

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 431 834**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.03.2001 E 01914720 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2013 EP 1272205**

54 Título: **Anticuerpos de sialoadhesina factor-2**

30 Prioridad:

07.03.2000 US 187595 P

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

28.11.2013

73 Titular/es:

**THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY (100.0%)
3400 N. Charles Street
Baltimore, MD 21218-2695, US**

72 Inventor/es:

**ABRAHAMSON, JULIE A.;
BOCHNER, BRUCE;
ERICKSON-MILLER, CONNIE L.;
KIKLY, KRISTINE K. y
SCHLEIMER, ROBERT**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 431 834 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

Anticuerpos de sialoadhesina factor-2

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere a polipéptidos aislados que se unen a sialoadhesina factor-2 (SAF-2) y al uso de este tipo de anticuerpos para fines diagnósticos y terapéuticos.

10 **Antecedentes de la invención**

Eosinófilos, basófilos y mastocitos han sido implicados como los tipos de células principales que producen mediadores inflamatorios en respuesta a infecciones por helmintos, así como varias enfermedades, particularmente asma, rinitis y dermatitis atópica (Weller, P.F. (1991) *N. Engl. J. Med.* 324:1110; Sur, S., C. et al. (1993) en *Allergy Principles and Practice*. E. Middleton et al. comps. Mosby, St. Louis, MO, pág. 169; Costa, J.J. et al. (1997) *JAMA* 278:1815). En estas situaciones, se ha observado la acumulación y activación preferenciales de estas células. A pesar de que se realizó un considerable progreso en la comprensión por parte de los autores de la invención del reclutamiento de eosinófilos al lugar de la inflamación, siguen estando poco claros un cierto número de puntos clave, incluidos los mediadores exactos utilizados para la localización a estos sitios durante el proceso de migración. Por ejemplo, la activación de células endoteliales microvasculares y la expresión de moléculas de adhesión, en particular VCAM-1, se percibe como un fenómeno clave en este proceso durante la inflamación alérgica (Bochner, B.S. (1998) en *Allergy Principles and Practice*. J. Middleton et al. comps. Mosby, St. Louis). Además, se han implicado un cierto número de quimioquinas y otros factores quimiotácticos tales como los que actúan a través de CCR3, debido a su implicación en la quimiotaxis de eosinófilos, basófilos y mastocitos (Dahinden, C.A. et al. (1994) *J. Exp. Med.* 179:751; Daffern, P.J. et al. (1995) *J. Exp. Med.* 181: 2119; Nickel, R.L. et al. (1999) *J. Allergy Clin. Immunol.* 104:723; Romagnani, P. et al. (1999) *Am. J. Pathol* 155:1195; Rot, A. et al. (1992) *J. Exp. Med.* 176:1489). Sin embargo, otra posibilidad es que estas células sean selectivamente reclutadas y activadas de una manera específica debido a un fenotipo único de la superficie celular. Aun cuando eosinófilos, basófilos y mastocitos son fácilmente identificables en base a sus propiedades tintoriales, hasta ahora no se ha identificado marcador de la superficie celular alguno que sea único para estos subconjuntos de células (Saito, H. et al. (1986) *Blood* 67:50; Bodger, M.P. et al. (1987) *Blood* 69:1414).

Sialoadhesina factor-2, o SAF-2 (publicación de patente europea No. EP 0 924 297 A1), es un miembro de la familia de proteínas sialoadhesina, también conocidas como lectinas de tipo I y a las que recientemente se les ha dado el nuevo nombre de familia siglec (siglas inglesas de lectinas similares a Ig de unión a ácido siálico) (Kelm, S. et al. (1996) *Glycoconjugate Journal* 13:913). Los miembros de la familia incluyen sialoadhesina (siglec-1), CD22 (siglec-2), CD33 (siglec-3), glicoproteína asociada a mielina (MAG o siglec-4), siglec-5 (Cornish, A.L. et al. (1998) *Blood* 92:2123), OB-BP-1/siglec-6 (Patel, N. et al. (1999) *J. Biol. Chem.* 274:22729) y AIRM1 o siglec-7 (Falco, M. et al. (1999) *J. Exp. Med.* 190:793; Nicoll, G. et al. (1999) *J. Biol. Chem.* 274:34089). Con la excepción de siglec-4, todas ellas son expresadas en diversos subconjuntos de células hematopoyéticas. Los siglecs pertenecen a la familia del supergen de inmunoglobulina (Ig) y tienen un dominio Ig V-set N-terminal, seguido de 1-16 dominios Ig C2 set. Las siglecs median en la adhesión dependiente de ácido siálico con otras células que, generalmente, prefieren enlaces $\alpha 2,3$ (siglec-1, -3 y -4) o enlaces $\alpha 2,6$ (siglec-2) (Kelm et al. *supra*). La mayoría de los miembros de la familia tienen motivos de inhibición de inmunorreceptor basados en tirosinas (ITIM – siglas en inglés) o motivos de activación de inmunorreceptor basados en tirosinas (ITAM – siglas en inglés) que participan en la señalización a través del dominio de homología 2 a Src (SH2) que se une a la fosfotirosina de los ITIM o ITAM. Esto ha sido demostrado para CD22, CD33 y AIRM1 (Falco et al., *supra*; Freeman, S.D. et al. (1995) *Blood* 85:2005; Blasioli, J. et al. (1999) *J. Biol. Chem.* 274:2302).

50 Duarte C.A. et al., "MULTIEPITOPE POLYPEPTIDE OF THE HIV-1 ENVELOPE INDUCES NEUTRALIZING MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST V3 LOOP", AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES, NUEVA YORK, NY, US, vol. 10, nº 3, 1994, páginas 235-243 describen un anticuerpo denominado 2C4.

55 Floyd H. et al. "Siglec-8: A novel eosinophil-specific member of the immunoglobulin superfamily", THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 275, nº 2, 14 de enero de 2000, páginas 861-866, describe la clonación del ADNc que codifica SAF-2 y Siglec-8, respectivamente.

El documento WO 00/77207 describe una proteína denominada SAF-2 y anticuerpos que se unen a la misma.

60 El documento WO 00/44777 describe un anticuerpo que no reconoce SAF-2, pero que muestra un determinado

grado de identidad de su región VL con el de la región VL del anticuerpo 2C4.

El documento WO 97/43416 describe agentes de bloqueo de la cadena gamma común de receptores de citoquina.

5 **Sumario de la invención**

La presente invención se refiere a un polipéptido aislado que se une a SAF-2 humana, en donde el polipéptido comprende regiones determinantes de la complementariedad recogidas en SEQ ID N°s: 5, 6, 7, 8, 9 y 10.

10 La presente invención incluye también una región determinante de la complementariedad de cadena pesada de inmunoglobulina que comprende cualquiera de los polipéptidos recogidos en SEQ ID NOs: 5, 6 ó 7, o cualquier combinación de los mismos, y una región determinante de la complementariedad de cadena ligera kappa de inmunoglobulina que comprende cualquiera de los polipéptidos recogidos en SEQ ID NOs: 8, 9 ó 10, o cualquier combinación de los mismos. Una realización preferida de la presente invención es un polipéptido que comprende
15 una región determinante de la complementariedad de inmunoglobulina que comprende los polipéptidos recogidos en SEQ ID NOs: 5, 6, 7, 8, 9 y 10. La presente invención incluye también un polinucleótido aislado que codifica cualquiera de los polipéptidos que anteceden.

Una realización adicional de la presente invención es un método para detectar la presencia de una célula en una
20 muestra, en donde la célula comprende una proteína SAF-2, comprendiendo el método a) exponer la muestra al polipéptido anterior que se une a SAF-2, y b) detectar el anticuerpo que está unido a SAF-2. La muestra, de la que se sospecha que contiene la célula, puede tratarse opcionalmente antes de la exposición al polipéptido con el fin de hacer susceptible a SAF-2 unirse por parte del anticuerpo. La utilidad preferida para esta realización es la detección de eosinófilos.

25 Otro aspecto de la presente invención incluye el uso del polipéptido anterior en un método para tratar o prevenir diversos estados patológicos alérgicos, asmáticos o cancerosos en un mamífero.

30 Todavía otro aspecto de la presente invención incluye una composición farmacéutica que comprende el polipéptido anterior.

Breve descripción de los dibujos

35 La Figura 1 muestra la secuencia de ADNc V_H y la secuencia de aminoácidos deducida de un anticuerpo monoclonal que se une a SAF-2, Acm 2C4 (SEQ ID NOs: 1 y 2, respectivamente). Los residuos en negrillas indican las tres CDRs (SEQ ID NOs: 5, 6 y 7).

La Figura 2 muestra la secuencia de ADNc V_K y la secuencia de aminoácidos deducida de un anticuerpo monoclonal que se une a SAF-2, 2C4 (SEQ ID NOs: 3 y 4, respectivamente). Los residuos en negrillas indican las
40 tres CDRs (SEQ ID NOs: 8, 9 y 10).

La Figura 3 presenta datos sobre la expresión de SAF-2 en eosinófilos de la sangre periférica humana, basófilos y mastocitos cultivados, derivados de la sangre del cordón umbilical de 16 semanas de edad. Los histogramas mostrados son representativos de 3-4 experimentos con resultados virtualmente idénticos para cada uno de los
45 tipos de célula. También se muestran reactivos monoclonales utilizados como controles positivos y negativos.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona una diversidad de anticuerpos que caen bajo el alcance del polipéptido anterior, incluidos anticuerpos alterados y fragmentos de los mismos, dirigidos contra SAF-2, que se caracterizan por su capacidad de unirse a un polipéptido o polipéptidos de SAF-2 humanos derivados de la misma. Ilustrativo de esta clase de anticuerpos es el anticuerpo monoclonal 2C4. Estos productos de anticuerpos son útiles en la detección de células que comprenden un polipéptido SAF-2 que incluye la detección específica de eosinófilos. Estos productos de anticuerpos son también útiles en composiciones terapéuticas y farmacéuticas para tratar rinitis
55 alérgica, alergias, asma, eczema, linfoma, leucemia o mastocitosis sistémica. Alternativamente, los anticuerpos de la invención se pueden acoplar a toxinas, fármacos antiproliferativos o radionucleidos para exterminar células en zonas de una expresión excesiva de SAF-2, tratando con ello la rinitis alérgica, alergia, asma, eczema, linfoma, leucemia o mastocitosis sistémica.

60 "Anticuerpos" se refiere a inmunoglobulinas que se pueden preparar por técnicas de hibridoma convencionales,

bancos combinatorios de expresión en fagos, reordenamiento aleatorio de la cadena de inmunoglobulina y técnicas de humanización. También están incluidos anticuerpos monoclonales totalmente humanos. Tal como se utiliza en esta memoria, “anticuerpo” incluye también “anticuerpo alterado”, que se refiere a una proteína codificada por una región codificadora de la inmunoglobulina alterada que puede obtenerse mediante la expresión en una célula hospedadora seleccionada. Anticuerpos alterados de este tipo son anticuerpos manipulados (p. ej. anticuerpos quiméricos o humanizados) o fragmentos de anticuerpos que carecen de la totalidad o parte de una región constante de inmunoglobulina, p. ej. Fv, Fab, Fab' o F(ab')₂ y similares. Los términos Fv, Fc, Fd, Fab, Fab' o F(ab')₂ se utilizan con sus significados convencionales. Véase, p. ej., Harlow *et al.* en “Antibodies A Laboratory Manual”, Cold Spring Harbor Laboratory, (1988).

“CDRs” se definen como las secuencias de aminoácidos de la región determinante de la complementariedad de un anticuerpo, que son las regiones hipervariables de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulinas. Véase, p. ej., Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 4ª Ed., U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987). Existen tres CDRs o regiones de CDR de cadena pesada y tres CDRs o regiones de CDR de cadena ligera en la porción variable de una inmunoglobulina. Por lo tanto, “CDRs”, tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a todas las tres CDRs de cadena pesada o a todas las tres CDRs de cadena ligera o tanto a CDRs de cadena pesada como CDRs de cadena ligera, si es apropiado.

Las CDRs proporcionan la mayoría de residuos de contacto para la unión del anticuerpo al antígeno o epítipo. CDRs de interés en esta invención se derivan de secuencias de las cadenas pesadas y ligeras variables de anticuerpo donante, e incluyen análogos de las CDRs que se producen de forma natural, análogos que comparten o conservan la misma especificidad de unión al antígeno y/o capacidad antagonista que el anticuerpo donante del que se derivaron, pero que pueden exhibir una afinidad incrementada por el antígeno. Un proceso ilustrativo para obtener análogos es la maduración de afinidad por medio de la tecnología de expresión en fagos, según se revisa por Hoogenboom (1997) *Trends in Biotechnology* 15:62; Barbas *et al.* (1996) *Trends in Biotechnology* 14:230; y Winter *et al.* (1994) *Ann. Rev. Immunol.* 12:433 y descrita por Irving *et al.* (1996) *Immunotechnology* 2:127.

“Región codificadora de inmunoglobulina alterada” se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un anticuerpo alterado de la invención. Cuando el anticuerpo alterado es un anticuerpo injertado a una región determinante de la complementariedad (injertado a CDR) o humanizado, las secuencias que codifican las CDRs procedentes de una inmunoglobulina no humana están insertadas en un primer participante de inmunoglobulina que comprende secuencias de entramado variables humanas. Opcionalmente, el primer participante de inmunoglobulina está enlazado operativamente a un segundo participante de inmunoglobulina.

“Primer participante de inmunoglobulina” se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un entramado humano o una región variable de inmunoglobulina humana en la que las regiones codificadoras de CDR nativas (o que se producen de forma natural) están reemplazadas por las regiones codificadoras de CDR de un anticuerpo donante. La región variable humana puede ser una cadena pesada de inmunoglobulina, una cadena ligera (o ambas cadenas), un análogo o fragmento funcional de las mismas. Regiones de CDR de este tipo, situadas dentro de la región variable de anticuerpos (inmunoglobulinas) se pueden determinar por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, Kabat *et al.* en “Sequences of Proteins of Immunological Interest” 4ª Ed., U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987) describen reglas para localizar CDRs. Además, son conocidos programas de ordenador que son útiles para identificar regiones/estructuras de CDR.

“Segundo participante de inmunoglobulina” se refiere a otra secuencia de nucleótidos que codifica una proteína o péptido a la que el primer participante de inmunoglobulina está fusionado en marco o por medio de una secuencia de enlazador convencional opcional (*es decir*, está enlazado operativamente). Preferiblemente, es un gen de inmunoglobulina. El segundo participante de inmunoglobulina puede incluir una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la región constante completa del mismo (*es decir*, homóloga, en donde los primero y segundo anticuerpos alterados se derivan de la misma fuente) o un anticuerpo adicional (*es decir*, heterólogo) de interés. Puede ser una cadena pesada o una cadena ligera de inmunoglobulina (o ambas cadenas como parte de un único polipéptido). El segundo participante de inmunoglobulina no está limitado a una clase de inmunoglobulina o isotipo particular. Además, el segundo participante de inmunoglobulina puede comprender parte de una región constante de inmunoglobulina tal como se encuentra en un Fab o F(ab')₂ (*es decir*, una parte discreta de una región constante humana apropiada o de una región de entramado). Un segundo participante de inmunoglobulina de este tipo también puede comprender una secuencia que codifique una proteína de la membrana integral expuesta sobre la superficie exterior de una célula hospedadora, p. ej. como parte de un banco de expresión en fagos, o una secuencia codificadora de una proteína para la detección analítica o diagnóstica, p. ej. peroxidasa de rábano picante, β-galactosidasa, etc.

Tal como se utiliza en esta memoria, un “anticuerpo manipulado” describe un tipo de anticuerpo alterado, *es decir*, un anticuerpo sintético de longitud completa (*p. ej.* un anticuerpo quimérico o humanizado en oposición a un fragmento de anticuerpo), en el que una parte de los dominios variables de la cadena ligera y/o pesada de un anticuerpo aceptor seleccionado está reemplazada por partes análogas procedentes de uno o más anticuerpos donantes que tienen especificidad para el epítipo seleccionado. Por ejemplo, moléculas de este tipo pueden incluir anticuerpos caracterizados por una cadena pesada humanizada asociada con una cadena ligera no modificada (o cadena ligera quimérica), o viceversa. Los anticuerpos manipulados también se pueden caracterizar por la alteración de las secuencias de ácidos nucleicos que codifican las regiones de entramado de dominio variable ligero y/o pesado del anticuerpo aceptor con el fin de conservar la especificidad de unión al anticuerpo donante. Estos anticuerpos pueden comprender la sustitución de una o más CDRs (preferiblemente todas) procedentes del anticuerpo aceptor con CDRs procedentes de un anticuerpo donante descrito en esta memoria.

La expresión “anticuerpo donante” se refiere a un anticuerpo monoclonal o recombinante que contribuye en las secuencias de ácidos nucleicos de sus regiones variables, CDRs u otros fragmentos funcionales o análogos de los mismos con un primer participante de inmunoglobulina, con el fin de proporcionar la región codificadora de inmunoglobulina alterada y que resulta en el anticuerpo alterado expresado con la especificidad antigénica y la característica de actividad neutralizante del anticuerpo donante. Anticuerpos donantes adecuados para uso en esta invención son un anticuerpo monoclonal murino designado 2C4.

La expresión “anticuerpo aceptor” se refiere a anticuerpos monoclonales o recombinantes heterólogos con respecto al anticuerpo donante, que contribuye en la totalidad o en una parte en las secuencias de ácidos nucleicos que codifican sus regiones de entramado de cadena pesada y/o ligera y/o sus regiones constantes de cadena pesada y/o ligera o secuencias consenso de la subfamilia de la región V con respecto al primer participante de inmunoglobulina. Preferiblemente, un anticuerpo humano es el anticuerpo aceptor.

Un “anticuerpo quimérico” se refiere a un tipo de anticuerpo manipulado que contiene una región variable que se produce de forma natural (cadena ligera y cadena pesada) derivadas de un anticuerpo donante en asociación, con regiones constantes de la cadena ligera y pesada derivadas de un anticuerpo aceptor.

Un “anticuerpo humanizado” se refiere a un tipo de anticuerpo manipulado con sus CDRs derivadas de una inmunoglobulina donante no humana, derivándose las restantes partes de la molécula derivadas de inmunoglobulina de una o más inmunoglobulinas humanas. Además, residuos de soporte del entramado pueden alterarse para conservar su afinidad de unión. Véase, *p. ej.*, Queen et al. (1989) *Proc. Natl Acad Sci USA* 86:10029; Hodgson et al. (1991) *Bio/Technology* 9:421). Además de ello, tal como se describe en esta memoria, residuos adicionales pueden estar alterados para conservar la actividad del anticuerpo donante.

Por “compartir la especificidad de unión a antígenos” se quiere dar a entender, por ejemplo, que a pesar de que el Acm 2C4 puede caracterizarse por un determinado nivel de actividad de unión, un polipéptido que codifica una CDR derivada del Acm 2C4 en cualquier entorno estructural apropiado puede tener una actividad menor o superior. Se espera que CDRs del Acm 2C4 en entornos de este tipo reconocerán, no obstante, el o los mismos epítopos que el Acm 2C4.

La frase “que tiene las características identificadoras de”, tal como se utiliza en esta memoria, indica anticuerpos o polipéptidos de este tipo comparten la misma especificidad de unión a antígenos que los anticuerpos ejemplificados en esta memoria, y se unen al antígeno específico con una afinidad sustancialmente similar a los anticuerpos ejemplificados en esta memoria, según se mide por métodos bien conocidos por los expertos en la técnica.

Un “fragmento funcional” es una secuencia variable de cadena pesada o ligera parcial (*p. ej.* delecciones secundarias en el extremo amino o carboxi de la región variable de la inmunoglobulina) que comparte la misma especificidad de unión a antígenos que el anticuerpo del que se derivó el fragmento.

Un “análogo” es una secuencia de aminoácidos modificada por al menos un aminoácido, en donde dicha modificación puede ser química o una sustitución o una redistribución de unos pocos aminoácidos (*es decir*, no más de 10) y correspondientes secuencias de ácidos nucleicos, modificación que permite que la secuencia de aminoácidos conserve las características biológicas, *p. ej.* la especificidad para antígenos y alta afinidad, de la secuencia no modificada. Análogos de ácidos nucleicos ilustrativos incluyen mutaciones silenciosas que pueden construirse, a través de sustituciones, para crear determinados sitios de restricción de endonucleasa dentro o rodeando a las regiones codificadoras de CDR.

Análogos también pueden surgir en forma de variaciones alélicas. Una “variación o modificación alélica” es una alteración en la secuencia de ácidos nucleicos que codifica las secuencias de aminoácidos o péptidos de la invención. Variaciones o modificaciones de este tipo pueden ser debidas a la degeneración en el código genético o pueden ser manipuladas deliberadamente para proporcionar características deseadas. Estas variaciones o modificaciones pueden o pueden no dar como resultado alteraciones en cualquier secuencia de aminoácidos codificada.

La expresión “agentes efectores” se refiere a las moléculas soporte, no proteicas, a las que se pueden asociar, por medios convencionales, los anticuerpos alterados y/o cadenas ligeras o pesadas naturales o sintéticas del anticuerpo donante u otros fragmentos del anticuerpo donante. Soportes no proteicos de este tipo pueden incluir soportes convencionales utilizados en el sector diagnóstico, *p. ej.* poliestireno u otras perlas de plástico, polisacáridos, *p. ej.* tal como se utiliza en el sistema BIAcore (Pharmacia) u otras sustancias no proteicas útiles en el campo médico y seguras para la administración a seres humanos y animales. Otros agentes efectores pueden incluir un macrociclo para quelar un átomo de metal pesado o radioisótopos. Agentes efectores de este tipo también pueden ser útiles para aumentar la semivida de los anticuerpos alterados, *p. ej.* polietilenglicol.

Tal como se utiliza en esta memoria, el término “tratar” y derivados del mismo significa terapia profiláctica, paliativa o terapéutica.

Para uso en la construcción de los anticuerpos, anticuerpos alterados y fragmentos de esta invención, se puede emplear una especie no humana tal como bovina, ovina, mono, pollo, roedor (*p. ej.* murino y rata) para generar una inmunoglobulina deseable tras la presentación con SAF-2 humana o un epítipo de péptido de la misma. Se emplean técnicas convencionales de hibridoma para proporcionar una línea de células de hibridoma que secreta un Acm no humano contra SAF-2. Hibridomas de este tipo son luego explorados en cuanto a la actividad de unión tal como se describe en la sección de Ejemplos. Alternativamente, Acms totalmente humanos se pueden generar por técnicas conocidas por los expertos en la técnica.

Un Acm ilustrativo de la presente invención es el Acm 2C4, un anticuerpo murino que puede utilizarse para el desarrollo de una molécula quimérica o humanizada. El Acm 2C4 se caracteriza por una actividad de unión específica sobre SAF-2 humana. Este Acm es producido por la línea de células de hibridoma 2C4.

La presente invención incluye también el uso de fragmentos Fab o fragmentos $F(ab')_2$ derivados de Acms dirigidos contra SAF-2 como fragmentos bivalentes. Estos fragmentos son útiles como agentes que tienen actividad de unión a SAF-2. Un fragmento Fab contiene la cadena ligera completa y la porción terminal amino de la cadena pesada. Un fragmento $F(ab')_2$ es el fragmento formado por dos fragmentos Fab unidos por enlaces disulfuro. El Acm 2C4 y otros anticuerpos de elevada afinidad similares proporcionan fuentes de fragmentos Fab y fragmentos $F(ab')_2$ que pueden obtenerse por medios convencionales, *p. ej.* escisión del Acm con las enzimas proteolíticas apropiadas, papaína y/o pepsina, o por métodos recombinantes. Estos fragmentos Fab y $F(ab')_2$ son útiles por sí mismos como agentes terapéuticos, profilácticos o diagnósticos, y como donantes de secuencias que incluyen las regiones variables y las secuencias de CDR útiles en la formación de anticuerpos recombinantes o humanizados tal como se describe en esta memoria.

Los fragmentos Fab y $F(ab')_2$ se pueden construir a través de un banco de fagos combinatorio (véase, *p. ej.* Winter et al. (1994) *Ann. Rev. Immunol.* 12:433) o a través de un reordenamiento aleatorio de la cadena de inmunoglobulina (véase, *p. ej.*, Marks et al. (1992) *Bio/Technology* 10:779), en donde se deja que la inmunoglobulina Fd o V_H procedente de un anticuerpo seleccionado (*p. ej.* 2C4) se asocie con un repertorio de inmunoglobulinas de cadena ligera, V_L (o V_K), para formar nuevos Fabs. A la inversa, se puede dejar que la inmunoglobulina de cadena ligera procedente de un anticuerpo seleccionado se asocie con un repertorio de inmunoglobulinas de cadena pesada, V_H (o Fd), para formar nuevos Fabs. Acms anti-SAF-2 pueden obtenerse dejando que la Fd del Acm 2C4 se asocie con un repertorio de inmunoglobulinas de cadena ligera. Por tanto, se es capaz de recuperar Fabs con secuencias únicas (nucleótido y aminoácido) a partir de la técnica de reordenamiento aleatorio de la cadena.

El Acm 2C4 puede aportar secuencias tales como secuencias de péptidos de cadena pesada y/o ligera variables, secuencias de entramado, secuencias de CDR, fragmentos funcionales y análogos de los mismos, y las secuencias de ácidos nucleicos que las codifican, útiles para el diseño y obtención de diversos anticuerpos alterados que se caracterizan por la especificidad de unión a antígenos del anticuerpo donante.

Las secuencias de ácidos nucleicos de esta invención, o fragmentos de las mismas, que codifican las secuencias peptídicas de cadena ligera y de cadena pesada variables, también son útiles para la introducción mutagénica de

cambios específicos dentro de las secuencias de ácidos nucleicos que codifican las CDRs o regiones de entramado y para la incorporación de la secuencia de ácido nucleico modificada o de fusión resultante en un plásmido para su expresión. Por ejemplo, se pueden utilizar sustituciones silenciosas en la secuencia de nucleótidos de las regiones de entramado y codificadoras de CDR para crear sitios de enzimas de restricción que facilitan la inserción de regiones de CDR y/o de entramado mutagenizadas. Estas regiones codificadoras de CDR se pueden utilizar en la construcción de los anticuerpos humanizados de la invención.

Las secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del Acm 2C4 se recoge en SEQ ID NO: 1. Las secuencias de aminoácidos de CDR procedente de esta región se recogen en las SEQ ID NOS: 5, 6 y 7.

Las secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del Acm 2C4 se recogen en SEQ ID NO: 3. Las secuencias de aminoácidos de CDR procedente de esta región se recogen en las SEQ ID NOS: 8, 9 y 10.

Teniendo en cuenta la degeneración del código genético, se pueden construir diversas secuencias codificadoras que codifican las secuencias de aminoácidos de cadena pesada y ligera variables y secuencias CDR de la invención, así como fragmentos funcionales y análogos de los mismos que comparten la especificidad para el antígeno del anticuerpo donante. Las secuencias de ácidos nucleicos aisladas de esta invención o fragmentos de las mismas, que codifican las secuencias peptídicas de cadena variable o CDRs, pueden utilizarse para producir anticuerpos alterados, *p. ej.* anticuerpos quiméricos o humanizados u otros anticuerpos manipulados de esta invención cuando se combinan operativamente con un segundo participante de inmunoglobulina.

Debe señalarse que, además de secuencias de ácidos nucleicos aisladas que codifican partes del anticuerpo alterado y anticuerpos descritos en esta memoria, otras secuencias de ácidos nucleicos de este tipo son abarcadas por la presente invención tales como las complementarias a las secuencias codificadoras de CDR nativas o complementarias a las regiones de entramado humanas modificadas que rodean a las regiones codificadoras de CDR. Secuencias de ADN útiles incluyen aquellas secuencias que se hibridan bajo condiciones de hibridación rigurosas a las secuencias de ADN. Véase, T. Maniatis *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1982), págs. 387-389. Un ejemplo de una condición de hibridación rigurosa de este tipo es la hibridación a 4XSSC a 65°C, seguido por un lavado en 0,1XSSC a 65°C durante una hora. Alternativamente, una condición de hibridación rigurosa ilustrativa es formamida al 50%, 4xSSC a 42°C. Preferiblemente, estas secuencias de ADN hibridantes son de una longitud de al menos aproximadamente 18 nucleótidos, *es decir*, aproximadamente el tamaño de una CDR.

Moléculas de inmunoglobulina alteradas pueden codificar anticuerpos alterados que incluyen anticuerpos manipulados tales como anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanizados. Una región codificadora de inmunoglobulina alterada deseada contiene regiones codificadoras de CDR que codifican péptidos que tienen la especificidad para el antígeno de un anticuerpo anti-SAF-2, preferiblemente un anticuerpo de alta afinidad tal como se proporciona por la presente invención, insertado en un primer participante de inmunoglobulina tal como una región de entramado humana o una región variable de inmunoglobulina humana.

Preferiblemente, el primer participante de inmunoglobulina está enlazado operativamente a un segundo participante de inmunoglobulina. El segundo participante de inmunoglobulina se define antes y puede incluir una secuencia que codifique una segunda región de anticuerpo de interés, por ejemplo una región Fc. Segundos participantes de inmunoglobulina también pueden incluir secuencias que codifican otra inmunoglobulina a la que la región constante de cadena ligera y pesada se fusiona en marco o por medio de una secuencia enlazadora. Pueden diseñarse anticuerpos manipulados, dirigidos contra fragmentos funcionales o análogos de SAF-2 humana, para obtener una unión potenciada con el mismo anticuerpo.

El segundo participante de inmunoglobulina también se puede asociar con agentes efectores según se define antes, que incluyen moléculas de soporte no proteicas a las que el segundo participante de inmunoglobulina puede estar enlazado operativamente por medios convencionales.

La fusión o enlace entre los segundos participantes de inmunoglobulina, *p. ej.* secuencias de anticuerpo, y el agente efector puede ser por cualesquiera medios adecuados, *p. ej.* por enlaces covalentes o iónicos convencionales, fusiones de proteínas o enlazadores cruzados hetero-bifuncionales, *p. ej.* carbodiimida, glutaraldehído y similares. Técnicas de este tipo son conocidas en la técnica y se describen en textos de química y bioquímica convencionales.

Adicionalmente, secuencias de enlazadores convencionales que simplemente proporcionan una cantidad deseada de espacio entre el segundo participante de inmunoglobulina y el agente efector, también se pueden construir en la región codificadora de inmunoglobulina alterada. El diseño de enlazadores de este tipo es bien conocido por los expertos en la técnica.

Además, secuencias señal para las moléculas de la invención se pueden modificar por técnicas conocidas por los expertos en la técnica para potenciar la expresión y el tráfico intra- e inter-celular.

Un anticuerpo alterado preferido contiene una secuencia peptídica o de proteínas de cadena pesada y/o ligera variable que tiene la especificidad para el antígeno del Acm 2C4, *p. ej.* las cadenas V_H y V_L . Todavía otro anticuerpo alterado deseable de esta invención se caracteriza por las secuencias de aminoácidos que contiene al menos una y, preferiblemente, la totalidad de las CDRs de la región variable de las cadenas pesada y/o ligera de la molécula de anticuerpo murina 2C4 con las restantes secuencias que se derivan de una fuente humana, o un fragmento funcional o análogo del mismo.

En una realización adicional, el anticuerpo alterado de esta invención puede tener fijado al mismo un agente adicional. Por ejemplo, se puede utilizar tecnología de ADN recombinante para producir un anticuerpo alterado de la invención, en el que el fragmento Fc o el dominio CH2 CH3 de una molécula de anticuerpo completa ha sido reemplazado por una enzima u otra molécula detectable, *es decir*, una molécula efectora o informadora de polipéptidos. Otros agentes adicionales incluyen toxinas, fármacos antiproliferativos y radionucleidos.

El segundo participante de inmunoglobulina también puede estar operativamente enlazado a un péptido no inmunoglobulina, proteína o fragmento del mismo heterólogo con respecto a la secuencia con contenido en CDR que tiene especificidad para el antígeno a SAF-2 humana. La proteína resultante puede exhibir tanto especificidad para el antígeno como características de la no inmunoglobulina tras la expresión. Esa característica del participante en la fusión puede ser, por ejemplo, una característica funcional tal como otro dominio de unión o receptor, o una característica terapéutica si el participante en la fusión es por sí mismo una proteína terapéutica o características antigénicas adicionales.

Otra proteína deseable de esta invención puede comprender una molécula de anticuerpo completa que tiene cadenas pesada y ligera de longitud completa o cualquier fragmento discreto de las mismas, tales como los fragmentos Fab o $F(ab')_2$, un dímero de cadena pesada o cualesquiera fragmentos recombinantes mínimos del mismo tal como un Fv o un anticuerpo de cadena sencilla (SCA – siglas en inglés) o cualquier otra molécula con la misma especificidad que el anticuerpo monoclonal donante seleccionado, *p. ej.* el Acm 2C4. Una proteína de este tipo puede utilizarse en forma de un anticuerpo alterado o puede utilizarse en su forma no fusionada.

Siempre que el segundo participante de inmunoglobulina se derive de un anticuerpo diferente del anticuerpo donante, *p. ej.* cualquier isotipo o clase de regiones del entramado o constantes de inmunoglobulina, resulta un anticuerpo manipulado. Anticuerpos manipulados pueden comprender regiones constantes de inmunoglobulina y regiones de entramado variables procedentes de una fuente, *p. ej.* el anticuerpo aceptor, y una o más (preferiblemente todas las) CDRs procedentes del anticuerpo donante, *p. ej.* el Acm 2C4. Además, se pueden realizar alteraciones, *p. ej.* deleciones, sustituciones o adiciones de la región de entramado del dominio variable de la cadena ligera y/o pesada del Acm aceptor en los niveles de ácidos nucleicos o aminoácidos, o las regiones de CDR donantes pueden realizarse con el fin de conservar la especificidad de unión a antígenos del anticuerpo donante.

Anticuerpos manipulados de este tipo están diseñados para emplear una (o las dos) cadenas pesada y/o ligera variables de un Acm anti-SAF-2 (opcionalmente modificado según se describe) o una o más de las CDRs de las cadenas pesada o ligera. Los anticuerpos manipulados de la invención exhiben una actividad de unión.

Anticuerpos manipulados de este tipo pueden incluir un anticuerpo humanizado que contiene las regiones de entramado de una inmunoglobulina humana seleccionada o subtipo o un anticuerpo quimérico que contiene la región constante de la cadena pesada y ligera humana, fusionada a los fragmentos funcionales del Acm anti-SAF-2. Un anticuerpo aceptor humano (o de otro animal) adecuado puede ser uno seleccionado de una base de datos convencional, *p. ej.* la base de datos KABAT®, Los Alamos database y Swiss Protein database, por homología a las secuencias de nucleótidos y aminoácidos del anticuerpo donante. Un anticuerpo humano caracterizado por una homología con los entramados de la región V del anticuerpo donante o secuencias consenso de la subfamilia de la región V (sobre una base de aminoácidos) puede ser adecuado para proporcionar una región de entramado variable de cadena pesada para la inserción de las CDRs donantes. Un anticuerpo aceptor adecuado capaz de donar regiones de entramado variable de cadena ligera puede seleccionarse de una manera similar. Debe

señalarse que no se requiere que las cadenas pesada y ligera del anticuerpo aceptor procedan del mismo anticuerpo aceptor.

Preferiblemente, las regiones de entramado y constante heterólogas se seleccionan de clases e isotipos de inmunoglobulinas humanos tales como IgG (subtipos 1 a 4), IgM, IgA e IgE. Se prefiere IgG1,k e IgG4,k. Se prefiere particularmente IgG4,k. El más particularmente preferido es la variante subtipo IgG4 que contiene las mutaciones S228P y L235E (mutación PE) en la región constante de cadena pesada que resulta en una función efectora reducida. Esta variante de subtipo IgG4 se conoce en esta memoria como IgG4PE. Véanse las patentes de EE.UU. N°s 5.624.821 y 5.648.260.

El anticuerpo aceptor no necesita comprender sólo secuencias de proteínas de inmunoglobulina humana. Por ejemplo, se puede construir un gen en el que una secuencia de ADN que codifica parte de una cadena de inmunoglobulina humana está fusionada a una secuencia de ADN que codifica una secuencia de aminoácidos no inmunoglobulina tal como una molécula efectora o informadora de polipéptidos.

Un anticuerpo humanizado particularmente preferido contiene CDRs del Acm 2C4 insertados en las regiones de entramado de una secuencia de anticuerpos humana seleccionada. Para los anticuerpos humanizados, una, dos, o preferiblemente tres CDRs procedentes de regiones variables de la cadena pesada y/o cadena ligera del Acm 2C4 están insertadas en las regiones de entramado de la secuencia de anticuerpos humana seleccionada, reemplazando las CDRs nativas del anticuerpo humano.

Preferiblemente, en un anticuerpo humanizado, los dominios variables tanto de las cadenas pesadas como ligeras humanas han sido manipulados mediante una o más sustituciones de CDR. Es posible utilizar las seis CDRs o diversas combinaciones de menos de las seis CDRs. Preferiblemente, se sustituyen todas las seis CDRs. Es posible reemplazar las CDRs sólo en la cadena pesada humana utilizando como cadena ligera la cadena ligera no modificada procedente del anticuerpo aceptor humano. Todavía alternativamente, se puede seleccionar una cadena ligera compatible de otro anticuerpo humano, recurriendo a bases de datos de anticuerpos convencionales. El resto del anticuerpo manipulado se puede derivar de cualquier inmunoglobulina humana aceptora adecuada.

El anticuerpo humanizado manipulado tiene, por lo tanto, preferiblemente la estructura de un anticuerpo humano natural o un fragmento del mismo, y posee la combinación de propiedades requerida para un uso terapéutico eficaz tal como el tratamiento de rinitis alérgica, alergias, asma, eczema, linfoma, leucemia o mastocitosis sistémica.

Se entenderá por parte de los expertos en la técnica que un anticuerpo manipulado puede ser modificado adicionalmente por cambios en aminoácidos del dominio variable sin afectar necesariamente a la especificidad ni a la elevada afinidad del anticuerpo donante (*es decir*, un análogo). Se anticipa que aminoácidos de cadenas pesadas y ligeras pueden estar sustituidos por otros aminoácidos en los entramados de dominio variable o CDRs o en ambos. Estas sustituciones pueden ser suministradas por el anticuerpo donante o secuencias consenso, procedentes de un subgrupo particular.

Además, la región constante puede estar alterada para potenciar o disminuir las propiedades selectivas de las moléculas de esta invención. Por ejemplo, la dimerización, unión a receptores Fc o la capacidad de unirse y activar el complemento (véase, *p. ej.*, Angal et al. (1993) *Mol. Immunol.* 30:105; Xu et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269:3469; publicación de patente europea N° EP 0 307 434 B1).

Un anticuerpo alterado, que es un anticuerpo quimérico, difiere de los anticuerpos humanizados descritos anteriormente al proporcionar las regiones variables completas de cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo donante no humano, incluidas las regiones de entramado, en asociación con regiones constantes de inmunoglobulina humana para las dos cadenas. Se anticipa que anticuerpos quiméricos que conservan una secuencia no humana adicional con relación a los anticuerpos humanizados de esta invención pueden ser útiles para tratar rinitis alérgica, alergias, asma, eczema, linfoma, leucemia o mastocitosis sistémica.

Preferiblemente, las secuencias de cadena ligera y/o pesada variables y las CDRs del Acm 2C4 u otros Acms donantes adecuados y sus secuencias de ácidos nucleicos codificadoras se utilizan en la construcción de anticuerpos alterados, preferiblemente anticuerpos humanizados de esta invención mediante el siguiente procedimiento. La misma técnica o técnicas similares también se pueden emplear para generar otras realizaciones de esta invención.

Un hibridoma productor de un Acm donante seleccionado, *p. ej.* el anticuerpo murino 2C4, se clona

convencionalmente y el ADN de sus regiones variables de cadena pesada y ligera se obtiene por técnicas conocidas por un experto en la técnica, *p. ej.* las técnicas descritas en Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory (1989). Las regiones pesada y ligera variables que contienen al menos las regiones codificadoras de CDR y las partes de las regiones del entramado de dominio

5 variable ligeras y/o pesadas del Acm aceptor, requeridas con el fin de conservar la especificidad de unión del Acm donante, así como las restantes partes derivadas de inmunoglobulina de la cadena de anticuerpos derivada de una inmunoglobulina humana, se obtienen utilizando cebadores de polinucleótidos y transcriptasa inversa. Las regiones codificadoras de CDR se identifican utilizando una base de datos conocida y mediante comparación con otros anticuerpos.

10 Un anticuerpo quimérico de ratón/ser humano puede entonces prepararse y someterse a ensayo en cuanto a la capacidad de unión. Un anticuerpo quimérico de este tipo contiene las regiones V_H y V_L del anticuerpo donante no humano completas, en asociación con las regiones constantes de Ig humana para las dos cadenas.

15 Regiones de entramado homólogas de una región variable de cadena pesada procedente de un anticuerpo humano se identifican utilizando bases de datos computarizadas, *p. ej.* KABAT®, y un anticuerpo humano caracterizado por homología a los entramados de la región V del anticuerpo donante o secuencias consenso de la subfamilia de la región V (sobre una base de aminoácidos) al Acm 2C4, se selecciona como el anticuerpo aceptor. Las secuencias de regiones variables de la cadena pesada sintéticas que contienen las regiones codificadoras de CDR dentro de

20 los entramados de anticuerpos humanos, se diseñan con sustituciones de nucleótidos opcionales en las regiones de entramado para incorporar sitios de restricción. Esta secuencia diseñada se sintetiza luego utilizando oligómeros sintéticos largos. Alternativamente, la secuencia diseñada se puede sintetizar mediante solapamiento de oligonucleótidos, amplificados mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR – siglas en inglés) y corregida en cuanto a errores. Una región de entramado variable de cadena ligera adecuada se puede diseñar de

25 una manera similar.

Un anticuerpo humanizado se puede derivar del anticuerpo quimérico, preferiblemente se puede preparar sintéticamente insertando las regiones codificadoras de CDR del Acm donante procedente de las cadenas pesadas y ligeras apropiadamente dentro del entramado de cadenas pesadas y ligeras seleccionado. Alternativamente, un

30 anticuerpo humanizado de la invención se puede preparar utilizando técnicas de mutagénesis estándares. Así, el anticuerpo humanizado resultante contiene regiones de entramado humanas y regiones codificadoras de CDR del Acm donante. Puede existir una manipulación subsiguiente de los residuos del entramado. El anticuerpo humanizado resultante se puede expresar en células hospedadoras recombinantes, *p. ej.* células COS, CHO o de mieloma.

35 Un vector de expresión o plásmido recombinante convencional se produce colocando estas secuencias codificadoras para el anticuerpo alterado en asociación operativa con secuencias del control regulador convencionales capaces de controlar la replicación y expresión en y/o la secreción a partir de una célula hospedadora. Secuencias reguladoras incluyen secuencias de promotor, *p. ej.* promotor del CMV o del virus del

40 sarcoma de Rous, y secuencias señal que se pueden derivar de otros anticuerpos conocidos. De manera similar, se puede producir un segundo vector de expresión que tenga una secuencia de ADN que codifique una cadena ligera o pesada de un anticuerpo complementario. Preferiblemente, este segundo vector de expresión es idéntico al primero, excepto con relación a las secuencias codificadoras y los marcadores seleccionables, con el fin de asegurar, lo más posible, que cada una de las cadenas de polipéptidos se exprese funcionalmente.

45 Alternativamente, las secuencias codificadoras de las cadenas pesadas y ligeras para el anticuerpo alterado pueden residir en un solo vector.

Una célula hospedadora seleccionada se co-transfecta por técnicas convencionales tanto con el primero como con el segundo vectores (o simplemente se transfecta con un solo vector) para crear la célula hospedadora

50 transfectada de la invención que comprende tanto las cadenas ligera y pesada recombinantes como sintéticas. La célula transfectada se cultiva luego por técnicas convencionales para producir el anticuerpo manipulado de la invención. El anticuerpo humanizado que incluye la asociación de la cadena pesada y/o de la cadena ligera recombinante se explora del cultivo mediante un ensayo apropiado tal como ELISA o RIA. Técnicas convencionales similares se pueden emplear para construir otros anticuerpos alterados y moléculas de esta

55 invención.

Vectores adecuados para las etapas de clonación y subclonación empleados en los métodos y la construcción de las composiciones de esta invención se pueden seleccionar por un experto en la técnica. Por ejemplo, se puede utilizar la serie pUC de vectores de clonación tal como pUC19, que está comercialmente disponible de vendedores

60 tales como Amersham o Pharmacia. Adicionalmente, se puede utilizar para la clonación cualquier vector que sea

capaz de replicar fácilmente, que tenga una abundancia de sitios de clonación y genes seleccionables (*p. ej.* resistencia a antibióticos) y que se manipule fácilmente. Así, la selección del vector de clonación no es un factor limitante en esta invención.

De manera similar, los vectores empleados para la expresión de los anticuerpos manipulados de acuerdo con esta invención se pueden seleccionar por un experto en la técnica a partir de cualquier vector convencional. Los vectores contienen también secuencias reguladoras seleccionadas (tales como promotores del CMV o del virus del sarcoma de Rous) que dirigen la replicación y expresión de secuencias de ADN heterólogas en células hospedadoras seleccionadas. Estos vectores contienen las secuencias de ADN arriba descritas que codifican el anticuerpo manipulado o la región codificadora de inmunoglobulina alterada. Además, los vectores pueden incorporar las secuencias de inmunoglobulina seleccionadas modificadas mediante la inserción de sitios de restricción deseables para su fácil manipulación.

Los vectores de expresión también se pueden caracterizar por genes adecuados para amplificar la expresión de las secuencias de ADN heterólogas, *p. ej.* el gen dihidrofolato reductasa (DHFR) de mamíferos. Otras secuencias de vectores preferibles incluyen una secuencia señal poli A tal como la procedente de la hormona del crecimiento bovina (BGH) y la secuencia del promotor de betaglobina (betaglopro). Los vectores de expresión útiles en esta memoria se pueden sintetizar por técnicas bien conocidas por los expertos en esta técnica.

Los componentes de vectores de este tipo, *p. ej.* replicones, genes de selección, potenciadores, promotores, secuencias señal y similares se pueden obtener de fuentes comerciales o naturales o se pueden sintetizar por procesos conocidos para uso en dirigir la expresión y/o secreción del producto del ADN recombinante en un hospedante seleccionado. Otros vectores de expresión apropiados, de los que se conocen en la técnica numerosos tipos para la expresión en mamíferos, bacterias, insectos, levaduras y hongos, también se pueden seleccionar para este fin.

La presente invención comprende también una línea celular transfectada con un plásmido recombinante que contiene las secuencias codificadoras de los anticuerpos manipulados o las moléculas de inmunoglobulina alteradas de los mismos. Células hospedadoras útiles para la clonación y otras manipulaciones de estos vectores de clonación también son convencionales. Sin embargo, lo más deseablemente, se utilizan células procedentes de diferentes cepas de *E. coli* para la replicación de los vectores de clonación y otras etapas en la construcción de anticuerpos alterados de esta invención.

Células hospedadoras o líneas celulares adecuadas para la expresión del anticuerpo manipulado o el anticuerpo alterado de la invención son preferiblemente células de mamíferos tales como células CHO, COS, una célula de fibroblasto (*p. ej.* 3T3) y células mieloides y, más preferiblemente, una CHO o una célula mieloides. Se pueden utilizar células humanas permitiendo así que la molécula sea modificada con diseños de glicosilación humanos. Alternativamente, se pueden emplear otras líneas de células eucarióticas. La selección de células hospedadoras de mamíferos adecuadas y métodos para la transformación, cultivo, amplificación, exploración y preparación de productos y purificación son conocidos en la técnica. Véase, *p. ej.*, Sambrook *et al.*, *supra*.

Células bacterianas pueden demostrar ser útiles como células hospedadoras adecuadas para la expresión de los Fabs recombinantes de la presente invención (véase, *p. ej.*, Plückthun, A., *Immunol. Rev.*, 130, 151-188 (1992)). Sin embargo, debido a la tendencia de las proteínas expresadas en células bacterianas a estar en una forma no plegada o inadecuadamente plegada o en una forma no glicosilada, cualquier Fab recombinante producido en una célula bacteriana debería ser explorado en cuanto a la retención de la capacidad de unión a antígenos. Si la molécula expresada por la célula bacteriana se produjo en una forma apropiadamente plegada, esa célula bacteriana sería un hospedador deseable. Por ejemplo, diversas cepas de *E. coli* utilizadas para la expresión son bien conocidas como células hospedadoras en el sector de la biotecnología. También se pueden emplear diversas cepas de *B. subtilis*, *Streptomyces*, otros bacilos y similares.

En los casos en los que se desee, también están disponibles cepas de células de levadura, conocidas por los expertos en la técnica como células hospedadoras, así como células de insectos, *p. ej.* *Drosophila* y *Lepidoptera*, y sistemas de expresión virales. Véase, *p. ej.*, Miller *et al.*, *Genetic Engineering*, 8, 277-298, Plenum Press (1986) y referencias citadas en la misma.

Los métodos generales mediante los cuales se pueden construir los vectores de la invención, los métodos de transfección requeridos para producir las células hospedadoras de la invención y los métodos de cultivo necesarios para producir el anticuerpo alterado de la invención a partir de células hospedadoras de este tipo son todas técnicas convencionales. De igual manera, una vez producidos, los anticuerpos alterados de la invención se

pueden purificar del contenido del cultivo celular de acuerdo con procesos convencionales de la técnica, incluidas precipitación con sulfato de amonio, columnas de afinidad, cromatografía en columna, electroforesis en gel y similares. Técnicas de este tipo se encuentran dentro de la experiencia de la técnica y no limitan esta invención.

5 Todavía otro método de expresión de los anticuerpos humanizados puede utilizar la expresión en un animal transgénico, tal como se describe en la patente de EE.UU. No. 4.873.316. Ésta se refiere a un sistema de expresión que utiliza el promotor de caseína animal que, cuando se incorpora transgénicamente en un mamífero, permite producir a la hembra la proteína recombinante deseada en su leche.

10 Una vez expresado por el método deseado, el anticuerpo manipulado se examina luego en cuanto a su actividad *in vitro* mediante el uso de un ensayo apropiado.

15 Siguiendo los procesos descritos para anticuerpos humanizados preparados a partir del Acm 2C4, un experto en la técnica también puede construir anticuerpos humanizados a partir de otros anticuerpos donantes, secuencias de regiones variables y péptidos de CDR descritos en esta memoria. Anticuerpos manipulados se pueden producir con entramados de la región variable potencialmente reconocidos como "propios" por receptores del anticuerpo manipulado. Se pueden implementar modificaciones a los entramados de la región variable para efectuar incrementos en la unión a antígenos y la actividad antagonista sin una inmunogenicidad incrementada apreciable para el receptor. Anticuerpos manipulados de este tipo pueden tratar eficazmente un ser humano que padece enfermedades isquémicas tales como infarto de miocardio o apoplejía cerebral o tratamiento de enfermedades de insuficiencia vascular tales como diabetes. Anticuerpos de este tipo también pueden ser útiles en el diagnóstico de esos estados.

25 Esta invención se refiere también a un método para tratar rinitis alérgica, alergias, asma, eczema, linfoma, leucemia o mastocitosis sistémica en un mamífero, particularmente un ser humano, que comprende administrar una dosis eficaz de un anticuerpo monoclonal anti-SAF-2. El Acm puede incluir uno o más de los anticuerpos o anticuerpos alterados descritos en esta memoria o fragmentos de los mismos. Así, las moléculas de la presente invención, cuando se encuentran en preparados y formulaciones apropiadas para el uso terapéutico, son altamente deseable para personas susceptibles a experimentar o que experimentan rinitis alérgica, alergias, asma, eczema, linfoma, leucemia o mastocitosis sistémica.

30 Los anticuerpos monoclonales utilizados en los métodos de la invención pueden incluir uno o más de los anticuerpos o anticuerpos alterados descritos en esta memoria o fragmentos de los mismos. Preferiblemente, el anticuerpo anti-SAF-2 utilizado en los métodos de la invención tiene las características identificadoras del Acm 2C4.

35 Los anticuerpos alterados, anticuerpos y fragmentos de los mismos de esta invención también se pueden utilizar en unión con otros anticuerpos, particularmente Acms humanos reactivos con otros marcadores (epítomos) responsables del estado contra el cual se dirige el anticuerpo manipulado de la invención.

40 Los anticuerpos de la presente invención se pueden formular en composiciones farmacéuticas y administrar de la misma manera que la descrita para las proteínas maduras. Véase, *p. ej.*, la solicitud de patente internacional N° de publicación WO90/02762. Generalmente, estas composiciones contienen una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de esta invención y un soporte farmacéuticamente aceptable. Soportes adecuados son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, por ejemplo, solución salina. Alternativamente, composiciones de este tipo pueden incluir sistemas de suministro convencionales en los que se incorpora proteína de la invención. Opcionalmente, estas composiciones pueden contener otros ingredientes activos.

45 Los agentes terapéuticos de esta invención se pueden administrar por cualquier vía interna apropiada, y se pueden repetir según sea necesario, *p. ej.* tan frecuentemente como de una a tres veces al día durante 1 día hasta aproximadamente tres semanas hasta una vez por semana o una vez cada dos semanas. Preferiblemente, el anticuerpo se administra con menor frecuencia que el ligando cuando se utiliza terapéuticamente. La dosis y la duración del tratamiento se refieren a la duración relativa de las moléculas de la presente invención en la circulación del ser humano, y se pueden ajustar por un experto en la técnica dependiendo del estado que se esté tratando y de la salud general del paciente.

50 Tal como se utiliza en esta memoria, el término "farmacéutico" incluye aplicaciones veterinarias de la invención. La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad de un anticuerpo que es útil para aliviar un estado seleccionado. Estas composiciones terapéuticas de la invención se pueden administrar para imitar el efecto del ligando receptor normal.

60

El modo de administración del agente terapéutico de la invención puede ser cualquier vía adecuada que suministre el agente al hospedador. Los anticuerpos alterados, anticuerpos, anticuerpos manipulados y fragmentos de los mismos y composiciones farmacéuticas de la invención son particularmente útiles para la administración por vía parenteral, *es decir*, por vía subcutánea, intramuscular, intravenosa o intranasal.

Agentes terapéuticos de la invención se pueden preparar en forma de composiciones farmacéuticas que contienen una cantidad eficaz del anticuerpo manipulado (*p. ej.* humanizado) de la invención en calidad de un ingrediente activo en un soporte farmacéuticamente aceptable. En las composiciones de la invención se prefiere una suspensión o disolución acuosa que contenga el anticuerpo manipulado, preferiblemente tamponado a pH fisiológico, en una forma lista para su inyección. Las composiciones para la administración por vía parenteral comprenderán habitualmente una disolución del anticuerpo manipulado de la invención o un cóctel del mismo disuelto en un soporte farmacéuticamente aceptable, preferiblemente un soporte acuoso. Se puede emplear una diversidad de soportes acuosos, *p. ej.* solución salina al 0,4%, glicina al 0,3% y similares. Estas soluciones son estériles y están generalmente exentas de materia en partículas. Estas soluciones se pueden esterilizar por técnicas de esterilización convencionales, bien conocidas (*p. ej.* filtración). Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables tal como se requiera para aproximarse a las condiciones fisiológicas tales como agentes para el ajuste del pH y tampón, etc. La concentración del anticuerpo de la invención en una formulación farmacéutica de este tipo puede variar ampliamente, *es decir*, desde menos de aproximadamente 0,5%, habitualmente en o al menos en aproximadamente 1% hasta tanto como 15 ó 20% en peso, y se seleccionará principalmente en base a volúmenes de fluido, viscosidades, etc., de acuerdo con el modo particular de administración seleccionado.

Así, una composición farmacéutica de la invención para la inyección intramuscular podría prepararse para que contuviera 1 mL de agua tamponada estéril y entre aproximadamente 1 ng y aproximadamente 100 mg, *p. ej.* aproximadamente 50 ng hasta aproximadamente 30 mg o, más preferiblemente, aproximadamente 5 mg hasta aproximadamente 25 mg de un anticuerpo manipulado de la invención. Similarmente, podría constituirse una composición farmacéutica de la invención para la infusión intravenosa para que contuviera aproximadamente 250 mL de solución de Ringer estéril y aproximadamente 1 mg hasta aproximadamente 30 mg y, preferiblemente, 5 mg hasta aproximadamente 25 mg de un anticuerpo manipulado de la invención. Métodos reales para preparar composiciones administrables por vía parenteral son bien conocidos o resultarán evidentes para los expertos en la técnica y se describen con mayor detalle, por ejemplo, en "Remington's Pharmaceutical Science", 15ª ed. Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania.

Se prefiere que el agente terapéutico de la invención, cuando se encuentre en un preparado farmacéutico, esté presente en formas de dosis unitaria. La dosis terapéuticamente eficaz apropiada se puede determinar fácilmente por los expertos en la técnica. Para tratar eficazmente la anemia en un ser humano u otro animal, debería administrarse por vía parenteral, preferiblemente *i. v.* o *i.m.*, una dosis de aproximadamente 0,01 mg hasta aproximadamente 20 mg por kg de peso corporal de una proteína o un anticuerpo de esta invención. Si es necesario, una dosis de este tipo se puede repetir a intervalos de tiempo apropiados seleccionados como apropiados por un médico durante el período de respuesta.

La presente invención se puede realizar en otras formas específicas sin apartarse del espíritu ni los atributos esenciales de la misma y, por consiguiente, debería hacerse referencia a las reivindicaciones anejas más que a la descripción que antecede o a los ejemplos que siguen como indicativos del alcance de la invención.

Todas las publicaciones, que incluyen pero no se limitan a patentes y solicitudes de patente, citadas en esta memoria descriptiva o de las que esta solicitud de patente reivindica prioridad, se incorporan con ello como referencia como si cada una de las publicaciones individuales se indicara específica e individualmente a ser incorporada como referencia en esta memoria totalmente como se recoge.

Ejemplos

La presente invención se describirá ahora con referencia a los siguientes ejemplos específicos, no limitantes.

Ejemplo 1 – Generación de anticuerpos monoclonales

A. Preparación de SAF-2 Recombinante

La región codificadora de longitud completa de SAF-2 (véase la publicación de patente europea N° EP 0 924 297

A1, incorporada en esta memoria como referencia) se subclonó en el vector de expresión de mamíferos pCDN (véase Aiyar et al. (1994) Mol. Cell Biochem. 131:75-86) utilizando la PCR. La secuencia del inserto se confirmó antes de ser transfectada en células HEK293 utilizando $\text{Ca}^{++}\text{PO}_4$. Se seleccionaron clones en 500 $\mu\text{g/mL}$ de G418 y se evaluaron en cuanto a la expresión utilizando un análisis de transferencia Northern, seguido de análisis FACS.

El dominio extracelular de SAF-2 se subclonó mediante PCR y se insertó en marco con un sitio de escisión de factor Xa y la porción Fc de IgG1 humana. La secuencia se confirmó antes de que el vector fuese electroporado en células CHOEA1. Clones que se expresan establemente se seleccionaron, expandieron, evaluaron en cuanto a la expresión de Fc y se ampliaron. La proteína de fusión SAF-2/Fc se purificó a partir del sobrenadante utilizando proteína A Sepharose y una parte alícuota se escindió con Factor Xa para generar el polipéptido SAF-2 utilizado para la generación de anticuerpos.

B. Generación de Anticuerpos Monoclonales

Ratones fueron inicialmente inmunizados con SAF-2 (25 μg) en adyuvante completo de Freund y luego recibieron dos inyecciones de refuerzo (25 μg) 2 y 4 semanas más tarde. Sobre la base de un buen título de anticuerpos en suero contra SAF-2, un ratón recibió una inmunización adicional de 20 μg de SAF-2 i.v. en PBS. Se recogió el bazo cuatro días más tarde y se fusionó con células de mieloma de acuerdo con el método descrito en Zola (Zola, H. (1987) *Monoclonal antibodies: A manual of techniques*, CRD Press, Boca Raton, FL.).

C. Ensayo de Exploración de Hibridomas

Hibridomas positivos se sometieron a ensayo en cuanto a la unión en placas de microtitulación de 96 pocillos revestidas con SAF-2/Fc a razón de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ y se detectaron con IgG anti-ratón conjugada con europio. Específicamente, placas de 96 pocillos se revistieron con SAF-2/Fc (100 $\mu\text{L/pocillo}$ en PBS) mediante incubación durante una noche a 4°C. La disolución se aspiró después y los sitios de unión no específicos se bloquearon con 250 $\mu\text{L/pocillo}$ de albúmina de suero bovino al 1% (BSA) en tampón TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, Kathon al 0,02%, pH 7,4) durante 5-60 minutos a TA. Después de esta y de cada una de las siguientes etapas, la placa se lavó 4 veces en tampón de lavado (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0,05%, Kathon al 0,02%, pH 7,4). A cada uno de los pocillos se añadieron 50 μL de medio de hibridoma y 50 μL de tampón de ensayo (BSA al 0,5%, gamma globulina bovina al 0,05%, Tween 40 al 0,01%, 20 μM de ácido dietilentriaminopentaacético en tampón TBS) y se incubaron durante 60 minutos a TA en una incubadora con agitador. A cada uno de los pocillos se añadieron luego 100 μL de anticuerpo anti-ratón marcado con 0,5 $\mu\text{g/mL}$ de Eu^{3+} en tampón de ensayo. Finalmente, se añadieron 200 $\mu\text{L/pocillo}$ de potenciador (Wallac, Tuku, Finlandia) y se incubaron durante 5 minutos a TA y se midió la fluorescencia resuelta en el tiempo. Los valores positivos se volvieron a explorar mediante inmunoensayo y BIAcore y luego se clonaron por el método de dilución limitante. Se confirmó que los anticuerpos producidos por líneas celulares clonadas eran específicos para SAF-2 mediante ELISA, BIAcore y citometría de flujo utilizando líneas de células transfectadas.

D. Purificación de Acms

Anticuerpos monoclonales se purificaron mediante cromatografía ProsepA (Bio Processing, Consett, Reino Unido), respectivamente, utilizando las instrucciones del fabricante. Los anticuerpos monoclonales tenían una pureza > 95%, determinada mediante SDS-PAGE.

Ejemplo 2 – Caracterización de Anticuerpos Monoclonales

A. Isotipado de Anticuerpos Monoclonales

El anticuerpo monoclonal 2C4 utilizado en este estudio se isotipó como IgG1 kappa utilizando reactivos comercialmente disponibles (Pharmingen, San Diego, California).

B. Mediciones de Afinidad de Anticuerpos Monoclonales

La afinidad del anticuerpo monoclonal 2C4 se determinó utilizando un biosensor óptico BIAcore (Pharmacia Biosensor, Uppsala, Suecia) utilizando un caudal de 30 $\mu\text{L/min}$. Los datos de la cinética se evaluaron utilizando las relaciones descritas previamente (Karlsson, et al. (1991) *J. Immunol. Meth.* 145:229). El Acm (diluido en tampón HBS, HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 al 0,01%, pH 7,4) se inyectó sobre una superficie Fc de IgG anti-ratón de conejo, seguido de un flujo de tampón y se registró la RU. SAF-2 (diluida en tampón HBS) se inyectó luego durante 180 segundos, seguido de un flujo de tampón durante 300 segundos y se registró la RU. La superficie del chip sensor se regeneró mediante una inyección de ácido fosfórico 0,1 M. Las constantes de

velocidad (K_a) y las constantes de disociación (K_d) de unión se calcularon utilizando el software de BIAcore (Uppsala, Suecia). Los datos de este análisis indicaron que el anticuerpo monoclonal 2C4 exhibía una constante de velocidad (K_a) de $2,2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y una constante de disociación (K_d) de $4,3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, dando una constante de equilibrio calculada (KD) de $2,0 \times 10^{-10} \text{ M}$.

C. Purificación y Cultivo de Células

Eosinófilos se purificaron de la sangre periférica después de la separación por Percoll de PBMC, lisis de RBC y selección inmunomagnética negativa de neutrófilos (Hansel, T.T. et al. (1991) *J. Immunol. Methods* 145:105). La población resultante tenía un contenido en eosinófilos > 95%. En algunos experimentos, eosinófilos purificados se cultivaron durante dos días en RPMI completo que contenía FCS al 10% y 1 ó 10 ng/mL de IL-5, o 10 ó 50 ng/mL de eotaxina (Peprtech, Rocky Hill, NJ), C3a o C5a (Advanced Research Technologies) (Matsumoto, K. et al. (1998) *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 18:860). La viabilidad después de 2 días o menos de cultivo era > 80%.

El enriquecimiento de la sangre periférica en cuanto a basófilos se realizó utilizando una separación por gradiente de densidad doble de Percoll incrementando el número de basófilos hasta 3-10% del recuento total de leucocitos (Bochner, B. S. et al. (1989) *J. Immunol. Methods* 125:265) o con una selección inmunomagnética negativa adicional hasta al menos el 50%. Mastocitos derivados de la sangre del cordón umbilical humano se generaron como se ha reseñado previamente (Tachimoto, H. et al. (1997) *Int. Arch. Allergy Immunol.* 113:293; Saito, H. et al. (1996) *J. Immunol* 157: 343). Las células CD34+ purificadas se cultivaron en IMDM suplementado con 10 µg/mL de insulina, 5,5 µg/mL de transferrina, 6,7 ng/mL de selenio, 2-mercaptoetanol $5 \times 10^{-5} \text{ M}$, suero de bovino fetal al 5%, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomycin, 100 ng/mL de factor de células madre (generosamente proporcionado por Amgen, Thousand Oaks, CA) y 50 ng/mL de IL-6 (Biosource, Camarillo, CA) durante al menos 10 semanas y 1 ng/mL de IL-3 (Biosource) durante los primeros 7 días. La pureza de los mastocitos se determinó tiñendo con reactivos de May-Grünwald y Giemsa, y se alcanzó rutinariamente un 99-100% a las 14-16 semanas de cultivo. Para estos experimentos se utilizaron células recolectadas a las 16-17 semanas de cultivo. Eosinófilos derivados de la médula ósea se cultivaron como sigue: células de baja densidad de médula ósea humana tratadas con Ficoll se cultivaron en IMDM/FCS al 20% con 20 mg/mL de rhGM-CSF y 20 ng/mL de rhIL-5 (R&D Systems) a razón de $1,5 \times 10^6$ células/mL a 37°C, 5% de CO₂. Las líneas de células HL-60 y EOL3 se trataron con butirato de sodio para diferenciarlas en un fenotipo más similar a eosinófilos (Collins, S. (1987) *Blood* 70:1233).

D. Expresión de SAF-2 en Eosinófilos, Basófilos y Mastocitos Humanos

La expresión de integrinas o SAF-2 se evaluó en sangre entera anticoagulada o en células enriquecidas utilizando la inmunofluorescencia indirecta de un solo color y la citometría de flujo tal como se ha descrito previamente (Matsumoto, K. et al. (1998) *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 18:860; Bochner, B. S. et al. (1989) *J. Immunol. Methods* 125:265). También se realizó una detección dual del color de basófilos (Bochner, B. S. et al. (1989) *J. Immunol. Methods* 125:265). Los anticuerpos monoclonales utilizados incluían lo siguiente: IgG1 control, CD18 (7E4), CD51 (AMF7, todos de Coulter-Immunotech, Hialeah, FL), CD9 (Immunotech) y Acm 2C4. También se utilizó IgG anti-ratón de cabra conjugada con R-ficoeritrina (PE) o F(ab')₂ conjugado con FITC (Biosource) e IgE anti-humana de cabra policlonal conjugada con FITC (Kierkegaard y Perry, Gaithersburg, MD). Todas las muestras se fijaron en paraformaldehído al 0,1% (Sigma) y se analizaron utilizando un citómetro de flujo FACSCalibur™ (Becton Dickinson, Mountainview, CA). Se recogieron al menos 1.000 eventos y se exhibieron en una escala de 4-log proporcionando valores para la intensidad de la fluorescencia media (MFI).

SAF-2 se localizó en eosinófilos (Fig.3) y estaba ausente de otras poblaciones de células purificadas, incluidos neutrófilos, monocitos, células B y células T (datos no mostrados). La activación de eosinófilos purificados con concentraciones óptimas de eotaxina, C5a, C3a o IL-5 durante 1 hora, 24 ó 48 horas antes del análisis no alteró los niveles de expresión de SAF-2 en la superficie de la célula (datos no mostrados). Dos líneas de células, HL-60 y EOL3, de las que se ha señalado que se vuelven más similares a eosinófilos después de la diferenciación con butirato de Na durante 5 días, se examinaron en cuanto a la expresión de SAF-2 (Mayumi, M. (1992) *Leukemia & Lymphoma* 7:243). Bajo estas condiciones de cultivo, HL-60 y EOL3 fracasaron en expresar SAF-2 (datos no mostrados). De manera interesante, cuando se generan eosinófilos *in vitro* a partir de la médula ósea con IL-5, no se observó expresión alguna de SAF-2. Los eosinófilos podían identificarse el día 14 mediante tinción con CD9 (3-12% de las células) y tinción de Wright (datos no mostrados). Por lo tanto, parece ser que la expresión de SAF-2 puede ser un marcador posterior para la diferenciación de eosinófilos.

Niveles bajos pero consistentemente detectables de SAF-2 se encontraron en basófilos (Fig. 3; para el Acm 2C4, $21,1 \pm 4,0$ por ciento positivos; media $\pm$ EMT, n = 4). Mastocitos derivados de la sangre del cordón umbilical humano maduros también expresaban fuertemente SAF-2, a pesar de que el modelo de expresión era algo más heterogéneo que para los leucocitos de la sangre, debido a que los picos no eran perfectamente unimodales (Fig.

3).

E. Análisis Funcional

- 5 Se realizaron ensayos funcionales (Ca^{++} y quimiotaxis) tal como se ha descrito previamente (Macphee, C.H. et al. (1998) *J. Immunol.* 161:6273). Para determinar el papel de SAF-2 en la biología de eosinófilos, Acms anti-SAF-2 se analizaron en cuanto a su capacidad para afectar a la función de los eosinófilos. Primeramente, los anticuerpos fueron testados en cuanto a su capacidad para provocar un flujo de Ca^{++} en eosinófilos purificados ya sea por sí mismos o después de la reticulación con un segundo anticuerpo. Comparados con eotaxina, que proporcionó una
- 10 robusta respuesta de Ca^{++} , ninguno de los Acms contra SAF-2 provocaba un flujo de Ca^{++} en eosinófilos a lo largo de un transcurso en el tiempo de 15 min (datos no mostrados). Los Acms se sometieron luego a ensayo en cuanto a la capacidad de modular la respuesta de Ca^{++} a eotaxina en eosinófilos purificados. Los eosinófilos se preincubaron con anti-SAF-2 con o sin un anticuerpo reticulante y luego se estimularon con eotaxina. De nuevo, los Acms no influían en el flujo de Ca^{++} en respuesta a eotaxina. Además, los Acms se evaluaron también en un
- 15 ensayo de quimiotaxis de eosinófilos utilizando eotaxina en calidad de agente quimiotáctico; de nuevo los Acms fracasaron en la modulación de la función de eosinófilos.

Ejemplo 3 – Clonación y secuenciación de regiones de unión a antígenos de cadena pesada y ligera

- 20 Secuencias de la región V_H y V_K de longitud completa se obtuvieron para el anticuerpo monoclonal 2C4, utilizando la siguiente estrategia de clonación. Se determinaron las secuencias de aminoácidos N-terminales del Acm 2C4 V_H y V_K . En el caso de que el residuo de la región V N-terminal estuviese bloqueado con ácido piroglutámico, se realizó un desbloqueo enzimático por medio de piroglutamato aminopeptidasa.
- 25 ARN de hibridoma total se purificó, se transcribió inversamente y se amplificó por PCR. Para las cadenas pesadas, el híbrido de ARN/ADN se amplificó mediante PCR utilizando un cebador específico para CH1 de IgG de ratón y cebador degenerado basado en la secuencia de proteínas N-terminal. De manera similar, para las cadenas ligeras, el híbrido de ARN/ADN se amplificó mediante PCR utilizando un cebador C kappa de ratón y un cebador degenerado basado en la secuencia de proteínas N-terminal. Los productos de la PCR del tamaño apropiado, es
- 30 *decir*, ~ 350 se clonaron en un vector de plásmidos y se secuenciaron mediante una modificación del método de Sanger (Sanger et al. (1977) *PNAS USA* 74:5463). En cada caso, se compararon las secuencias de múltiples clones V_H y las secuencias de múltiples clones V_K para generar una secuencia de la región variable de cadena pesada consenso y una secuencia de la región variable de la cadena ligera consenso, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos deducidas de las regiones V_H y V_K del anticuerpo monoclonal 2C4 se
- 35 muestran en las Figuras 1 y 2, respectivamente.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 40 <110> SmithKline Beecham Corporation
SmithKline Beecham p.l.c.
Johns Hopkins University
- <120> Anticuerpos de sialoadhesina factor-2
- 45 <130> GH50042
- <140> desconocido
<141> 05-03-2001
- 50 <150> 60/187.595
<151> 07-03-2000
- <160> 10
- 55 <170> FastSEQ para Windows Versión 3.0
- <210> 1
<211> 360
<212> ADN
- 60 <213> Humano

<400> 1
 caggttcagc taaaggagtc aggacctggc ctggtggcgc cctcacagag cctgtccatc 60
 acttgcaactg tctctgggtt ttcattaacc atctatggtg cacactgggt tcgccagcct 120
 ccaggaaagg gtctggagtg gctgggagta atatgggctg gtggaagcac aaattataat 180
 tcggctctca tgtccagact gagcatcagc aaagacaact ccaagagcca agttttctta 240
 aaaataaaca gtctgcaaac tgatgacaca gccctgtact actgtgccag agacggtagt 300
 agcccctatt actattctat ggaatactgg ggtcaaggaa cctcagtcac cgtctcctca 360

<210> 2
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Humano

<400> 2
 Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ile Tyr Gly
 20 25 30
 Ala His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly
 35 40 45
 Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met Ser
 50 55 60
 Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys
 65 70 75 80
 Ile Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Arg
 85 90 95
 Asp Gly Ser Ser Pro Tyr Tyr Tyr Ser Met Glu Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 3
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Humano

<400> 3
 gagataatcc tgacccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtctcc 60
 ataacctgca gtgccacctc aagtgtaagt tacatgcact gggtccagca gaagccaggc 120
 acttctccca aactctggat ttatagcaca tccaacctgg cttctggagt ccctgttcgc 180
 ttcagtggca gtggatctgg gacctcttac tctctcacia tcagccgaat ggaggttgaa 240
 gatgctgccca cttattactg ccagcaaagg agtagttacc cattcacgtt cggctcgggg 300
 acaaagttgg aaataaaacg g 321

<210> 4
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Humano

<400> 4

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

5 <210> 5
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Humano

10 <400> 5
 Ile Tyr Gly Ala His
 1 5

<210> 6
 <211> 16
 15 <212> PRT
 <213> Humano

<400> 6

Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met Ser
 1 5 10 15

20 <210> 7
 <211> 12
 <212> PRT
 25 <213> Humano

<400> 7
 Asp Gly Ser Ser Pro Tyr Tyr Tyr Ser Met Glu Tyr
 1 5 10

30 <210> 8
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Humano

<400> 8

Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Met His

1 5 10

<210> 9

5 <211> 7

<212> PRT

<213> Humano

<400> 9

10

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser

1 5

<210> 10

<211> 9

15 <212> PRT

<213> Humano

<400> 10

Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Phe Thr

1 5

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Un polipéptido aislado que se une a SAF-2 humana, en donde el polipéptido comprende regiones determinantes de la complementariedad recogidas en SEQ ID NOs: 5, 6, 7, 8, 9 y 10.
- 2.- El polipéptido de la reivindicación 1, en donde el polipéptido es un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en anticuerpo monoclonal, anticuerpo manipulado, anticuerpo humanizado, Fv, Fab, Fab' y F(ab')₂.
- 10 3.- Un polinucleótido aislado que codifica el polipéptido de la reivindicación 1.
- 4.- Un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido de comprende un miembro seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4.
- 15 5.- Una línea de células de hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal de la reivindicación 2.
- 6.- Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2.
- 20 7.- Un método para detectar la presencia de una célula en una muestra, en donde la célula comprende una proteína SAF-2, comprendiendo el método:
a) exponer la muestra al polipéptido de una de las reivindicaciones 1 a 2; y
b) detectar el polipéptido de las reivindicaciones 1 a 2.
- 25 8.- El método de la reivindicación 7, en el que la célula es un eosinófilo.
- 9.- Uso de un anticuerpo monoclonal de la reivindicación 2, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de rinitis alérgica, alergias, asma, eczema, linfoma, leucemia o mastocitosis sistémica.

Figura 1

VH2C4

```

      1 0                               30
Q   V   Q   L   K   E   S   G   P   G   L   V   A   P   S
CAG GTT CAG CTA AAG GAG TCA GGA CCT GGC CTG GTG GCG CCC TCA
GTC CAA GTC GAT TTC CTC AGT CCT GGA CCG GAC CAC CGC GGG AGT
      50                               7 0                               90
Q   S   L   S   I   T   C   T   V   S   G   F   S   L   T
CAG AGC CTG TCC ATC ACT TGC ACT GTC TCT GGG TTT TCA TTA ACC
GTC TCG GAC AGG TAG TGA ACG TGA CAG AGA CCC AAA AGT AAT TGG
      1 10                               13 0
I   Y   G   A   H   W   V   R   Q   P   P   G   K   G   L
ATC TAT GGT GCA CAC TGG GTT CGC CAG CCT CCA GGA AAG GGT CTG
TAG ATA CCA CGT GTG ACC CAA GCG GTC GGA GGT CCT TTC CCA GAC
      150                               1 70
E   W   L   G   V   I   W   A   G   G   S   T   N   Y   N
GAG TGG CTG GGA GTA ATA TGG GCT GGT GGA AGC ACA AAT TAT AAT
CTC ACC GAC CCT CAT TAT ACC CGA CCA CCT TCG TGT TTA ATA TTA
      19 0                               210
S   A   L   M   S   R   L   S   I   S   K   D   N   S   K
TCG GCT CTC ATG TCC AGA CTG AGC ATC AGC AAA GAC AAC TCC AAG
AGC CGA GAG TAC AGG TCT GAC TCG TAG TCG TTT CTG TTG AGG TTC
      2 30                               25 0                               270
S   Q   V   F   L   K   I   N   S   L   Q   T   D   D   T
AGC CAA GTT TTC TTA AAA ATA AAC AGT CTG CAA ACT GAT GAC ACA
TCG GTT CAA AAG AAT TTT TAT TTG TCA GAC GTT TGA CTA CTG TGT
      2 90                               31 0
A   L   Y   Y   C   A   R   D   G   S   S   P   Y   Y   Y
GCC CTG TAC TAC TGT GCC AGA GAC GGT AGT AGC CCC TAT TAC TAT
CGG GAC ATG ATG ACA CGG TCT CTG CCA TCA TCG GGG ATA ATG ATA
      330                               3 50
S   M   E   Y   W   G   Q   G   T   S   V   T   V   S   S
TCT ATG GAA TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC GTC TCC TCA
AGA TAC CTT ATG ACC CCA GTT CCT TGG AGT CAG TGG CAG AGG AGT

```

Figura 2

Vk2C4

```

      1 0
E   I   I   L   T   Q   S   P   A   I   M   S   A   S   P
GAG ATA ATC CTG ACC CAG TCT CCA GCA ATC ATG TCT GCA TCT CCA
CTC TAT TAG GAC TGG GTC AGA GGT CGT TAG TAC AGA CGT AGA GGT
      50
G   E   K   V   S   I   T   C   S   A   T   S   S   V   S
GGG GAG AAG GTC TCC ATA ACC TGC AGT GCC ACC TCA AGT GTA AGT
CCC CTC TTC CAG AGG TAT TGG ACG TCA CGG TGG AGT TCA CAT TCA
      1 10
Y   M   H   W   F   Q   Q   K   P   G   T   S   P   K   L
TAC ATG CAC TGG TTC CAG CAG AAG CCA GGC ACT TCT CCC AAA CTC
ATG TAC GTG ACC AAG GTC GTC TTC GGT CCG TGA AGA GGG TTT GAG
      150
W   I   Y   S   T   S   N   L   A   S   G   V   P   V   R
TGG ATT TAT AGC ACA TCC AAC CTG GCT TCT GGA GTC CCT GTT CGC
ACC TAA ATA TCG TGT AGG TTG GAC CGA AGA CCT CAG GGA CAA GCG
      19 0
F   S   G   S   G   S   G   T   S   Y   S   L   T   I   S
TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGG ACC TCT TAC TCT CTC ACA ATC AGC
AAG TCA CCG TCA CCT AGA CCC TGG AGA ATG AGA GAG TGT TAG TCG
      2 30
R   M   E   A   E   D   A   A   T   Y   Y   C   Q   Q   R
CGA ATG GAG GCT GAA GAT GCT GCC ACT TAT TAC TGC CAG CAA AGG
GCT TAC CTC CGA CTT CTA CGA CGG TGA ATA ATG ACG GTC GTT TCC
      2 90
S   S   Y   P   F   T   F   G   S   G   T   K   L   E   I
AGT AGT TAC CCA TTC ACG TTC GGC TCG GGG ACA AAG TTG GAA ATA
TCA TCA ATG GGT AAG TGC AAG CCG AGC CCC TGT TTC AAC CTT TAT

K   R
AAA CGG
TTT GCC

```

Figura 3

