	Ser	Asp	Trp	Leu	Ser	Gln	Ser	Met	Phe	Thr	Cys	Arg	Val	Asp
				85					90					95	
His	Arg	Gly	Leu	Thr	Phe	Gln	Gln	Asn	Ala	Ser	Ser	Met	Cys	Val	Pro
			100					105					110		

<210> 11

<211> 106

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Asp	Gln	Asp	Thr	Ala	Ile	Arg	Val	Phe	Ala	Ile	Pro	Pro	Ser	Phe	Ala
1				5				10					15		
Ser	Ile	Phe	Leu	Thr	Lys	Ser	Thr	Lys	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Thr	Asp
			20					25				30			
Leu	Thr	Thr	Tyr	Asp	Ser	Val	Thr	Ile	Ser	Trp	Thr	Arg	Gln	Asn	Gly
		35					40					45			
Glu	Ala	Val	Lys	Thr	His	Thr	Asn	Ile	Ser	Glu	Ser	His	Pro	Asn	Ala
	50					55				60					
Thr	Phe	Ser	Ala	Val	Gly	Glu	Ala	Ser	Ile	Cys	Glu	Asp	Asp	Trp	Asn
65					70					75					80
Ser	Gly	Glu	Arg	Phe	Thr	Cys	Thr	Val	Thr	His	Thr	Asp	Leu	Pro	Ser
				85					90					95	
Pro	Leu	Lys	Gln	Thr	Ile	Ser	Arg	Pro	Lys						
			100					105							

10

<210> 12

<211> 131

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 12

ES 2 427 147 T3

Gly Val Ala Leu His Arg Pro Asp Val Tyr Leu Leu Pro Pro Ala Arg
 1 5 10 15
 Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu Ser Ala Thr Ile Thr Cys Leu Val Thr
 20 25 30
 Gly Phe Ser Pro Ala Asp Val Phe Val Gln Trp Met Gln Arg Gly Gln
 35 40 45
 Pro Leu Ser Pro Glu Lys Tyr Val Thr Ser Ala Pro Met Pro Glu Pro
 50 55 60
 Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe Ala His Ser Ile Leu Thr Val Ser Glu
 65 70 75 80
 Glu Glu Trp Asn Thr Gly Glu Thr Tyr Thr Cys Val Val Ala His Glu
 85 90 95
 Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys Ser Thr Gly
 100 105 110
 Lys Pro Thr Leu Tyr Asn Val Ser Leu Val Met Ser Asp Thr Ala Gly
 115 120 125
 Thr Cys Tyr
 130

<210> 13

<211> 337

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 13

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ttgtctgcgt ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gattattagt agttatctaa attggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaaggctct gatctatgct gcatccactt tgcgaagtgg ggtcccgta 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccgtcagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttaccata cccgtggac gttcggtcag 300
 10 gggaccaagg tggaaatcaa acgaactgtg gctgcac 337

<210> 14

<211> 369

<212> ADN

15 <213> Homo sapiens

<400> 14

ES 2 427 147 T3

caggtgcagc	tgcaggagtc	gggtccagga	ctgctgaagc	cttcggagac	cctgtccctc	60
acatgcactg	tctctggtgg	ctccgtcagt	ctttactact	ggagctggat	ccggcagtcc	120
ccaggggaagg	aaccggagtg	gattggatat	atctattcca	gtggaagcac	cgattacaac	180
ccttccctca	ggagtcgagt	caccatatca	ctggacacgt	caaacaaccg	gttttcccta	240
aacctgaggt	ctgtgaccgc	cgcagataca	gcggtctatt	gggtgtgcgag	aagtgcgtca	300
attaggggct	ggttcgaccc	ctggggccag	ggaaccctgg	tcaaccgtctc	ctcagggagt	360
gcatccgcc						369

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo producido recombinantemente que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos idéntica al 95 % a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N.º: 6 y a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N.º: 8.
- 5 2. El anticuerpo de la reivindicación 1, comprendiendo dicho anticuerpo adicionalmente una secuencia de aminoácidos que es al menos idéntica al 80,0 % a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N.º: 7, SEC ID N.º: 9, SEC ID N.º: 10, SEC ID N.º: 11, o SEC ID N.º: 12.
3. El anticuerpo producido recombinantemente de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N.º: 6 y la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N.º: 8.
- 10 4. El anticuerpo producido recombinantemente de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicho anticuerpo comprende adicionalmente una secuencia de aminoácidos que es al menos idéntica al 80,0 % a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N.º: 7, SEC ID N.º: 9, SEC ID N.º: 10, SEC ID N.º: 11, o SEC ID N.º: 12.
5. Un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
6. Una composición que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y
- 15 (a) el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, o
- (b) la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 5.
7. La secuencia de ácido nucleico aislada de acuerdo con la reivindicación 5, comprendiendo la secuencia de ácido nucleico la secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEC ID N.º: 13 o SEC ID N.º: 14.
- 20 8. El anticuerpo producido recombinantemente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, siendo el anticuerpo un anticuerpo IgM.

Figura 1 A

Vk:
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPKAPKVLIIYAASLRSGVP
 SRFSGSGGTDFTLTVSSLPEDFATYYCQQSYHTPWTFGGQGTKVEIK (SEC ID N.º:6)

Ck:
 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
 QDSKIDSTYLSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEC ID N.º:7)

Figura 1 B

Vh:
 QVQLQESGPGLLKPSSETLSLTCTVSGGSVSLYYWSWIRQSPGKEPEWIGYIYSSGSTDYNPSLSRV
 TISLDTSNNRFSNLNRSVTAADTAVYWCARSASIRGWFDPPWGQGLTVTVSS (SEC ID N.º:8)

CH1:
 GSASAPTLFPLVSCENSPSDTSSAVGCLAQDFLPDSITFSWKYKNNSDISSTRGFPSVLRGGKYAA
 TSQVLLPSKDVMMQGTDEHVACKVQHPNGNKEKNVPLP (SEC ID N.º:9)

CH2:
 VIAELPPKVSFVPPRDGFFGNPRKSKLICQATGFSPRQIQVSWLREGKQVSGGVTTDQVQAEAKES
 GPTTYKVTSTLTIKESDWLSQSMFTCRVDHRGLTFQQNASSMCPV (SEC ID N.º:10)

CH3:
 DQDTAIRVFAIPPSFASIFLTKSTKLTCLVTDLTITYDSVTISWTRQNGEAVKTHNISESHPNATFSAVG
 EASICEDDWNSGERFTCTVTHTDLPSPCLKQTISRPK (SEC ID N.º:11)

CH4:
 GVALHRPDVYLLPPAREQLNLRRESATITCLVTGFSPADV FVQWMQRGQPLSPEKYVTSAPMPEPQA
 PGRYFAHSILTVSEEEWNTGETYTCVAHEALPNRVTERTVDKSTGKPTLYNVSLVMSD TAGTCY
 (SEC ID N.º:12)

Figura 2

Vk:

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCTTGCTGCGTCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTG
CCGGGCAAGTCAGAGTATTAGTAGTTATCTAAATTGGTATCAGCAGAAACCCAGGGAAAGCCCCCTAAGG
TCCTGATCTATGCTGCATCCACTTTCGGAAGTGGGTCCCGTCAAGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGG
ACAGATTTCACTCTCACCGTCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTT
ACCATACCCCGTGGACGTTTCGGTCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGAACTGTGGCTGCAC

(SEC ID N.º :13)

Vh:

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGTCCAGGACTGCTGAAGCCTTCGGAGACCCCTGTCCCTCACATGCA
CTGTCTCTGGTGGCTCCGTCAGTCTTTACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGTCCCCAGGGAAGGAACC
GGAGTGGATTGGATATATCTATTCCAGTGGGAAGCACCCGATTACAACCCCTCCCTCAGGAGTCGAGTCA
CCATATCACTGGACACGTCAAACAACCGGTTTTCCCTAAACCTGAGGTCTGTGACCGCCGCAGATACA
GCGGTCTATTGGTGTGCGAGAGTGCGTCAATTAGGGGCTGTTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCC
TGGTCACCGTCTCCTCAGGGAGTGCATCCGCC

(SEC ID N.º :14)

Figura 3

