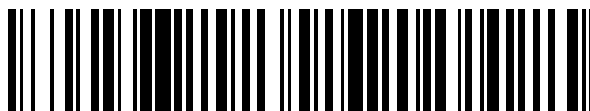


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 478 242**

51 Int. Cl.:

C07K 16/42 (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.03.2008** **E 08744179 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.04.2014** **EP 2132230**

54 Título: **Anticuerpos anti IgE apoptóticos que se unen con el IgE unido a membrana**

30 Prioridad:

22.03.2007 US 896339 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.07.2014

73 Titular/es:

GENENTECH, INC. (100.0%)
1 DNA WAY
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080, US

72 Inventor/es:

WU, LAWREN;
BALAZS, MERCEDESZ;
BRIGHTBILL, HANS;
CHAN, ANDREW;
CHEN, YVONNE;
CHUNTHARAPAI, ANAN;
DENNIS, MARK y
WONG, TERENCE

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 478 242 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 anti IgE apoptóticos que se unen con el IgE unido a membrana

5 Retroactividad

La invención reivindica el beneficio de prioridad según 35 U.S.C. § 119 (e) del documento U.S.S.N. 60/896.339, presentado el 22 de marzo de 2007.

10 **Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

La presente invención se refiere a anticuerpos anti IgE apoptóticos, ácidos nucleicos que los codifican, composiciones terapéuticas de los mismos, y su uso en el tratamiento de trastornos mediados por IgE.

Descripción de la técnica relacionada

La alergia se refiere a ciertas enfermedades en las que respuestas inmunitarias a antígenos ambientales provocan inflamación tisular y disfunción orgánica. Las características clínicas de cada enfermedad alérgica reflejan la respuesta inflamatoria inducida de forma inmunológica en el órgano o tejido implicado. Estas características son generalmente independientes de las propiedades químicas o físicas del antígeno. La diversidad de respuestas alérgicas surge de la aplicación de diferentes rutas efectoras inmunológicas, cada una de las cuales genera un patrón único de inflamación.

La alergia es común en todo el mundo. La predilección de enfermedades específicas, sin embargo, varía entre diferentes grupos de edad, sexos y razas. La prevalencia de sensibilidad a alérgenos específicos se determina tanto por predilección genética como por los factores geográficos y culturales que son responsables de la exposición al alérgeno. Un estado clínico de alergia afecta solamente a algunos individuos que se encuentran con cada alérgeno. La aparición de enfermedad alérgica tras la exposición a un alérgeno requiere no solamente "sensibilización" anterior sino también otros factores que determinan la localización de la reacción en un órgano particular.

Un proceso biológico que precede a la enfermedad de alergia tras la exposición a alérgeno induce una respuesta inmunitaria conocida como "sensibilización" o la fase de sensibilización. Una vez que se produce la sensibilización, un individuo no se hace sintomático hasta que haya una exposición posterior al alérgeno. El efecto de la sensibilización también se conoce como memoria inmunitaria.

Una de las rutas primarias por las que se induce una inflamación es mediante la inmunoglobulina E (IgE). IgE desempeña un papel central en las alergias según su papel como receptor de alérgeno en la superficie de mastocitos y basófilos. Los anticuerpos IgE se fijan a la superficie de mastocitos y basófilos en la parte Fc de la molécula con un receptor de superficie celular de alta afinidad, llamado FcεRI. La reacción alérgica se inicia cuando la molécula de alérgeno polivalente se une con anticuerpos que ocupan estos receptores. El resultado es un enlace del FcεRI, que a su vez señala de forma intracelular provocando la liberación y activación de mediadores de inflamación: histamina, leucotrienos, factores quimiotácticos, factor activador de plaquetas y proteínas. Estos mediadores activados actúan localmente y provocan aumento de la permeabilidad vascular, vasodilatación, contracción del músculo liso y secreción de glándulas mucosas. Dichos acontecimientos se denominan clínicamente la *fase inmediata o temprana*, y se producen en los primeros 15-30 minutos después de la exposición al alérgeno. Durante las 12 horas siguientes hay una infiltración tisular progresiva de las células inflamatorias, que avanzan desde neutrófilos a eosinófilos a células mononucleares en respuesta a otros mediadores químicos no completamente entendidos. Este periodo de tiempo 6-12 horas después de la exposición a alérgeno se designa la *fase tardía* y se caracteriza por manifestaciones clínicas de inflamación celular. Ya que se producen reacciones de fase tardía, especialmente en el pulmón, en ausencia de reacciones de fase temprana, aún no se entiende completamente si la reacción de fase tardía está necesariamente mediada por IgE.

IgE existe en una forma unida a membrana y en una forma secretada. Estas formas distintas parecen ser variantes de corte y empalme. Previos enfoques para conseguir efecto terapéutico regulando negativamente IgE que se dirige principalmente a la forma secretada (por ejemplo, omalizumab XOLAIR®), para prevenir o desmontar "montaje" adicional del sistema inmunitario. La forma secretada de IgE es una forma más corta, esencialmente la región Fc termina en el dominio CH4 (Figura 1), mientras que la forma más larga incluye restos C terminales adicionales incluyendo los péptidos codificados por los exones conocidos como M1/M1' y M2. Aunque algunos han indicado dos formas distintas de IgE unido a membrana, tanto con como sin un segmento de 52 aminoácidos conocido como M1' [Batista *et al.*, J. Exp. Med. 184: 2197-2205 (1996)], los Solicitantes fueron incapaces de verificar que ninguna forma unida a membrana carezca de este segmento M1'. La terapia convencional con anticuerpos anti IgE, que se unen con la forma secretada de IgE, da como resultado reducción IgE en suero libre, pero no en suero total. Casale *et al.*, J. Allergy Clin. Immunol. 100 (1): 110-121 (1997).

Chen *et al.* (2002) *International Archives of Allergy and Immunology* 128(4), 315-324, Chang (2006) *Allergy and Asthma Proceedings: The Official Journal of Regional and State Allergy Societies* 27(2), S7-14, Chen *et al.* (2001) *Faseb Journal* 15(5), A1018 y Poggianella *et al.* (2006) *Journal of Immunology* 177(6), 3597-3605 se refieren, en general, al segmento M1' de IgE. Chang (2006) describe el dominio de 52 aminoácidos localizado entre el dominio CH4 y el péptido de anclaje de membrana C terminal de IgE, denominado el dominio Cépsilon_mX. Por separado, Chen *et al.* (2002) y Chen *et al.* (2001) describen anticuerpos que se unen con este dominio, generalmente o en una región próxima al extremo C terminal. Por separado, Poggianella *et al.* (2006) indica que este dominio, denominado el dominio próximo a membrana extracelular (EMPD), puede estar implicado en la apoptosis.

Se ha indicado además que en ausencia de señal de antígeno, los receptores de linfocitos B (es decir, inmunoglobulinas) que están entrecruzados son propensos a apoptosis.

Resultar sorprendente que los Solicitantes han descubierto que la dirección de una región N terminal de segmento M1' de IgE con anticuerpos anti IgE puede dar como resultado la inducción de apoptosis de linfocito B. Dado que la descendencia de linfocitos B activados puede dar como resultado células plasmáticas que realizan y secretan la forma secretada de IgE, el agotamiento de linfocitos B productores de IgE mediante apoptosis ofrece un nuevo enfoque terapéutico para el tratamiento de alergia.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona anticuerpos anti IgE apoptóticos, o fragmentos funcionales de los mismos, y su uso en el tratamiento de trastornos mediados por IgE como se definen en las reivindicaciones. La invención proporciona además composiciones, métodos para inhibir la producción y secreción de IgE desde linfocitos B, y métodos para agotar específicamente linfocitos B productores de IgE, y reducir IgE en suero total como se define en las reivindicaciones.

En una realización la invención proporciona un anticuerpo anti IgE/M1' que se une específicamente con el segmento M1' de IgE y que induce la apoptosis en linfocitos B que expresan IgE como se define en las reivindicaciones. En un aspecto específico, el anticuerpo agota específicamente los linfocitos B productores de IgE. En otro aspecto específico, el anticuerpo reduce IgE en suero total. En otro aspecto específico más, el anticuerpo reduce tanto IgE en suero total como en suero libre. En un aspecto específico adicional, el IgE en suero es específico de alérgeno. En un aspecto específico adicional, el anticuerpo se une con IgE que es de origen humano, de mono Rhesus y de mono cynomolgus. En un aspecto específico adicional, el anticuerpo es quimérico. Es un aspecto específico adicional, el anticuerpo está humanizado. En un aspecto adicional, el anticuerpo es humano.

En otra realización, la invención proporciona un anticuerpo anti IgE/M1' que se une específicamente con uno cualquiera de los epítomos de M1' correspondientes a los péptidos identificados en la Figura 5. En un aspecto específico, el anticuerpo se une específicamente con el mismo epítipo que el que se une con un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en: 47H4, 7A6, 26A11, 47H4v5, 7A6v1 y 26A11v6. En otro aspecto específico, el anticuerpo se une con un epítipo correspondiente a un péptido seleccionado del grupo que consiste en: péptido 4 (SEC ID N°: 8), péptido 5 (SEC ID N°: 9), péptido 7 (SEC ID N°: 11) o péptido 8 (SEC ID N°: 12). En otro aspecto específico más, el anticuerpo se une con el péptido 4 (SEC ID N°: 8).

En otra realización más, la invención proporciona un epítipo de M1' de IgE seleccionado del grupo que consiste en: péptido 4 (SEC ID N°: 8), péptido 5 (SEC ID N°: 9), péptido 7 (SEC ID N°: 11) o péptido 8 (SEC ID N°: 12) como se define en las reivindicaciones. En un aspecto específico, el péptido M1' es el péptido 4 (SEC ID N°: 8).

En una realización adicional, la invención proporciona un anticuerpo anti IgE que se une específicamente con un segmento M1' de IgE con una afinidad de unión de Scatchard por IgE humano que es equivalente a la del anticuerpo murino anti IgE/M1' 47H4 o variante humanizada del mismo como se define en las reivindicaciones. En un aspecto específico, la afinidad es equivalente a la afinidad de unión de 47H4. En otro aspecto específico, la afinidad es entre 0,30 y 0,83 nm. En otro aspecto específico más, la afinidad es equivalente a la afinidad de unión de 47H4v5. En un aspecto específico adicional, la afinidad es de aproximadamente 1,5 nm.

En una realización adicional más, la invención proporciona un anticuerpo anti IgE/M1' que comprende las HVR de cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo que aparecen en cualquiera de las Figuras 6A-6F como se define en las reivindicaciones. En un aspecto específico, el anticuerpo comprende además las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de las secuencias de anticuerpo que aparecen en cualquiera de las Figuras 6A-6F. En otro aspecto específico, el anticuerpo comprende las cadenas pesadas y ligeras de longitud completa de los anticuerpos que aparecen en cualquiera de las Figuras 6A-6F. En otro aspecto específico más, las cadenas pesadas y ligeras de las secuencias de anticuerpo aparecen en cualquiera de las Figuras 6A-6F. En un aspecto específico adicional, el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en: 26A11, 26A11 v1-16, 7A6, 7A6v1, 47H4, 47H4v1-6. En un aspecto específico adicional más, el anticuerpo es 47H4v5. En un aspecto específico adicional más, el anticuerpo está afucosilado.

En una realización adicional más, la invención proporciona una composición que comprende un anticuerpo anti IgE/M1' que comprende las HVR de cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo que aparece en cualquiera de las Figuras 6A-6F en combinación con al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable como se define en las reivindicaciones. En un aspecto específico, el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en: 26A11, 26A11v1-16, 7A6, 7A6v1, 47H4, 47H4v1-6. En otro aspecto específico, el anticuerpo es 47H4v5. En otro aspecto específico más, el anticuerpo está afucosilado.

En una realización adicional más, la invención proporciona una composición que comprende un anticuerpo anti IgE/M1' que comprende las HVR de cadena ligera y cadena pesada del anticuerpo que aparecen en cualquiera de las Figuras 8-13 en combinación con uno o más fármacos seleccionados del grupo que consiste en: anticuerpo anti IgE, antihistamina, broncodilatador, glucocorticoide, AINE, antagonista de TNF, antagonista de integrina, agente inmunosupresor, antagonista de IL-4, antagonista de IL-13, antagonista doble de IL-4/IL-13, DMARD, anticuerpo que se une con un marcador de superficie de linfocitos B y antagonista de BAFF como se define en las reivindicaciones. En un aspecto específico, la composición comprende además al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En una realización adicional más, la invención proporciona ácido nucleico aislado que codifica las HVR de cadena pesada del anticuerpo anti IgE/M1' que aparece en cualquiera de las Figuras 6A-6F como se define en las reivindicaciones. En un aspecto específico, el ácido nucleico aislado comprende además ácido nucleico que codifica las HVR de cadena ligera del anticuerpo que aparecen en cualquiera de las Figuras 6A-6F. En otro aspecto específico, el anticuerpo es quimérico. En otro aspecto específico más, el anticuerpo está humanizado. En un aspecto adicional, el anticuerpo es humano. En un aspecto específico adicional más, el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en: 26A11, 26A11 v1-16, 7A6, 7A6v1, 47H4, 47H4v1-6. En un aspecto específico adicional más, el anticuerpo es 47H4v5. En un aspecto específico adicional más, el anticuerpo está afucosilado. En un aspecto adicional más, el ácido nucleico comprende además un vector adecuado para la expresión del ácido nucleico como se define en las reivindicaciones. En un aspecto específico adicional más, el vector comprende además una célula hospedadora adecuada para la expresión del ácido nucleico como se define en las reivindicaciones. En un aspecto específico adicional más, la célula hospedadora es una célula eucariota o una célula procariota. En un aspecto específico adicional más, la célula eucariota es una célula de mamífero, tal como Ovario de Hámster Chino (CHO).

En una realización adicional más, la invención proporciona un proceso para preparar un anticuerpo anti IgE/M1' o fragmento funcional del mismo, que se une específicamente con un segmento M1' de IgE, que comprende cultivar una célula hospedadora que contiene ácido nucleico que codifica dicho anticuerpo o fragmento en una forma adecuada para expresión, en condiciones adecuadas para producir dicho anticuerpo o fragmento, y recuperar el anticuerpo o fragmento como se define en las reivindicaciones.

En una realización adicional más, la invención proporciona un artículo de fabricación que comprende un recipiente que incluye una composición desvelada en el presente documento y un prospecto que indica el uso para el tratamiento de un trastorno mediado por IgE como se define en las reivindicaciones. En un aspecto específico, el artículo de fabricación es un frasco. En otro aspecto específico, el artículo de fabricación es una jeringa precargada. En otro aspecto específico más, la jeringa precargada está contenida además dentro de un dispositivo de inyección. En un aspecto específico adicional, el dispositivo de inyección es un autoinyector.

En una realización adicional más, la invención proporciona un anticuerpo de la invención para su uso en un método para agotar específicamente los linfocitos B productores de IgE que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti IgE/M1' que se une específicamente con el segmento M1' de IgE e induce la apoptosis en linfocitos B que expresan IgE como se define en las reivindicaciones. En un aspecto específico, el anticuerpo comprende las HVR de cadena pesada y ligera del anticuerpo que aparecen en cualquiera de las Figuras 6A-6F. En otro aspecto específico, el método reduce el IgE en suero total. En otro aspecto específico más, el método reduce tanto IgE en suero libre como en suero total. En un aspecto específico adicional, el IgE en suero es específico de alérgeno. En un aspecto específico adicional más, el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en: 26A11, 26A11 v1-16, 7A6, 7A6v1, 47H4, 47H4v1-6. En un aspecto específico adicional más, el anticuerpo es 47H4v5. En un aspecto específico adicional más, el anticuerpo tiene actividad ADCC.

En una realización adicional más, la invención proporciona un anticuerpo de la invención para su uso en un método para tratar un trastorno mediado por IgE que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti IgE/M1' que se une específicamente con el segmento M1' de IgE e induce apoptosis en linfocitos B que expresan IgE como se define en las reivindicaciones. En un aspecto específico, el anticuerpo agota específicamente linfocitos B productores de IgE. En otro aspecto específico, el anticuerpo reduce IgE en suero total. En otro aspecto específico más, el anticuerpo reduce tanto IgE total como libre. En un aspecto específico adicional, el IgE en suero es específico de alérgeno. En un aspecto específico adicional más, el anticuerpo comprende las HVR de cadena pesada y ligera del anticuerpo que aparecen en cualquiera de las Figuras 6A-6F. En un aspecto específico adicional más, el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en: 26A11, 26A11 v1-16, 7A6, 7A6v1, 47H4, 47H4v1-6. En un aspecto específico adicional, el anticuerpo es 47H4v5. En un aspecto específico adicional más, el anticuerpo tiene actividad ADCC. En un aspecto específico adicional más, el trastorno mediado por IgE se selecciona del grupo que consiste en: rinitis alérgica, asma (por ejemplo asma alérgica y asma no alérgica), dermatitis atópica, gastroenteropatía alérgica, hipersensibilidad (por ejemplo, anafilaxis, urticaria, alergias

alimentarias etc.), aspergilosis broncopulmonar alérgica, enfermedades parasitarias, cistitis intersticial, síndrome de hiper IgE, ataxia telangiectasia, síndrome de Wiskott-Aldrich, linfoplasia atímica, mieloma de IgE y reacción de injerto contra hospedador. En un aspecto específico adicional más, el trastorno mediado por IgE es alergia alimentaria, anafilaxis, dermatitis de contacto y púrpura alérgica.

5 En una realización adicional más, la invención proporciona un anticuerpo de la invención para su uso en un método para tratar un trastorno mediado por IgE que comprende administrar una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti IgE/M1' que se une específicamente con el segmento M1' de IgE e induce apoptosis en linfocitos B que expresan IgE en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un fármaco seleccionado del grupo que consiste en: anticuerpo anti IgE, antihistamina, broncodilatador, glucocorticoide, AINE, descongestionante, supresor de tos, analgésico, antagonista de TNF, antagonista de integrina, agente inmunosupresor, antagonista de IL-4, antagonista de IL-13, antagonista doble de IL-4/IL-13, DMARD, anticuerpo que se une con un marcador de superficie de linfocitos B y antagonista de BAFF como se define en las reivindicaciones. En un aspecto específico, el anticuerpo agota específicamente los linfocitos B productores de IgE. En otro aspecto específico, el anticuerpo reduce IgE en suero total. En otro aspecto específico más, el anticuerpo reduce tanto IgE total como libre. En un aspecto específico adicional, el IgE en suero es específico de alérgeno. En un aspecto específico adicional, el anticuerpo comprende las HVR de cadena pesada y ligera del anticuerpo que aparecen en cualquiera de las Figuras 6A-6F. En un aspecto específico adicional más, el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en: 26A11, 26A11 v1-16, 7A6, 7A6v1, 47H4, 47H4v1-6. En un aspecto específico adicional más, el anticuerpo es 47H4v5. En un aspecto específico adicional más, el anticuerpo tiene actividad ADCC.

25 En una realización adicional más, la invención proporciona un anticuerpo de la invención para su uso en un método para tratar un trastorno mediado por IgE que comprende un régimen de tratamiento combinado de administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti IgE/M1' que se une específicamente con el segmento M1' de IgE e induce apoptosis en linfocitos B que expresan IgE, antes de, simultáneamente con o después de la administración de un método conocido de tratamiento para trastornos alérgicos como se definen en las reivindicaciones. En un aspecto específico, la combinación comprende la administración de un anticuerpo anti IgE, antihistamínico, un broncodilatador, un glucocorticoide, un fármaco antiinflamatorio no esteroideo, un inmunosupresor, antagonista de IL-4, antagonista de IL-13, antagonista doble de IL-4/IL-13, un descongestionante, un supresor de tos o un analgésico. En otro aspecto específico, el anticuerpo anti IgE/M1' se administra en combinación con un régimen de tratamiento de desensibilización de alérgeno. En un aspecto específico, el anticuerpo agota específicamente linfocitos B productores de IgE. En otro aspecto específico, el anticuerpo reduce IgE en suero total. En otro aspecto específico más, el anticuerpo reduce tanto IgE total como libre. En un aspecto específico adicional, el IgE en suero es específico de alérgeno. En un aspecto específico adicional más, el anticuerpo comprende las HVR de cadena pesada y ligera del anticuerpo que aparecen en cualquiera de las Figuras 6A-6F. En un aspecto específico adicional más, el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en: 26A11, 26A11 v1-16, 7A6, 7A6v1, 47H4, 47H4v1-6. En un aspecto específico adicional más, el anticuerpo es 47H4v5. En un aspecto específico adicional más, el anticuerpo tiene actividad ADCC.

40 En una realización adicional más, la invención proporciona un anticuerpo de la invención para su uso en un método para prevenir la producción de IgE inducida por alérgeno, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti IgE/M1' que se une específicamente con el segmento M1' de IgE e induce la apoptosis en linfocitos B que expresan IgE como se define en las reivindicaciones. En un aspecto específico, el anticuerpo comprende las HVR de cadena pesada y ligera del anticuerpo que aparece en cualquiera de las Figuras 6A-6F. En otro aspecto específico, el método agota específicamente linfocitos B productores de IgE. En otro aspecto específico más, el método reduce IgE en suero total. En otro aspecto específico adicional, el método reduce IgE tanto en suero libre como suero total. En un aspecto específico adicional, el IgE en suero es específico de alérgeno. En un aspecto específico adicional más, el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en: 26A11, 26A11 v1-16, 7A6, 7A6v1, 47H4, 47H4v1-6. En un aspecto específico adicional más, el anticuerpo es 47H4v5. En un aspecto específico adicional más, el anticuerpo tiene actividad ADCC.

55 En una realización adicional más, la invención proporciona un anticuerpo de la invención para su uso en un método para reducir la producción de IgE inducida por alérgeno, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti IgE/M1' que se une específicamente con el segmento M1' de IgE e induce la apoptosis en linfocitos B que expresan IgE como se define en las reivindicaciones. En un aspecto específico, el anticuerpo comprende las HVR de cadena pesada y ligera del anticuerpo que aparecen en cualquiera de las Figuras 6A-6F. En otro aspecto específico, el método agota específicamente linfocitos B productores de IgE. En otro aspecto específico más, el método reduce IgE en suero total. En otro aspecto específico adicional, el método reduce IgE tanto en suero libre como suero total. En un aspecto específico adicional más, el IgE en suero es específico de alérgeno. En un aspecto específico adicional más, el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en: 26A11, 26A11 v1-16, 7A6, 7A6v1, 47H4, 47H4v1-6. En un aspecto específico adicional más, el anticuerpo es 47H4v5. En un aspecto específico adicional más, el anticuerpo tiene actividad ADCC.

65 En una realización adicional más, la invención proporciona una composición útil para cualquiera de los métodos previamente descritos como se ha definido en las reivindicaciones.

En una realización adicional más, la invención proporciona el uso de una composición para cualquiera de los métodos descritos anteriormente como se definen en las reivindicaciones.

En una realización adicional más, la invención proporciona un hibridoma murino depositado en la ATCC el 21 de marzo de 2007 con una designación seleccionada del grupo que consiste en: 7A6.18, IC11.10.20, 47G4.6.2, 47H4.12.10, 42H4.6.9, 42A5.20.11, 26A11.6.5, 51D2.22.15, 45C1.6.14, 26B11.3.12, 28E9.12.9. En un aspecto específico, la invención proporciona un anticuerpo secretado por el hibridoma depositado.

En una realización adicional más, la invención proporciona un animal transgénico que expresa el segmento M1' humano de IgE como se define en las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

Las **Figuras 1A-B** es un alineamiento de regiones de cadena constante seleccionadas de IgE del ser humano (SEC ID N°: 1), mono rhesus (SEC ID N°: 2) y mono cynomolgus (SEC ID N°: 3). Se muestran las localizaciones aproximadas de los dominios CH2, CH3, CH4, M1', transmembrana e intracelular.

Las **Figuras 2A-2C** son representaciones de Scatchard de FACS que muestran la especificidad de los diversos anticuerpos anti M1'. La **Figura 2A-1 a 2A-6** muestra la unión contra la forma corta de IgE (sin M1'), mientras que las **Figuras 2B-1 a 2B-6** muestran unión contra la forma larga (con M1'). Las **Figuras 2C-1 a 2C-6** muestran unión contra IgE expresado por la línea celular U266. La curva sombreada muestra fluorescencia intensiva del Ab de control, mientras que la curva no sombreada muestra fluorescencia relativa del anticuerpo ensayado. Las **Figuras 2D-F** muestran las especificidades de unión de los anticuerpos anti IgE/M1' murinos 47H4, 26A11 y 7A6. La **Figura 2D** muestra que 47H4 se une con IgE/M1' humano, de rhesus y de cyno, pero no con IgE sin M1'. La **Figura 2E** muestra que 47H4 se unió con U266, mientras que 26A11 y 7A6 no. La **Figura 2F** muestra que 47H4 y 7A6 se unen con M1' tanto de Rhesus como de Cyno, mientras que 26A11 se une solamente con Rhesus. Las **Figuras 2G-1** muestran las especificidades de unión de los anticuerpos anti IgE/M1' humanizados 47H4v5, 26A11v6 y 7A6v1. La **Figura 2G** muestra que las tres variantes humanizadas 47H4v5, 26A11v6 y 7A6v1 son específicas de IgE-M1', pero no IgE sin M1'. La **Figura 2H** muestra que las variantes 47H4v5 y 26A11v6 (pero no 7A6v1) se unen con U266. La **Figura 2I** muestra que 47H4v5 y 7A6v1 se unen con M1' de rhesus y de cyno, mientras que 26A11v6 se une solamente con M1' de rhesus.

Las **Figuras 3A-L** son representaciones de FACS que muestran las afinidades de unión relativas de los diversos anticuerpos anti M1' usando las diluciones en serie indicadas en la **Figura 3M**. La **Figura 3N** muestra las afinidades relativas para cada anticuerpo. La **Figura 3O** resume las afinidades de los anticuerpos murinos 47H4, 26A11 y 7A6 como se mide por análisis de Scatchard frente a M1' humano, de Rhesus y de Cyno. A no ser que se indique de otro modo, los números indicados son las medias. La **Figura 3P** resume las afinidades de las variantes humanizadas indicadas de los anticuerpos 47H4 y 26A11 como se mide por análisis de Scatchard frente a M1' humano, de Rhesus y de Cyno.

Las **Figuras 4A-D** muestran un estudio de unión/bloqueo relativo de los anticuerpos anti M1'. Las **Figuras 4A-1 a 4A-20** son representaciones de FACS que muestran anticuerpos que bloquean o bloquean parcialmente la unión. La **Figura 4B** es una representación bidimensional que muestra la capacidad relativa para bloquear la unión de los otros anticuerpos (usando parcial o completamente una relación molar 1:1). La **Figura 4C** es una representación bidimensional que está más centrada en los anticuerpos indicados específicamente y en la que el estudio de bloqueo se repitió con una relación molar de 10:1. La **Figura 4D** es un esquema que muestra los agrupamientos resultantes de los estudios de unión/bloqueo de epítomos.

Las **Figuras 5A-C** muestra estudios de unión de epítomos realizados usando 47H4, 7A6 y 26A11. La **Figura 5A** muestra el segmento M1' incluyendo restos N y C terminales adyacentes (SEC ID N°: 3), y péptidos M1' 1-15, (SEC ID N°: 5-19), respectivamente, usados para determinar la unión de epítomos. Las **Figuras 5B y 5D** muestran que los anticuerpos murinos parentales 47H4 se une con el epítopo 4, 7A6 se une con el péptido 4 y 5 y 26A11 se une con los péptidos 7 y 8. Las **Figuras 5C y 5E** muestran que las variantes humanizadas 47H4v5 se une con el péptido 4, mientras que 7A6v1 se une con los péptidos 4 y 5 y 26A11v6 se une con los péptidos 7 y 8, conservando de este modo las especificidades epitópicas de los anticuerpos murinos parentales.

Las **Figuras 6A-F** muestran las secuencias de cadena ligera y pesada variables de los anticuerpos murinos 26A11, 7A6 y 47H4 y diversas variantes humanizadas de los mismos. Las posiciones se numeran de acuerdo con Kabat y se encuadran las regiones hipervariables que se injertaron en la red de consenso variable (Kappa I para cadena ligera, subgrupo III para pesada). La **Figura 6A** muestra, en relación con la cadena ligera kappa I humana (SEC ID N°: 20), la cadena ligera variable de 26A11 (SEC ID N°: 21) y variantes humanizadas 1,4 (SEC ID N°: 22), variantes 2,5 (SEC ID N°: 23), variantes 3,6 (SEC ID N°: 24), variantes 13,15 (SEC ID N°: 25) y variantes 14,16 (SEC ID N°: 26). La **Figura 6B** muestra, en relación con la cadena ligera kappa I humana (SEC ID N°: 20), la cadena ligera variable de 7A6 (SEC ID N°: 27) y variante humanizada I (SEC ID N°: 28). La **Figura 6C** muestra, en relación con la cadena ligera kappa I humana (SEC ID N°: 20), la cadena ligera variable de 47H4 (SEC ID N°: 29) y variantes humanizadas 1,3 (SEC ID N°: 30) y variantes 2, 4-6 (SEC ID N°: 31). La **Figura 6D**

muestra, en relación con la cadena pesada humana III (SEC ID N°: 32), la cadena pesada variable de 26A11 (SEC ID N°: 33) y variantes humanizadas 1-3, 13, 14 (SEC ID N°: 34) y variantes 4-6, 15, 16 (SEC ID N°: 35). La **Figura 6E** muestra, en relación con la cadena pesada humana (SEC ID N°: 32), la cadena pesada variable de 7A6 (SEC ID N°: 36) y la variante humanizada 1 (SEC ID N°: 37). La **Figura 6F** muestra, en relación con la

cadena pesada III humana (SEC ID N°: 32), la cadena pesada variable de 47H4 (SEC ID N°: 38), y variantes humanizadas 1,2 (SEC ID N°: 39), variantes 3-4 (SEC ID N°: 40), variante 5 (SEC ID N°: 41) y variante 6 (SEC ID N°: 42).

Las **Figuras 7A-G** muestran la actividad apoptótica de los anticuerpos anti M1' parentales en células Daudi transfectadas con IgE-M1'. La **Figura 7A** es una representación de FACS que muestra esencialmente que IgM se expresa a un nivel mayor que IgE. La **Figura 7B** muestra el efecto de entrecruzar anticuerpos anti IgM [F(ab')₂] y la aplicación de camptotecina, en la inducción de la apoptosis, respectivamente. Las células que tienen tinción positiva para anexina, pero negativa para PI están muriendo, mientras que las células que tienen tinción positiva tanto para anexina como para PI están muertas. La **Figura 7C** es una representación gráfica de la apoptosis observada total, en la que la barra clara muestra las células anexina-(+) y PI(-), mientras que la barra oscura muestra anexina-(+) y PI(+). Las **Figuras 7D-7G** son representaciones gráficas de apoptosis inducida por anti M1' a concentraciones de 25, 10, 1, 0,1, 0,01 y 0,001 mg/ml. La **Figura 7D** muestra los resultados de la aplicación de los anticuerpos de M1' del grupo epitópico A1, incluyendo 7A6, 47H4, 47G4, 42A5, 42H4 (junto con los controles MAE-11 y GP120) sin entrecruzamiento. La **Figura 7E** muestra los resultados de la aplicación de los anticuerpos de M1' del grupo epitópico A2, incluyendo IC11, 26A11, 51D2, 45C1, y el grupo epitópico B/C, incluyendo 26B11 y 28E9 sin entrecruzamiento. La **Figura 7F** muestra el grupo epitópico A1 con entrecruzamiento y la **Figura 7G** muestra el grupo epitópico A2 y B/C con entrecruzamiento.

Las **Figuras 8A-B** muestran la actividad apoptótica de las variantes anti M1' humanizadas en células Daudi transfectadas con IgE-M1' tratadas con diversas variantes de anticuerpo anti M1' humanizadas a concentraciones de 25, 10, 1, 0,1, 0,01 y 0,001 µg/ml. La **Figura 8A** muestra que las variantes humanizadas 47H4v5, 26A11v6 y 7A6v1 inducen apoptosis en el intervalo de 30-40 % a los mayores niveles de concentración (es decir, variantes 47H4 y 26A11 10-25 µg/ml, variante 7A6 1, 10 y 25 µg). La **Figura 8B** muestra la actividad apoptótica del mismo anticuerpo en células Daudi transfectadas con IgE-M1' que se tratan en presencia de anticuerpo de entrecruzamiento F(ab')₂ anti IgE humano de cabra. Todos los anticuerpos indujeron niveles apoptóticos máximos de 70-90 %, con algo de reducción en la actividad apoptótica a concentraciones altas (por ejemplo, 47H4-v1, -v2, 26A11-v1, -v14). La **Figura 8C** muestra que 47H4v5 tanto de tipo silvestre como afucosilado fue capaz de inducir apoptosis a niveles similares.

Las **Figuras 9A-B1-2** muestran la capacidad de los anticuerpos anti M1' murinos para inducir el flujo de calcio en células Daudi-IgE/M1'. La **Figura 9A** es el control que muestra el efecto de anti IgM y MAE11, mientras que la **Figura 9B1-B2** muestra el efecto de la aplicación de los anticuerpos anti M1' murinos indicados.

La **Figura 10** muestra la capacidad del anticuerpo anti IgE/M1' humanizado 47H4 v5, variante wt y afucosilada para inducir ADCC. Aunque las variantes wt y afucosilada inducen citotoxicidad máxima similar, la variante afucosilada ("AF") fue más potente que la forma de tipo silvestre (CE50 AF ≈ 0,83 nM, CE50 wt ≈ 6,6 nM).

Las **Figuras 11A-11F** son secuencias de longitud completa de las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos anti IgE/M1' murinos. Las regiones variables se muestran en cursiva, mientras que las HVR (regiones hipervariables) están subrayadas. La **Figura 11A** muestra las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo murino 7A6 (SEC ID N°: 43 y 44), respectivamente. La **Figura 11B** muestra las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo murino 47H4 (SEC ID N°: 45 y 46), respectivamente. La **Figura 11C** muestra las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo murino 26A11 (SEC ID N°: 47 y 48), respectivamente. La **Figura 11D** muestra las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo murino 45C1 (SEC ID N°: 49 y 50), respectivamente. La **Figura 11E** muestra las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo murino 28E9 (SEC ID N°: 51 y 52), respectivamente. La **Figura 11F** muestra las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo murino 1C11 (SEC ID N°: 53 y 54), respectivamente.

Las **Figuras 12A-I** demuestran la capacidad de los anticuerpos murinos anti IgE/M1' para inhibir la producción de IgE en suero y células plasmáticas productoras de IgE en un modelo de hu-SCID atópico. La **Figura 12A** es una representación gráfica del diseño experimental. Las **Figuras 12B-C** muestran que el tratamiento con los anticuerpos murinos anti IgE/M1' redujo los niveles de IgE en un 65-84 %. Las **Figuras 12D-E** muestran que la reducción de células productoras de IgE *in vivo* fue del 19-69 %. Las **Figuras 12F-G** muestran que los niveles de otras inmunoglobulinas (por ejemplo, IgG1-4, IgA, IgM) relativamente no se vieron afectadas. Las **Figuras 12H-I** muestran que no se observó reducción en el número total de células plasmáticas del bazo.

Las **Figuras 13A-H** muestran el efecto de la variante humanizada 47H4v5 en los niveles de inmunoglobulina en el modelo de hu-SCID atópico. La **Figura 13A** es una representación gráfica del diseño experimental. Las **Figuras 13B-D** muestran que IgE en suero se redujo en 79 %, y que las células plasmáticas productoras de IgE se redujeron en 75 %. Las **Figuras 13E-F** no muestran reducción en los niveles de otras inmunoglobulinas del suero. Las **Figuras 13G-H** no muestran reducción en los niveles de células plasmáticas totales, demostrando de este modo que 47H4 reduce específicamente las células plasmáticas productoras de IgE, que son una

proporción muy pequeña de las células plasmáticas totales.

Las **Figuras 14A-D** ilustran la generación de ratones de introducción de huM1'. La **Figura 14A** muestra la localización del exón de M1' en el locus de IgE de ratón. La **Figura 14B** muestra un esquema de la recombinación en el locus de IgE de ratón que da como resultado la creación del alelo diana. La **Figura 14C** muestra la genotipación por PCR de una banda de 668 pb en ratones wt y una banda de 457 pb en los knock-in de M1'. La **Figura 14D** muestra una Transferencia de Southern en la que un fragmento de HindIII de 7,4 kB en ratones wt se convierte en un fragmento de 3 kB en knockin hu-M1', y un fragmento de BamHI de 14,1 kB se convierte en un fragmento de 18,1 en el alelo de knockin de hu-M1'. Se muestran ratones tanto de tipo silvestre como heterocigotos.

Las **Figuras 15A-I** muestran la capacidad de los anticuerpos anti IgE/M1' para prevenir la generación de IgE en una respuesta inmunitaria primaria. La **Figura 15A** es un esquema que muestra la línea temporal del diseño experimental, incluyendo la administración de TNP/OVA y anticuerpos anti IgE/M1'. La **Figura 15B** es una gráfica de los niveles de IgE específico de antígeno a lo largo del tiempo y muestra que aunque los niveles de IgE específicos de antígeno en animales de control (es decir, gp120) alcanzaron niveles máximos entre los días 8 y 14, el anti IgE/M1' evitó cualquier aumento y los niveles de IgE específicos de antígeno medidos no fueron significativamente diferentes de los ratones no inmunizados. Las **Figuras 15C-D** muestran que el tratamiento con anti IgE/M1' evitó el aumento en IgE en suero específico de antígeno los días 8 y 14, respectivamente, y no fue estadísticamente diferente de los ratones no inmunizados (**Figura 15E**). Las **Figuras 15F-I** muestran que los niveles de IgG1 específico de antígeno no se veían afectados significativamente por anti IgE/M1' durante los 28 días del experimento (excepto por una diferencia modesta el día 14).

Las **Figuras 16A-K** muestran la capacidad de los anticuerpos anti IgE/M1' para prevenir la generación de IgE específico de antígeno en una respuesta inmunitaria de memoria o secundaria. La **Figura 16A** es un esquema que muestra las líneas temporales del refuerzo secundario de TNP-OVA y la administración de anticuerpos anti IgE/M1', que se administró en primer lugar el día 28. La **Figura 16B** es una gráfica de los niveles de IgE específicos de antígeno a lo largo del tiempo y muestra que la respuesta de IgE secundaria al refuerzo de TNP-OVA el día 28 es más rápida, alcanzando un máximo después de 4 días en lugar de 8-9 días en la respuesta primaria. Las **Figuras 16C-D** muestran que los niveles de IgE específicos de antígeno en animales tratados con anti IgE/M1' se reducían significativamente en comparación con el control de isotipo, 59-65 % el día 32 y 90-93 % el día 35. La **Figura 16E** muestra que el día 42 (12 días de la administración inicial de anti IgE), los niveles de IgE específicos de antígeno se habían reducido hasta un nivel no estadísticamente diferente de los ratones de control vírgenes. Las **Figuras 16F-H** muestran que entre los días 28 y 49, la administración de anti IgE/M1' redujo los niveles de IgE en suero en 74-84 %, y el nivel diario medio de IgE específico de antígeno también se redujo en 74-83 %. Las **Figuras 16J-K** muestran que los niveles de IgG1 específicos de antígeno no se veían afectados significativamente por anti IgE/M1'.

Las **Figuras 17A-D** ilustran la capacidad de los anticuerpos anti IgE/M1' para reducir preventivamente la producción de IgE en respuesta a infección por *Nippostrongylus brasiliensis* ("NB"). La **Figura 17A** es un esquema que muestra el diseño experimental. Los animales se trataron tres veces por semana comenzando el día 0 hasta el día 21. La **Figura 17B** muestra los niveles de IgE a lo largo del tiempo en respuesta a infección por NB con anticuerpos anti IgE/M1' y de control. Las **Figuras 17C-D** muestran que el día 15, los animales tratados con anti IgE/M1' tenían niveles de IgE en suero reducidos no estadísticamente significativos con respecto a ratones no infectados.

Las **Figuras 18A-I** ilustran la capacidad de los anticuerpos anti IgE/M1' para tratar de forma terapéutica de este modo la respuesta de IgE máxima a infección por *Nippostrongylus brasiliensis* ("NB"). La **Figura 18A** es un esquema que muestra el diseño experimental. Los animales se trataron tres veces por semana entre los días 11 y 21. La **Figura 18B** muestra los niveles de IgE a lo largo del tiempo en respuesta a infección por NB con anticuerpos anti IgE/M1' y de control. Las **Figuras 18C-D** muestran que el anti IgE/M1' redujo los niveles de IgE en suero en 82-89 %, a los cuatro días de tratamiento. La **Figura 18E** muestra que para el día 21 los niveles de IgE en animales tratados con anti IgE/M1' se habían reducido en 97-98 %, y alcanzaron niveles no estadísticamente significativos con respecto al grupo de control no infectado. Las **Figuras 18F-G** muestran que las células plasmáticas productoras de IgE (como se cuantifica por Elispot) en los ganglios linfáticos y el bazo se redujeron en 88-94 % y 57-66 %, respectivamente. Las **Figuras 18H-I** muestran que las células plasmáticas totales (CD138+) tanto en ganglios linfáticos como en bazo aumentaron en todos los grupos de tratamiento en comparación con ratones no infectados, y que el tratamiento con anti IgE/M1' no cambió significativamente el número total de células plasmáticas en ninguno de los órganos. Estos resultados demuestran la capacidad de los anticuerpos anti IgE/M1' para reducir los niveles de IgE en suero agotando las células productoras de IgE *in vivo*.

Las **Figuras 19A-G** ilustran la capacidad de los anticuerpos anti IgE/M1' para tratar terapéuticamente la respuesta de IgE que aparece tarde en un ciclo de infección a infección por *Nippostrongylus brasiliensis* ("NB"). La **Figura 19A** es un esquema que muestra el diseño experimental en el que los animales se trataron tres veces por semana comenzando el día 40. La **Figura 19B** muestra que se produjo producción de IgE máxima en torno al día 15 y que todos los anticuerpos anti IgE/M1' redujeron IgE en suero. La **Figura 19C-D** muestra que el

anticuerpo anti IgE/M1' muestra una reducción significativa en los niveles de IgE tanto absolutos como normalizados, respectivamente, en relación con el comienzo del tratamiento. Las **Figuras 19E-G** muestran que el tratamiento con anti IgE/M1' redujo significativamente los niveles de IgE en suero, en comparación con el control de isotipo de mlgG1 anti gp120 entre los días 48 y 55.

Descripción detallada de la realización preferida

Técnicas generales

La práctica de la presente invención empleará, a no ser que se indique de otro modo, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, que están dentro de la experiencia de la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía, tal como, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición (Sambrook *et al.*, 1989); Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait, ed., 1984); Animals Cell Culture (R. I. Freshney, ed., 1987); Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.). Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel *et al.*, eds 1987, y actualizaciones periódicas); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis *et al.*, ed., 1994); A Practical Guide to Molecular Cloning (Perbal Bernard V., 1988); Phage Display: A Laboratory Manual (Barbas *et al.*, 2001).

Desarrollo y activación de linfocitos

Los dos tipos principales de linfocitos en seres humanos son los T (derivados del timo) y B (derivados de médula ósea). Estas células derivan de células madre hematopoyéticas en la médula ósea y el hígado fetal que se han comprometido a la ruta de desarrollo linfoide. Las descendencias de estas células madre siguen rutas divergentes para madurar a linfocitos B o T. El desarrollo de linfocitos B humanos tiene lugar completamente dentro de la médula ósea. Los linfocitos T, por otro lado, se desarrollan a partir de precursores inmaduros que dejan la médula ósea y viajan a través del torrente sanguíneo al timo, en el que proliferan y se diferencian en linfocitos T maduros.

Los linfocitos maduros que emergen del timo o de la médula ósea están en un estado quiescente, o "de reposo", es decir, son mitóticamente inactivos. Cuando se dispersan al torrente sanguíneo, estos linfocitos "sin presentación previa" o "vírgenes", viajan a diversos órganos linfoides secundarios o periféricos, tales como el bazo, ganglios linfáticos o amígdalas. La mayoría de los linfocitos vírgenes tienen una esperanza de vida inherentemente corta y mueren a los pocos días después de dejar la médula ósea o el timo. Sin embargo, si dicha célula recibe señales que indican la presencia de un antígeno, pueden activar y experimentar ciclos sucesivos de división celular. Algunas de las células descendientes resultantes vuelven después al estado de reposo para convertirse en *linfocitos de memoria*, linfocitos B y T que están sensibilizados esencialmente para el próximo encuentro con el alérgeno estimulador. La otra descendencia de linfocitos vírgenes activados son células efectoras, que sobreviven durante solamente unos pocos días, pero llevan a cabo actividades defensivas específicas.

La activación de linfocitos se refiere a una serie ordenada de acontecimientos mediante los cuales un linfocito en reposo pasa a medida que se estimula a dividirse y producir descendencia, parte de la cual se convierte en células efectoras. Una respuesta completa incluye tanto la inducción de proliferación celular (*mitogénesis*) como la expresión de funciones inmunológicas. Los linfocitos se activan cuando se unen ligandos específicos con receptores en sus superficies. Los ligandos son diferentes de linfocitos T y linfocitos B, pero los mecanismos fisiológicos intracelulares resultantes son similares.

Aunque los antígenos ajenos en sí mismos pueden inducir la activación de linfocitos, especialmente antígenos poliméricos grandes que se entrecruzan con inmunoglobulinas de superficie en linfocitos B, u otras glucoproteínas en linfocitos T. Sin embargo, la mayoría de los antígenos no son poliméricos e incluso cuando se unen directamente con los linfocitos B en grandes números no consiguen dar como resultado activación. Los linfocitos B se activan por estos antígenos más comunes cuando se coestimulan con linfocitos T auxiliares casi activados. Dicha estimulación puede producirse a partir de linfocinas secretadas por los linfocitos T, pero se transmite más eficazmente por contacto directo del linfocito B con proteínas de superficie de linfocitos T que interaccionan con ciertos receptores de superficie de linfocitos B para generar una señal secundaria.

Linfocitos B

La característica definitoria de los linfocitos B es la capacidad para sintetizar inmunoglobulinas. Las inmunoglobulinas (Ig) son una familia extremadamente diversa de proteínas compuestas de tipos relacionados de polipéptidos denominados cadenas pesadas y cadenas ligeras. Cada Ig se une específicamente con alta afinidad con su propio antígeno específico. Los linfocitos B maduros pueden expresar inmunoglobulina en dos formas diferentes, cada una de las cuales cumple funciones únicas. En linfocitos B en reposo (vírgenes o de memoria) se expresan inmunoglobulinas solamente en la superficie celular, en la que actúan esencialmente como receptor unido a membrana para antígenos específicos. Por el contrario, las células efectoras de linfocitos B (células plasmáticas) secretan inmunoglobulina al medio circundante. Dichas inmunoglobulinas secretadas conservan la capacidad de reconocer y unirse (frente a la forma unida a membrana en linfocitos B en reposo) y normalmente se denominan anticuerpos.

Cuando un linfocito B activado se divide, parte de su descendencia se convierte en linfocitos B de memoria, mientras que el resto se diferencia en células plasmáticas. Dado que las células plasmáticas tienen un tiempo de vida relativamente corto, a no ser que se produzcan nuevas células plasmáticas, la población muere pronto y ya no se secretan inmunoglobulinas. Como resultado, la activación de linfocitos B normalmente da como resultado una oleada transitoria de proliferación, seguida de una explosión de secreción de anticuerpos que aumenta y después remite a lo largo de varios días o algunas semanas. Los linfocitos B son el tipo celular primario implicado en la inmunidad humoral, o el efecto protector mediado a través de fluidos tisulares. Debido a que los anticuerpos anti IgE/M1' de la invención de hecho agotan los linfocitos B, incluyendo linfocitos B de memoria, se pueden usar para "reiniciar" la memoria. Por lo tanto el efecto de esto podría ser que el componente de linfocitos B que conduce la respuesta alérgica en individuos pudiera atenuarse si no eliminarse.

Linfocitos T

Los linfocitos T no expresan inmunoglobulinas, sino que, en su lugar detectan la presencia de sustancias ajenas por medio de proteínas de superficie denominadas receptores de linfocitos T. Estos receptores reconocen antígenos por contacto directo o influyendo en la actividad de otras células inmunitarias. Junto con los macrófagos, los linfocitos T son el tipo celular primario implicado en la inmunidad mediada por células.

A diferencia de los linfocitos B, los linfocitos T pueden detectar sustancias ajenas solamente en contextos específicos. En particular, los linfocitos T reconocerán una proteína ajena solamente si se escinde en primer lugar en péptidos pequeños, que después se presentan en la superficie de una segunda célula hospedadora, denominada una célula presentadora de antígenos (APC). Muchos tipos de células hospedadoras pueden presentar antígenos en algunas condiciones pero ciertos tipos están más específicamente adaptados para este fin y son particularmente importantes en el control de la actividad de los linfocitos T, e incluyen macrófagos y otros linfocitos B. La presentación de antígenos depende en parte de proteínas específicas, denominadas proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), en la superficie de las células presentadoras. Por lo tanto, para estimular la inmunidad mediada por células, deben presentarse péptidos ajenos a linfocitos T en combinación con péptidos del MHC, y esta combinación debe reconocerse por un receptor de linfocitos T.

Hay dos subconjuntos de linfocitos T significativos: linfocitos T citotóxicos (linfocitos T_C o CTL) y linfocitos T auxiliares (T_H), que pueden identificarse en general basándose en la expresión en superficie celular del marcador CD8 y CD4. Los linfocitos T_C son importantes en la defensa viral y pueden destruir virus directamente reconociendo ciertos péptidos virales expresados en superficie celular. Los linfocitos T_H promueven la proliferación, maduración y función inmunológica de otros tipos celulares, por ejemplo, secreción de linfocinas para controlar las actividades de linfocitos B, macrófagos y linfocitos T citotóxicos. Los linfocitos T tanto vírgenes como de memoria permanecen habitualmente en el estado en reposo, y en este estado no muestran actividad auxiliar o citotóxica significativa. Cuando se activan, estas células experimentan varios ciclos de división mitótica para producir células descendientes. Algunas de estas células descendientes vuelven al estado en reposo como células de memoria, pero otras se convierten en células efectoras que expresan activamente actividad auxiliar o citotóxica. Estas células descendientes se asemejan a sus parentales: las células CD4⁺ solamente pueden producir descendencia CD4⁺, mientras que las células CD8⁺ solamente producen descendencia CD8⁺. Los linfocitos T efectoras expresan marcadores de superficie celular que no se expresan en linfocitos T en reposo, tales como CD25, CD28, CD29, CD40L, receptores de transferrina y proteínas del MHC de clase II. Cuando se retiran los estímulos activadores, la actividad citotóxica o auxiliar gradualmente remite durante un periodo de varios días a medida que las células efectoras mueren o vuelven al estado de reposo.

De forma similar a la activación de linfocitos B, las respuestas de linfocitos T a la mayoría de los antígenos también requieren dos tipos de estímulos simultáneos. El primero es el antígeno, que si se presenta de forma apropiada por proteínas del MHC en una célula presentadora de antígenos, puede reconocerse y unirse con receptores de linfocitos T. Aunque este complejo de antígeno-MHC envía una señal al interior celular, es habitualmente insuficiente para dar como resultado la activación de linfocitos T. La activación completa, tal como se produce con linfocitos T auxiliares, requiere coestimulación con otros ligandos específicos llamados coestimuladores que se expresan en la superficie de la célula presentadora de antígenos. La activación de un linfocito T citotóxico, por otro lado, generalmente requiere IL-2, una citocina secretada por linfocitos T auxiliares activados.

La respuesta inmunitaria

Las tres propiedades funcionales primarias del sistema inmunitario de mamíferos que lo distinguen de las otras defensas del cuerpo incluyen: (1) especificidad, capacidad para reconocer y responder o no responder individualmente entre un amplio número de moléculas diana, (2) diferenciación, la capacidad de determinar lo propio de lo ajeno para coexistir pacíficamente con todas las innumerables proteínas y otro material orgánico, pero aun así responder vigorosamente contra material ajeno que se introduce en el cuerpo, y (3) memoria, la capacidad para moldearse por la experiencia de modo que encuentros posteriores con un patógeno ajeno particular provoquen una respuesta más rápida y vigorosa que la que se produjo en el encuentro inicial. Debido a que los antagonistas de IgE de la invención inducen la apoptosis en linfocitos B portadores de IgE, se espera que atenúen o incluso borren la memoria inmunitaria a antígenos particulares. Se espera que esto sea particularmente beneficioso cuando la

respuesta inmunitaria vigorosa a alérgenos comunes sea patológica, tal como sucede con los trastornos atópicos.

Los linfocitos vírgenes se liberan continuamente de los órganos linfoides primarios a la periferia, portando cada uno receptores de superficie que permiten la unión a antígeno. La unión a antígeno en linfocitos B está mediada a través de inmunoglobulinas unidas a superficie, mientras que en linfocitos T está mediada por receptores de linfocitos T. Cuando los linfocitos vírgenes no se activan, mueren en un periodo de unos pocos días después de entrar en la periferia. Los que se activan sobreviven y proliferan, produciendo células descendientes que pueden experimentar después ciclos adicionales de activación y proliferación. La velocidad e intensidad de la respuesta a un antígeno dado se determina principalmente por selección clonal: cuanto mayor sea la población de células descendientes o clones específicos de un antígeno particular, mayor será el número de células que pueden reconocer y participar en la respuesta inmunitaria. Cada respuesta inmunitaria es una secuencia de acontecimientos compleja e intrincadamente regulada que implica varios tipos celulares. Se desencadena cuando un inmunógeno entra en el cuerpo y se encuentra con una clase especializada de células denominadas células presentadoras de antígenos (APC). Estas APC capturan una cantidad mínima del inmunógeno y la presentan en una forma que puede reconocerse por linfocitos T auxiliares específicos de antígeno. Después los linfocitos T auxiliares se activan y, a su vez, promueven la activación de otras clases de linfocitos, tales como linfocitos B o linfocitos T citotóxicos. Después los linfocitos activados proliferan y llevan a cabo sus funciones efectoras específicas. En cada estadio en este proceso, los linfocitos y las APC se comunican entre sí mediante contacto directo o secretando citocinas reguladoras.

Los antígenos exógenos que se capturan por una APC experimentan una serie de alteraciones denominadas *procesamiento de antígenos*. Dicho procesamiento, especialmente de inmunógenos proteicos implica la desnaturalización y digestiones proteolíticas parciales, de modo que el inmunógeno se escinda en péptidos cortos. Un número limitado de los péptidos resultantes se asocian después de forma no covalente con proteínas del MHC de clase II y se transportan a la superficie de la APC, un proceso conocido como *presentación de antígenos*. Un linfocito T auxiliar CD4⁺ que entra en contacto directo con una APC puede activarse, pero lo hará solamente si expresa una proteína receptora de linfocitos T que pueda reconocer y unirse con el complejo de péptido-MHC particular presentado por la APC.

Los linfocitos T auxiliares (T_H) son los principales organizadores de la respuesta inmunitaria debido a que son necesarios para la activación de las otras dos células efectoras linfáticas: linfocitos T citotóxicos (T_c) y células plasmáticas secretoras de anticuerpos. La activación de T_H se produce pronto en una respuesta inmunitaria y requiere al menos dos señales. Una señal se proporciona por la unión del receptor de antígeno de linfocitos T con el complejo de péptido-MHC antigénico en la superficie de la APC que se transmite a través del complejo de proteína CD3, mientras que se piensa que la segunda señal, coestimuladora, a través de la APC resulta de la unión de una proteína transmisor de señal separada en la superficie de linfocitos T con un ligando específico en la APC. Una de dichas interacciones conocidas es la proteína de linfocitos T CD28 y la familia de proteínas de superficie de APC conocida como B7. Otros pares de proteínas de superficie también pueden mediar en la coestimulación.

Juntas, las dos señales inducen que el linfocito T auxiliar comience a secretar una citocina conocida como interleucina 2 (IL-2) y también que comience a expresar receptores de IL-2 de alta afinidad específicos en su superficie. IL-2 es un factor mitógeno altamente potente para linfocitos T y es esencial para la respuesta proliferativa de linfocitos T activados. El efecto de IL-2 en la célula de la que se secreta es un fenómeno conocido como efecto autocrino. Se ha mostrado además que incluso si un linfocito T ha recibido ambas señales, no proliferará si sus propios receptores de IL-2 de superficie están bloqueados. La IL-2 también puede actuar en células en la proximidad inmediata, en un efecto llamado paracrino. Este efecto es especialmente importante para activar linfocitos T_c, que generalmente no producen suficiente IL-2 para estimular su propia proliferación. Además de IL-2, los linfocitos T_H activados secretan otras citocinas y promueven el crecimiento, diferenciación y las funciones de linfocitos B, macrófagos y otros tipos celulares.

El contacto entre una APC y un linfocito T_H específico de antígeno también tiene efecto en la APC, uno de los más importantes de los cuales es la liberación de IL-1. Se cree que esta citocina actúa de una manera autocrina para aumentar la expresión en superficie de proteínas del MHC de clase II y de diversas moléculas de adhesión fortaleciendo de este modo la unión del linfocito T_H y potenciando la presentación de antígenos. Al mismo tiempo la IL-1 actúa de una manera paracrina en el linfocito T_H para promover la secreción de IL-2 y la expresión del receptor de IL-2.

Durante la activación de linfocitos T_H de la manera descrita previamente, algunos linfocitos B también pueden haber estado interaccionando con el inmunógeno mediante sus receptores de antígeno, que son formas unidas a membrana de los anticuerpos que posteriormente se secretarán. A diferencia de los linfocitos T, los linfocitos B reconocen un inmunógeno en su forma libre, no procesada. La unión de antígeno específica proporciona un tipo de señal que puede conducir a la activación de linfocitos B. Se proporciona un segundo tipo por linfocitos T_H activados, que expresan proteínas que ayudan a activar el linfocito B uniéndose con receptores no de inmunoglobulina en su superficie. Estas señales derivadas de T_H, que actúan en cualquier linfocito B independientemente de su especificidad de antígeno, se conocen como factores auxiliares. Estos factores auxiliares incluyen IL-2, IL-4 e IL-6. Sin embargo, la ayuda se consigue más eficazmente mediante contacto célula-célula, que permite que las proteínas

en la superficie de linfocitos T entre en contacto directamente con las del linfocito B. La forma más eficaz de ayuda mediada por contacto sucede cuando una proteína llamada ligando de CD40 (CD40L), que se expresa en linfocitos TH solamente después de activarse, se une con una proteína denominada CD40 en linfocitos B. En un proceso conocido como *activación de testigo*, el contacto con un linfocito B activado puede ser incluso suficiente para activar los linfocitos B en reposo incluso aunque sus inmunoglobulinas de superficie no hayan interactuado con el antígeno.

Los linfocitos Tc actúan para erradicar células que expresen antígenos ajenos en sus superficies, tales como células hospedadoras infectadas por virus. La mayoría de los linfocitos Tc expresan CD8 en lugar de CD4 y por lo tanto reconocen antígenos en asociación con proteínas del MHC de clase I en lugar de clase II. Cuando una célula somática está infectada por un virus, algunas proteínas virales inmunogénicas pueden experimentar procesamiento dentro de la célula, y los péptidos resultantes pueden después aparecer como complejos de superficie con moléculas del MHC de clase I. Esos complejos de péptido-MHC pueden después reconocerse por el receptor de linfocitos T de un clon específico de antígeno, proporcionando una de dos señales necesarias para la activación de linfocitos Tc. Esta primera señal por sí sola induce receptores de IL-2 de alta afinidad en el linfocito Tc. La segunda señal se proporciona por IL-2 secretada desde un linfocito T_H activado cercano. Al recibir ambas señales, el linfocito Tc activado adquiere actividad citotóxica, permitiéndole destruir la célula con la que está unido, así como cualquier otra célula que porte los mismos complejos de péptido-MHC de clase I. En algunos casos, la destrucción se produce debido a que el Tc libera toxinas específicas a la célula diana; en otros, el Tc induce que la célula diana cometa suicidio por apoptosis. El linfocito Tc activo también prolifera, dando lugar a linfocitos Tc adicionales con la misma especificidad de antígeno.

La ruta de IgE/mastocitos/mediadora.

Se fijan anticuerpos IgE a la superficie de mastocitos y basófilos en la parte Fc de la molécula con un receptor de superficie celular de alta afinidad, denominado FcεRI. La reacción alérgica se inicia cuando la molécula de alérgeno polivalente se une con anticuerpos que ocupan estos receptores. El resultado es un enlace del FcεRI, que a su vez señala intracelularmente provocando la liberación y activación de mediadores de inflamación: histamina, leucotrienos, factores quimiotácticos, factor activador de plaquetas y proteinasas. Estos mediadores activados actúan localmente y provocan permeabilidad vascular aumentada, vasodilatación, contracción del músculo liso y secreción de las glándulas mucosas. Dichos acontecimientos se denominan clínicamente la *fase inmediata o temprana*, y se producen en los primeros 15-30 minutos después de la exposición a alérgeno. Durante las 12 horas posteriores hay una infiltración tisular progresiva de células inflamatorias, que avanza de neutrófilos a eosinófilos a células mononucleares en respuesta a otros mediadores químicos que no se entienden completamente. Este periodo de tiempo de 6-12 horas después de la exposición a alérgeno se designa la *fase tardía* y se caracteriza por manifestaciones clínicas de inflamación celular. Dado que las reacciones de fase tardía, especialmente en el pulmón, se producen en ausencia de reacciones de fase temprana, no se entiende completamente aún si la reacción de fase tardía está necesariamente mediada por IgE.

Este mecanismo es principalmente responsable de la anafilaxis, urticaria y las enfermedades atópicas tales como rinitis alérgica, asma alérgica, dermatitis atópica y gastroenteropatía alérgica.

La ruta de linfocitos T efectores/linfocinas

Ciertas enfermedades alérgicas están mediadas por reacción del alérgeno con el linfocito T efector sensibilizado al alérgeno específico de una exposición previa. Cuando se encuentran con el alérgeno, los linfocitos T CD4+ se activan para generar linfocinas, lo que da como resultado durante el periodo de varios días la acumulación de infiltrado de células mononucleares.

I. Definiciones

Un "*alérgeno*" o "*inmunógeno*" es cualquier molécula que pueda desencadenar una respuesta inmunitaria. Como se usa en el presente documento, el término abarca la molécula antigénica en sí misma, o su fuente, tal como grano de polen, caspa animal, veneno de insectos o producto alimentario. Esto se diferencia del término *antígeno*, que se refiere a una molécula que puede reconocerse específicamente por una inmunoglobulina o receptor de linfocitos T. Cualquier sustancia ajena capaz de inducir una respuesta inmunitaria es un alérgeno potencial. Se sabe que muchos productos químicos diferentes de origen tanto natural como sintético son alérgenos. Los productos químicos orgánicos naturales complejos, especialmente proteínas, probablemente provoquen alergia mediada por anticuerpos, mientras que los compuestos orgánicos sencillos, productos químicos inorgánicos, y metales provocan más preferentemente alergia mediada por linfocitos T. En algunos casos, el mismo alérgeno puede ser responsable de más de un tipo de alergia. La exposición al alérgeno puede ser mediante inhalación, inyección o contacto cutáneo.

El término "*anticuerpo*" incluye anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos de longitud completa que tienen una región Fc de inmunoglobulina), composiciones de anticuerpo con especificidad poliepitópica, anticuerpos multispecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos, diacuerpos y moléculas monocatenarias, así como

fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, Fab, F(ab')₂ y Fv). El término “*inmunoglobulina*” (Ig) se usa de forma intercambiable con “*anticuerpo*” en el presente documento.

La unidad de anticuerpo de 4 cadenas básica es una glucoproteína heterotetramérica compuesta de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Un anticuerpo IgM consiste en 5 de las unidades heterotetraméricas básicas junto con un polipéptido adicional llamada cadena J, y contiene 10 sitios de unión a antígeno, mientras que los anticuerpos IgA comprende de 2 a 5 de las unidades de 4 cadenas básicas que pueden polimerizar para formar ensamblajes polivalentes en combinación con la cadena J. En el caso de IgG, la unidad de 4 cadenas es generalmente de aproximadamente 150.000 dalton. Cada cadena L está unida con una cadena H por un enlace disulfuro covalente, mientras que las dos cadenas H están unidas entre sí por uno o más enlaces disulfuro dependiendo del isotipo de cadena H. Cada cadena H y L también tiene enlaces disulfuro intracatenarios espaciados de forma regular. Cada cadena H tiene en el extremo N terminal un dominio variable (V_H) seguido de tres dominios constantes (C_H) para cada una de las cadenas α y γ y cuatro dominios C_H para los isotipos μ y ϵ . Cada cadena L tiene en el extremo N terminal un dominio variable (V_L) seguido de un dominio constante en su otro extremo. El V_L se alinea con el V_H y el C_L se alinea con el primer dominio constante de la cadena pesada (C_H1). Se cree que restos de aminoácidos particulares forman una interfaz entre los dominios variables de cadena ligera y cadena pesada. El emparejamiento de un V_H y V_L entre sí forma un sitio de unión a antígeno individual. Para la estructura y propiedades de las diferentes clases de anticuerpos, véase por ejemplo, Basic and Clinical Immunology, 8ª Edición, Daniel P. Sties, Abba I. Terr y Tristram G. Parslow (eds), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, página 71 y Capítulo 6.

La cadena L de cualquier especie de vertebrado puede asignarse a uno de dos tipos claramente distintos, denominados kappa y lambda, basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas (CH), pueden asignarse inmunoglobulinas a diferentes clases o isotipos. Hay cinco clases de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, que tienen cadenas pesadas designadas α , δ , ϵ , γ y μ respectivamente. Las clases γ y α se dividen adicionalmente en subclases basándose en diferencias relativamente menores en la secuencia y función de CH, por ejemplo, los seres humanos expresan las siguientes subclases: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2.

Un anticuerpo “*aislado*” es uno que se ha identificado, separado y/o recuperado de un componente de su ambiente de producción (por ejemplo, de forma natural o recombinante). Preferentemente, el polipéptido aislado está libre de asociación con todos los otros componentes de su ambiente de producción. Los componentes contaminantes de su ambiente de producción, tales como los resultantes de células transfectadas recombinantes, son materiales que normalmente interferirían con los usos de investigación, diagnóstico o terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En realizaciones preferidas, el polipéptido se purificará: (i) hasta más del 95 % en peso del anticuerpo como se determina, por ejemplo, por el método de Lowry, y en algunas realizaciones, hasta más del 99 % en peso; (1) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de la secuencia de aminoácidos interna o N terminal mediante el uso de un secuenciador de copa rotatoria o (3) hasta la homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o, preferentemente, tinción de plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes dado que al menos un componente del ambiente natural del anticuerpo no estará presente. Habitualmente, sin embargo, se preparará un polipéptido o anticuerpo aislado por al menos una etapa de purificación.

La “*región variable*” o el “*dominio variable*” de un anticuerpo se refiere a los dominios amino terminales de la cadena pesada o ligera del anticuerpo. Los dominios variables de la cadena pesada y cadena ligera pueden denominarse “VH” y “VL”, respectivamente. Estos dominios son generalmente las partes más variables del anticuerpo (en relación con otros anticuerpos de la misma clase) y contienen los sitios de unión a antígeno.

El término “*variable*” se refiere al hecho de que ciertos segmentos de los dominios variables difieren extensivamente en su secuencia entre anticuerpos. El dominio V media en la unión a antígeno y define la especificidad de un anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no está distribuida uniformemente entre la totalidad de los dominios variables. En su lugar, está concentrada en tres segmentos denominados regiones hipervariables (HVR) en los dominios variables tanto de cadena ligera como de cadena pesada. Las partes más altamente conservadas de dominios variables se denominan las regiones marco conservadas (FR). Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera nativas comprenden cada uno cuatro regiones FR, que adoptan principalmente una configuración de lámina beta, conectada por tres HVR, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina beta. Las HVR en cada cadena se mantienen juntas en proximidad estrecha por las regiones FR y, con las HVR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat *et al.*, Sequences of Immunological Interest, Quinta Edición, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión del anticuerpo con un antígeno, pero muestran diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en toxicidad celular dependiente de anticuerpo.

La expresión “*anticuerpo monoclonal*” como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural y/o modificaciones postraduccionales (por ejemplo, isomerizaciones, amidaciones) que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos

monoclonales son altamente específicos, dirigiéndose contra un único sitio antigénico. A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales, que normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque se sintetizan por el cultivo de hibridoma, que no está contaminado por otras inmunoglobulinas. El modificado “monoclonal” indica que el anticuerpo se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse que requiera producción del anticuerpo por ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales para usar de acuerdo con la presente invención pueden realizarse por diversas técnicas, incluyendo, por ejemplo, el método de hibridoma (por ejemplo, Kohler y Milstein., *Nature*, 256: 495-97 (1975); Hongo *et al.*, *Hybridoma*, 14 (3): 253-260 (1995), Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988); Hammerling *et al.*, en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N. Y., 1981)), métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 4.816.567), tecnologías de presentación de fagos (véase, por ejemplo, Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Sidhu *et al.*, *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee *et al.*, *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (34): 12467-12472 (2004); y Lee *et al.*, *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132 (2004)), y tecnologías para producir anticuerpos humanos o de tipo humano en animales que tengan partes de o todos los loci de inmunoglobulina o genes que codifican secuencias de inmunoglobulina humana (véase, por ejemplo, documentos WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature* 362: 255-258 (1993); Bruggemann *et al.*, *Year in Immunol.* 7:33 (1993); Patentes de Estados Unidos N° 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; y 5.661.016; Marks *et al.*, *Biotechnology* 10: 779-783 (1992); Lonberg *et al.*, *Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368: 812-813 (1994); Fishwild *et al.*, *Nature Biotechnol.* 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnol.* 14: 826 (1996); y Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995).

La expresión “*anticuerpo desnudo*” se refiere a un anticuerpo que no está conjugado con un resto citotóxico o radiomarcador.

Las expresiones “*anticuerpo de longitud completa*”, “*anticuerpo intacto*” o “*anticuerpo completo*” se usan de forma intercambiable para hacer referencia a un anticuerpo en su forma sustancialmente intacta, a diferencia de un fragmento de anticuerpo. Los anticuerpos específicamente completos incluyen los que tienen cadenas pesadas y ligeras incluyendo una región Fc. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia nativa (por ejemplo, dominios constantes de secuencia nativa humana) o variantes de secuencia de aminoácidos de los mismos. En algunos casos, el anticuerpo intacto puede tener una o más funciones efectoras.

Un “*fragmento de anticuerpo*” comprende una parte de un anticuerpo intacto, preferentemente la región de unión a antígeno y/o la variable del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales (véase Patente de Estados Unidos 5.641.870, Ejemplo 2; Zapata *et al.*, *Protein Eng.* 8(10): 1057-1062 [1995]); moléculas de anticuerpo monocatenarias y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

La digestión con papaína de anticuerpos produjo dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, denominados fragmentos “Fab”, y un fragmento “Fc” residual, una designación que refleja la capacidad para cristalizar fácilmente. El fragmento Fab consiste en una cadena L completa junto con el dominio de región variable de la cadena H (V_H), y el primer dominio constante de una cadena pesada (C_H1). Cada fragmento Fab es monovalente con respecto a la unión a antígeno, es decir, tiene un único sitio de unión a antígeno. El tratamiento con pepsina de un anticuerpo produce un único fragmento grande F(ab')₂ que se corresponde en general con dos fragmentos Fab enlazados por disulfuro que tienen diferente actividad de unión a antígeno y aún es capaz de entrecruzarse con el antígeno. Los fragmentos Fab' difieren de fragmentos Fab porque tienen algunos restos adicionales en el extremo carboxilo terminal del dominio C_H1 incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en el presente documento para Fab' en el que el resto o los restos de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

El fragmento Fc comprende las partes carboxilo terminal de ambas cadenas H mantenidas juntas por disulfuros. Las funciones efectoras de los anticuerpos se determinan por secuencias en la región Fc, la región que también se reconoce por receptores de Fc (FcR) hallados en ciertos tipos de células.

“Fv” es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de reconocimiento y unión de antígeno completo. Este fragmento consiste en un dímero de un dominio de región variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en asociación no covalente estrecha. Del plegamiento de estos dos dominios surgen seis bucles hipervariables (3 bucles de cada una de las cadenas H y L) que contribuyen a los restos de aminoácidos para unión a antígeno y confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solamente tres HVR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse con el antígeno, aunque a una afinidad menor que el sitio de unión completo.

“Fv monocatenario” también abreviado como “sFv” o “scFv” son fragmentos de anticuerpo que comprenden los dominios de anticuerpo V_H y V_L conectados en una única cadena polipeptídica. Preferentemente, el polipéptido sFv comprende además un enlazador polipeptídico entre los dominios V_H y V_L que permite al sFv formar la estructura deseada para unión de antígeno. Para una revisión del sFv, véase Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pp. 269-315(1994).

Los “fragmentos funcionales” de los anticuerpos de la invención comprenden una parte de un anticuerpo intacto, generalmente incluyendo la región de unión a antígeno o variable del anticuerpo intacto o la región F de un anticuerpo que conserva o tiene capacidad de unión a FcR modificada. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen anticuerpo lineal, moléculas de anticuerpo monocatenarias y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

El término “diacuerpos” se refiere a fragmentos de anticuerpo pequeños preparados por construcción de fragmentos sFv (véase párrafo precedente) con enlazadores cortos (aproximadamente 5-10 restos) entre los dominios V_H y V_L de modo que se consiga emparejamiento intercatenario pero no intracatenario de los dominios V, dando como resultado de este modo un fragmento bivalente, es decir, un fragmento que tiene dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos biespecíficos son heterodímeros de dos fragmentos sFv “de entrecruzamiento” en los que los dominios V_H y V_L de los dos anticuerpos están presentes en diferentes cadenas polipeptídicas. Se describen diacuerpos en más detalle en, por ejemplo, los documentos EP 404.097; WO 93/11161; Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993).

Los anticuerpos monoclonales en el presente documento incluyen específicamente anticuerpos (inmunoglobulinas) “quiméricos” en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica a u homóloga de secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la cadena o las cadenas son idénticas a u homólogas de secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada (Patente de Estados Unidos Nº 4.816.567; Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos de interés en el presente documento incluyen anticuerpos PRIMATIZED® en los que la región de unión a antígeno del anticuerpo deriva de un anticuerpo producido, por ejemplo, inmunizando macacos con un antígeno de interés. Como se usa en el presente documento, “anticuerpo humanizado” se usa como un subconjunto de “anticuerpos quiméricos”.

Las formas “humanizadas” de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En una realización, un anticuerpo humanizado es una inmunoglobulina humana (anticuerpo receptor) en la que se reemplazan restos de una HVR del receptor por restos de una HVR de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tenga la especificidad, afinidad y/o capacidad deseada. En algunos casos, los restos de FR de la inmunoglobulina humana se reemplazan por restos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones pueden realizarse para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo, tal como afinidad de unión. En general, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una secuencia de inmunoglobulina no humana, y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana, aunque las regiones FR pueden incluir una o más sustituciones de restos de FR individuales que mejoren el rendimiento del anticuerpo, tal como afinidad de unión, isomerización, inmunogenicidad, etc. El número de estas sustituciones de aminoácidos en la FR normalmente no es mayor de 6 en la cadena H, y en la cadena L, no es mayor de 3. El anticuerpo humanizado opcionalmente comprenderá también al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase, por ejemplo, Jones *et al.*, *Nature* 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332: 323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2: 593-596 (1992). Véase también, por ejemplo, Vaswani y Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1: 105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23: 1035-1038 (1995); Hurlé y Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5: 428-433 (1994); y Patentes de Estados Unidos Nº 6.982.321 y 7.087.409.

Un “anticuerpo humano” es uno que posee una secuencia de aminoácidos correspondiente a la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o se ha preparado usando cualquiera de las técnicas para preparar anticuerpos humanos como se desvelan en el presente documento. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende restos de unión a antígeno no humanos. Los anticuerpos humanos pueden producirse usando diversas técnicas conocidas en este campo, incluyendo bibliotecas de presentación de fagos. Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581 (1991). También están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos métodos descritos en Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147(1): 86-95 (1991). Véase también van Dijk y van de Winkel, *Curro Opin. Pharmacol.*, 5: 368-74 (2001). Pueden prepararse anticuerpos humanos administrando el antígeno a un animal transgénico que se ha modificado para producir dichos anticuerpos en respuesta a la presentación antigénica, pero cuyos loci endógenos se han

desactivado, por ejemplo, xenomice inmunizados (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 6.075.181 y 6.150.584 con respecto a tecnología XENOMOUSE™). Véase también, por ejemplo, Li *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103: 3557-3562 (2006) con respecto a anticuerpos humanos generados mediante una tecnología de hibridoma de linfocitos B humanos.

La expresión “*región hipervariable*”, “*HVR*” o “*HV*”, cuando se usa en el presente documento se refiere a las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son de secuencia hipervariable y/o forma bucles estructuralmente definidos. Generalmente, los anticuerpos comprenden seis HVR, tres en el VH (H1, H2, H3) y tres en el VL (L1, L2, L3). En anticuerpos nativos, H3 y L3 presentan la mayor diversidad de las seis HVR, y se cree que H3 en particular desempeña un papel único para conferir especificidad fina a los anticuerpos. Véase, por ejemplo, Xu *et al.* Immunity 13: 37-45 (2000); Johnson y Wu in Methods in Molecular Biology 248: 1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003). De hecho, los anticuerpos de camélidos de origen natural que consisten en solamente una cadena pesada son funcionales y estables en ausencia de cadena ligera. Véase, por ejemplo, Hamers-Casterman *et al.*, Nature 363: 446-448 (1993) y Sheriff *et al.*, Nature Struct. Biol. 3: 733-736 (1996).

Varias demarcaciones de HVR se usan y están abarcadas en el presente documento. Las HVR que son regiones determinantes de complementariedad (CDR) de Kabat se basan en la variabilidad de secuencia y son las más habitualmente usadas (Kabat *et al.*, mencionado anteriormente). Chothia se refiere en su lugar a la localización de los bucles estructurales (Chothia y Lesk J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987)). Las HVR de AbM representan un compromiso entre las CDR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia, y se usan por el software de modelación de anticuerpos AbM de Oxford Molecular. Las HVR de “contacto” se basan en un análisis de las estructuras cristalinas complejas disponibles. Los restos de cada una de estas HVR se indican a continuación.

Bucle	Kabat	AbM	Chothia	Contacto
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L34	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L56	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B (Numeración de Kabat)
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35 (Numeración de Chothia)
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H56	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H95-H102	H93-H101

Las HVR pueden comprender “HVR extendidas” de la siguiente manera: 24-36 o 24-34 (L1), 46-56 o 50-56 (L2), y 89-97 o 89-96 (L3) en el VL y 26-35 (H1), 50-65 o 47-65 (una realización preferida) (H2) y 93-102 (H3) en el VH. Los restos de dominio variable se enumeran de acuerdo con Kabat *et al.*, mencionado anteriormente, para cada una de estas definiciones de HVR extendidas.

Los restos de “*marco conservado*” o “FR” son los restos de dominio variable distintos de los restos de HVR como se definen en el presente documento.

La expresión “numeración de restos de dominio variable como en Kabat” o “numeración de posición de aminoácidos como en Kabat” y variaciones de las mismas, se refieren al sistema de numeración usado para dominios variables de cadena pesada o dominios variables de cadena ligera de la compilación de anticuerpos en Kabat *et al.*, mencionado anteriormente. Usando este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos o más aminoácidos correspondientes a un acortamiento de, o inserción en, una FR o HVR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir un inserto de un único aminoácido (resto 52a de acuerdo con Kabat) después del resto 52 de H2 y restos insertados (por ejemplo, restos 82a, 82b y 82c, etc., de acuerdo con Kabat) después del resto de FR de cadena pesada 82. La numeración de Kabat de los restos puede determinarse para un anticuerpo dado mediante alineamiento en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada de Kabat “convencional”.

Un “*marco conservado humano aceptor*” para los fines del presente documento es un marco conservado que comprende la secuencia de aminoácidos de un marco conservado VL o VH derivado de un marco conservado de inmunoglobulina humana o un marco conservado consenso humano. Un marco conservado humano aceptor “derivado de” un marco conservado de inmunoglobulina humana o un marco conservado consenso humano puede comprender la misma secuencia de aminoácidos del mismo, o puede contener cambios de secuencia de aminoácidos preexistentes. En algunas realizaciones, el número de cambios de aminoácidos preexistentes son 10 o menos, 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos o 2 o menos.

Un “*marco conservado consenso humano*” es un marco conservado que representa los restos de aminoácidos que aparecen más habitualmente en una selección de secuencias de marco conservado VL o VH de inmunoglobulina humana. En general, la selección de secuencias de VL o VH de inmunoglobulina humana es de un subgrupo de secuencias de dominio variable. En general, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat *et al.*,

Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). En una realización, para el VL, el subgrupo es el subgrupo kappa I como en Kabat *et al.*, mencionado anteriormente. En una realización, para el VH, el subgrupo es subgrupo III como en Kabat *et al.*, mencionado anteriormente.

Un “marco conservado consenso de subgrupo III de VH” comprende la secuencia consenso obtenida de las secuencias de aminoácidos en el subgrupo III pesado variable de Kabat *et al.*, mencionado anteriormente. En una realización, la secuencia de aminoácidos de marco conservado consenso de subgrupo III de VH comprende al menos una parte de o todas las siguientes secuencias: EVQLVESG-GGLVQPGGSLRLSCAAS (H1) (SEC ID N°: 55), WVRQAPGKGLEWVA (SEC ID N°: 56) (H2), RFTISRDDSKNT-LYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEC ID N°: 57) (H3), WGQGTLTVVSS (SEC ID N°: 58) (H4).

Un “marco conservado consenso de subgrupo I de VL” comprende la secuencia consenso obtenida de las secuencias de aminoácidos en el subgrupo I kappa ligero variable de Kabat *et al.*, mencionado anteriormente. En una realización, la secuencia de aminoácidos de marco conservado consenso de subgrupo I de VH comprende al menos una parte o toda de cada una de las siguientes secuencias: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEC ID N°: 59) (L1), WYQQKPGKAPKLLIY (SEC ID N°: 60) (L2), GVPSRFSGSGS-GTDFTLTISLQPEDFATYYC (SEC ID N°: 61) (L3), FGQGTKVEIKR (SEC ID N°: 62) (L4).

Una “modificación de aminoácidos” en una posición específica, por ejemplo de la región Fc, se refiere a la sustitución o delección del resto específico, o la inserción de al menos un resto de aminoácido adyacente al resto especificado. Inserción “adyacente” a un resto especificado significa inserción a una distancia de uno a dos restos del mismo. La inserción puede ser N terminal o C terminal del resto especificado. La modificación de aminoácidos preferida en el presente documento es una sustitución.

Un anticuerpo “madurado por afinidad” es uno con una o más alteraciones en una o más HVR del mismo que dan como resultado una mejora de la afinidad del anticuerpo con respecto a antígeno, en comparación con un anticuerpo parental que no posee esa alteración o esas alteraciones. En una realización, un anticuerpo madurado por afinidad tiene afinidades nanomolares o incluso picomolares por el antígeno diana. Los anticuerpos madurados por afinidad se producen por procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, Marks *et al.*, Biotechnology 10: 779-783 (1992) describe maduración por afinidad por redistribución de dominio VH y VL. Se describe mutagénesis aleatoria de restos de HVR y/o marco conservado en, por ejemplo: Barbas *et al.* Proc Nat. Acad. Sci. USA 91: 3809-3813 (1994); Schier *et al.* Gene 169: 147-155 (1995); Yelton *et al.* J. Immunol. 155: 1994-2004 (1995); Jackson *et al.*, J. Immunol. 154(7): 3310-9 (1995); y Hawkins *et al.*, J. Mol. Biol. 226: 889-896 (1992).

Un anticuerpo que “se une específicamente con” o es “específico para” un polipéptido particular o un epítipo en un polipéptido particular es uno que se une con ese polipéptido o epítipo particular en un polipéptido particular sin unirse sustancialmente con ningún otro polipéptido o epítipo polipeptídico. Por ejemplo, los anticuerpos específicos de M1’ de la presente invención son específicos del segmento extracelular M1’ de IgE hallado en IgE unido en linfocitos B, pero que no está presente en IgE secretado.

Un anticuerpo “de bloqueo” o un anticuerpo “antagonista” es uno que inhibe o reduce una actividad biológica del antígeno con el que se une. En algunas realizaciones, los anticuerpos de bloqueo o anticuerpos antagonistas inhiben sustancial o completamente la actividad biológica del antígeno. Los anticuerpos anti IgE apoptóticos de la invención bloquean la actividad de IgE en la mediación de la respuesta inmunitaria de tal manera que reducen IgE tanto en suero libre como en suero total.

Los anticuerpos que “inducen la apoptosis” o son “apoptóticos” son los que inducen la muerte celular programada como se determina por ensayos de apoptosis convencionales, tales como unión de anexina V, fragmentación de ADN, contracción celular, dilatación del retículo endoplásmico, fragmentación celular y/o formación de vesículas de membrana (denominados cuerpos apoptóticos). Por ejemplo, la actividad apoptótica de los anticuerpos anti IgE de la presente invención puede mostrarse por tinción de células con IgE unida a superficie con anexina V.

La expresión “IgE en suero total” se refiere a una cantidad total de IgE presente en una muestra, incluyendo tanto libre o no unido, como IgE que está en complejo con un compañero de unión (por ejemplo, anticuerpo anti IgE, linfocito B portador de IgE). IgE en suero libre se refiere a IgE que no está unido a un compañero de unión.

La expresión “IgE específico de alérgeno” se refiere a IgE que es específico de un antígeno particular, resultante de una exposición inicial a alérgeno en un proceso conocido como sensibilización de alergia, y que se une con la superficie de mastocitos y basófilos y que puede dar como resultado la activación de mastocitos y basófilos tras su exposición posterior al mismo alérgeno. Varios factores mitogénicos en virus (por ejemplo, Citomegalovirus - CMV), bacterias (por ejemplo, *Staphylococcus*), helmintos (por ejemplo, *Ascaris*, *Schistosoma*) y factores adyuvantes en la polución aérea (por ejemplo, humo de cigarrillos y gases de gasóleo) estimulan la producción de moléculas de IgE sin iniciar ninguna sensibilización de IgE específica de alérgeno. Por lo tanto, debido a que los niveles de IgE pueden elevarse de manera que no predispongan necesariamente al hospedador a hacerse más susceptible a un trastorno mediado por IgE, los niveles de IgE específicos de alérgeno se usan en ocasiones en evaluaciones clínicas.

La expresión “*agotan específicamente linfocitos B productores de IgE*” significa la capacidad de reducir específicamente la población o eficacia de linfocitos B que secretan específicamente IgE (es decir, células plasmáticas), pero que no afecta significativamente a la población o eficacia de linfocitos B que secretan otras inmunoglobulinas, tales como IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgM.

La expresión “*fase sólida*” describe una matriz no acuosa a la que puede adherirse el anticuerpo de la presente invención. Los ejemplos de fases sólidas abarcadas en el presente documento incluyen las formadas parcial o completamente de vidrio (por ejemplo vidrio poroso controlado), polisacáridos (por ejemplo, agarosa), poliacrilamidas, poliestireno, alcohol polivinílico y siliconas. En ciertas realizaciones, dependiendo del contexto, la fase sólida puede comprender el pocillo de una placa de ensayo; en otras es una columna de purificación (por ejemplo, una columna de cromatografía de afinidad). Esta expresión también incluye una fase sólida discontinua de partículas discretas, tales como las descritas en la Patente de Estados Unidos N° 4.275.149.

Las “*funciones efectoras*” del anticuerpo se refieren a las actividades biológicas que se pueden atribuir a la región Fc (una región Fc de secuencia nativa o región Fc variante de secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo, y varían con el isotipo de anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen: unión de C1q y citotoxicidad dependiente de complemento; unión del receptor de Fc; citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpo (ADCC); fagocitosis; regulación negativa de los receptores de superficie celular (por ejemplo, receptores de linfocitos B); y activación de linfocitos B.

La “*citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo*” o ADCC se refiere a una forma de citotoxicidad en la que Ig secretado unido a receptores de Fc (FcR) presentes en ciertas células citotóxicas (por ejemplo, linfocitos citolíticos naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) permite que estas células efectoras citotóxicas se unan específicamente con una célula diana portadora de antígenos y posteriormente destruyan la célula diana con citotoxinas. Los anticuerpos “*arman*” las células citotóxicas y se requieren para destruir la célula diana por este mecanismo. Las células primarias para mediar en ADCC, los linfocitos NK, expresan FcγRIII solamente, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de Fc en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 457-92 (1991). Para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés, puede realizarse un ensayo de ADCC *in vitro*, tal como el descrito en la Patente de Estados Unidos N° 5.500.362 o 5.821.337. Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos naturales (NK). Como alternativa, o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el desvelado en Clynes *et al.*, PNAS USA 95: 652-656 (1998).

A no ser que se indique de otro modo en el presente documento, la numeración de los restos en una cadena pesada de inmunoglobulina es la del índice de EU como en Kabat *et al.*, mencionado anteriormente. El “índice de EU como en Kabat” se refiere a la numeración de restos del anticuerpo EU IgG1 humano.

La expresión “*región Fc*” en el presente documento se usa para definir una región C terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina, incluyendo regiones Fc de secuencia nativa y regiones Fc variantes. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina podrían variar, se define habitualmente que la región Fc de cadena pesada de IgG humana se extiende desde un resto de aminoácido en la posición Cys226, o desde Pro230, al extremo carboxilo terminal de la misma. La lisina C terminal (resto 447 de acuerdo con el sistema de numeración de EU) de la región Fc puede retirarse, por ejemplo, durante la producción o purificación del anticuerpo, o por modificación por ingeniería recombinante del ácido nucleico de acuerdo con una cadena pesada del anticuerpo. En consecuencia, una composición de anticuerpos intactos puede comprender poblaciones de anticuerpos con todos los restos K447 retirados, poblaciones de anticuerpos sin restos K447 retirados, y poblaciones de anticuerpos que tienen una mezcla de anticuerpos con y sin el resto K447. Las regiones Fc de secuencia nativa adecuadas para su uso en los anticuerpos de la invención incluyen IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humanos.

El “*receptor de Fc*” o “*FcR*” describe un receptor que se une con la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es un FcR humano de secuencia nativa. Además, un FcR preferido es uno que se une con un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, incluyendo variantes alélicas y formas de corte y empalme alternativo de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un “receptor activador”) y FcγRIIB (un “receptor inhibidor”), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplasmáticos de los mismos. El receptor activador FcγRIIA contiene un motivo de activación basado en tirosina de inmunorreceptor (ITAM) en su dominio citoplasmático. El receptor inhibidor FcγRIIB contiene un motivo de inhibición basado en tirosina de inmunorreceptor (ITM) en su dominio citoplasmático. (Véase M. Daëron, Annu. Rev. Immunol. 15: 203-234 (1997)). Los FcR se revisan en Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 457-92 (1991); Capel *et al.*, Immunomethods 4: 25-34 (1994); y de Haas *et al.*, J. Lab. Clin. Med. 126: 330-41 (1995). Otros FcR, incluyendo los que se identifiquen en el futuro, están abarcados por el término “FcR” en el presente documento.

La expresión “*receptor de Fc*” o “*FcR*” también incluye el receptor neonatal, *FcRn*, que es responsable de la transferencia de IgG maternos al feto. Guyer *et al.*, J. Immunol. 117: 587 (1976) y Kim *et al.*, J. Immunol. 24: 249

(1994). Se conocen métodos para medir la unión con FcRn (véase, por ejemplo, Ghetie y Ward, *Immunol. Today* 18: (12): 592-8 (1997); Ghetie *et al.*, *Nature Biotechnology* 15 (7): 637-40 (1997); Hinton *et al.*, *J. Biol. Chem.* 279 (8): 6213-6 (2004); documento WO 2004/92219 (Hinton *et al.*).

La unión con FcRn *in vivo* y la semivida en suero de polipéptidos de unión de alta afinidad con FcRn humano pueden ensayarse, por ejemplo, en ratones transgénicos o líneas celulares humanas transfectadas que expresan FcRn humano, o en primates a los que se administran los polipéptidos que tienen una región Fc variante. El documento WO 2004/42072 (Presta) describe variantes de anticuerpo que mejoraron o redujeron la unión con FcR. Véase también, por ejemplo, Shields *et al.*, *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001).

Las "células efectoras humanas" son leucocitos que expresan uno o más FcR y realizan funciones efectoras. Preferentemente, las células expresan al menos FcγRIII y realizan función efectora de ADCC. Los ejemplos de leucocitos humanos que median en ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), linfocitos citotóxicos naturales (NK), monocitos, linfocitos T citotóxicos y neutrófilos, prefiriéndose PBMC y células MNK. Las células efectoras pueden aislarse de una fuente nativa, por ejemplo, sangre.

La "citotoxicidad dependiente de complemento" o "CDC" se refiere a la lisis de una célula diana en presencia de complemento. La activación de la ruta del complemento clásica se inicia mediante la unión del primer componente del sistema de complemento (C1q) con anticuerpos (de la subclase apropiada) que se unen con su antígeno afin. Para evaluar la activación del complemento, puede realizarse un ensayo de CDC, por ejemplo, como se describe en Gazzano-Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods* 202: 163 (1996).

Se describen variantes polipeptídicas con secuencias de aminoácidos de región Fc alteradas y capacidad de unión a C1q aumentada o reducida en la patente de Estados Unidos N° 6.194.551B1 y el documento WO99/51642. Los contenidos de estas publicaciones de patentes se incorporan específicamente en el presente documento por referencia. Véase, también, Idusogie *et al.* *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

El sitio de glucosilación N en IgG está en Asn297 en el dominio CH2. La presente invención también proporciona composiciones de un anticuerpo humanizado, de unión a CD20, que tiene una región Fc, en el que aproximadamente el 80-100 % (y preferentemente aproximadamente el 90-99 %) del anticuerpo en la composición comprende una estructura de carbohidratos central madura que carece de fucosa, unida con la región Fc de la glucoproteína. Se ha demostrado en el presente documento que dichas composiciones muestran una mejora sorprendente de la unión con FcγRIIIA(F158), que no es tan eficaz como FcγRIIIA (V158) en la interacción con IgG humano. Por lo tanto, se anticipa que las composiciones del presente documento son superiores a composiciones de anticuerpo anti CD20 previamente descritas, especialmente para la terapia de pacientes humanos que expresan FcγRIIIA (F158). FcγRIIIA (F158) es más común que FcγRIIIA (V158) en Afroamericanos y Caucásicos normales, sanos. Véase Lehrbecher *et al.* *Blood* 94: 4220 (1999). La presente solucitud demuestra además el aumento sinérgico en la unión de FcγRIII y/o función de ADCC que resulta de la combinación de las variantes de glucosilación en el presente documento con modificación o modificaciones de secuencia de aminoácidos en la región Fc de la glucoproteína.

La "afinidad de unión" se refiere en general a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su compañero de unión (por ejemplo, un antígeno). A no ser que se indique otra cosa, como se usa en el presente documento, "afinidad de unión" se refiere a afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su compañero Y puede en general representarse por la constante de disociación (*K_d*). La afinidad puede medirse por métodos comunes conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en el presente documento. Los anticuerpos de baja afinidad generalmente se unen con el antígeno lentamente y tienden a disociarse fácilmente, mientras que los anticuerpos de alta afinidad generalmente se unen con el antígeno más rápidamente y tienden a permanecer unidos más tiempo. Se conoce en la técnica diversos métodos para medir la afinidad de unión, cualquiera de los cuales puede usarse para fines de la presente invención. Se describen realizaciones ilustrativas y ejemplares específicas para medir la afinidad de unión a continuación.

En una realización, la "*K_d*" o "*valor K_d*" de acuerdo con la presente invención se mide por un ensayo de unión a antígeno radiomarcado (RIA) realizado con la versión Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno como se describe por el siguiente ensayo. Se mide la afinidad de unión a solución de Fab equilibrando Fab con una concentración mínima de antígeno marcado con (¹²⁵I) en presencia de una serie de valoración de antígeno no marcado, capturando después antígeno unido con una placa recubierta de anticuerpo anti Fab (véase, por ejemplo, Chen *et al.*, *J. Mol. Biol.* 293: 865-881 (1999)). Para establecer las condiciones para el ensayo, se recubren placas de microtitulación (DYNEX Technologies, Inc.) durante una noche con 5 µg/ml de un anticuerpo anti Fab de captura (Cappel Labs) en carbonato sódico 50 mM (pH 9,6), y posteriormente se bloquean con albúmina de suero bovino al 2 % (p/v) en PBS durante dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23 °C). En una placa no adsorbente (Nunc N° 269620), se mezcla [¹²⁵I]-antígeno 100 pM o 26 pM con diluciones en serie de un Fab de interés (por ejemplo, coherente con la evaluación del anticuerpo anti VEGF, Fab-12, en Presta *et al.*, *Cancer Res.* 57: 4593-4599 (1997)). El Fab de interés se incubaba después durante una noche; sin embargo, la incubación puede

continuar durante un periodo más largo (por ejemplo, aproximadamente 65 horas) para asegurar que se alcance el equilibrio. A continuación, las mezclas se transfieren a la placa de captura para incubación a temperatura ambiente (por ejemplo, durante una hora). Después se retira la solución y la placa se lava ocho veces con tensioactivo TWEEN-20™ 0,1 % en PBS. Cuando las placas se han secado, se añaden 150 µl/pocillo de agente de centelleo (MICROSCINT-20™; Packard), y las placas se cuentan en un contador gamma TOPCOUNT™ (Packard) durante diez minutos. Se eligen las concentraciones de cada Fab que proporcionan menos de o igual al 20 % de unión máxima para su uso en ensayos de unión competitiva.

De acuerdo con otra realización, la K_d se mide usando ensayos de resonancia de plasmón superficial usando un instrumento BIACORE®-2000 o un BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25 °C con microplacas CM5 con antígeno inmovilizado a ~10 unidades de respuesta (UR). Brevemente, se activan microplacas biosensoras de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore Inc.) con clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con acetato sódico 10 mM, pH 4,8, hasta 5 µg/ml (~0,2 µM) antes de la inyección a un caudal de 5 µl/minuto para conseguir aproximadamente 10 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Después de la inyección del antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos que no han reaccionado. Para mediciones cinéticas, se inyectan diluciones en serie dos veces de Fab (0,78 nM a 500 nM) en PBS con tensioactivo TWEEN 20™ 0,05 % (PBST) a 25 °C a un caudal de aproximadamente 25 µl/min. Se calculan las velocidades de asociación (k_{on}) y velocidades de disociación (k_{off}) usando un modelo de unión de Langmuir uno a uno sencillo (Software de Evaluación BIAcore® versión 3.2) ajustando simultáneamente los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación en equilibrio (K_d) se calcula como la relación k_{off}/k_{on} . Véase, por ejemplo, Chen *et al.*, J. Mol. Biol. 293: 865-881 (1999). Si la velocidad de asociación excede $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ por el ensayo de resonancia de plasmón superficial anterior, entonces la velocidad de asociación puede determinarse usando una técnica de interrupción fluorescente que mide el aumento o la reducción en la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, paso de banda de 16 nm) a 25 °C de un anticuerpo anti antígeno 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de antígeno como se mide en un espectrómetro, tal como espectrofotómetro equipado con detención-flujo (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM-AMINCO™ serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada.

Una “velocidad de asociación” o “ k_{on} ” de la presente invención también puede determinarse como se ha descrito anteriormente usando un sistema BIACORE®-2000 o un BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ).

La frase “sustancialmente reducido” o “sustancialmente diferente” como se usa en el presente documento, indica un grado suficientemente alto de diferencia entre dos valores numéricos (generalmente uno asociado con una molécula y el otro asociado con una molécula de referencia/comparadora) de modo que un experto en la materia consideraría la diferencia entre los dos valores estadísticamente significativa dentro del contexto de la característica biológica medida por dichos valores (por ejemplo, valores K_d). La diferencia entre dichos dos valores es, por ejemplo, mayor de aproximadamente 10 %, mayor de aproximadamente 20 %, mayor de aproximadamente 30 %, mayor de aproximadamente 40 % y/o mayor de aproximadamente 50 % en función del valor para la molécula de referencia/comparadora.

La expresión “sustancialmente similar” o “sustancialmente igual,” como se usa en el presente documento, indica un grado suficientemente alto de similitud entre dos valores numéricos (por ejemplo, uno asociado con un anticuerpo de la invención y el otro asociado con un anticuerpo de referencia/comparador), de modo que un experto en la materia consideraría que la diferencia entre los dos valores tiene poca o ninguna significación estadística y/o biológica dentro del contexto de la característica biológica medida por dichos valores (por ejemplo, valores K_d). La diferencia entre dichos dos valores es, por ejemplo, menor de aproximadamente 50 %, menor de aproximadamente 40 %, menor de aproximadamente 30 %, menor de aproximadamente 20 % y/o menor de aproximadamente 10 % en función del valor de referencia/comparador.

El “Porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos” y la “homología” con respecto a una secuencia peptídica, polipeptídica o de anticuerpo se define como el porcentaje de restos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los restos de aminoácidos en la secuencia peptídica o polipeptídica específica, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. El alineamiento para los fines de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos puede conseguirse de diversas maneras que están dentro de la experiencia de la técnica, por ejemplo, usando software informático disponible públicamente tal como software BLAST, BLAST-2, ALIGN o MEGALIGN™ (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar los parámetros apropiados para medir el alineamiento, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir el alineamiento máximo sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan. Para fines del presente documento, sin embargo, los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos se generan usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2, creado por Genentech, Inc. El código fuente de ALIGN-2 se ha presentado con la documentación de usuario en la Oficina de Derechos de Autor de los Estados Unidos, Washington D. C., 20559, en la que está registrado con el N° de Registro de Derechos de Autor de Estados Unidos TXU510087. El programa ALIGN-2 está públicamente disponible a través de Genentech, Inc., South San Francisco, California. El programa ALIGN-2 debería compilarse para su uso en un

sistema operativo UNIX, preferentemente UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias se establecen por el programa ALIGN-2 y no varían.

En situaciones en las que se emplea ALIGN-2 para comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencias de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos dada A para, con o frente a una secuencia de aminoácidos dada B (que puede como alternativa nombrarse una secuencia de aminoácidos dada A que tiene o comprende un cierto % de identidad de secuencia de aminoácidos para, con o hacia una secuencia de aminoácidos dada B) se calcula de la siguiente manera:

100 por la fracción X/Y

en la que X es el número de restos de aminoácidos puntuados como coincidencias idénticas por el programa de alineamiento de secuencias ALIGN-2 en el alineamiento de ese programa de A y B, y en la que Y es el número total de restos de aminoácidos en B. Se apreciará que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de A con respecto a B no será igual al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B con respecto a A.

A no ser que se indique específicamente de otro modo, todos los valores del % de identidad de secuencia de aminoácidos usados en el presente documento se obtienen como se ha descrito en el párrafo inmediatamente precedente usando el programa informático ALIGN-2.

Una molécula de ácido nucleico "*aislada*" que codifica los anticuerpos en el presente documento es una molécula de ácido nucleico que se identifica y separa de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que está asociada habitualmente en el ambiente en el que se produjo. Preferentemente, el ácido nucleico aislado está libre de asociación con todos los componentes asociados con el ambiente de producción. Las moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican los polipéptidos y anticuerpos en el presente documento están en una forma distinta de la forma o entorno en el que se encuentran en la naturaleza. Las moléculas de ácido nucleico aisladas se distinguen por lo tanto del ácido nucleico que codifica los polipéptidos y anticuerpos en el presente documento que existen de forma natural en las células.

La expresión "*secuencias de control*" se refiere a las secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante unida operativamente en un organismo hospedador particular. Las secuencias de control que son adecuadas para procariontes, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de unión a ribosomas. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.

El ácido nucleico está "*unido operativamente*" cuando se sitúa en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o líder secretor está unido operativamente con ADN para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está unido operativamente con una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosomas está unido operativamente con una secuencia codificante si está situado de forma que facilite la traducción. Generalmente, "unido operativamente" significa que las secuencias de ADN que están unidas son contiguas y, en el caso de un líder secretor, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, no es necesario que los potenciadores sean contiguos. Se consigue enlace por ligamiento en sitios de restricción convenientes. Si no existen dichos sitios, los adaptadores oligonucleotídicos sintéticos o enlazadores se usan de acuerdo con la práctica convencional.

La expresión "*marcado con epítipo*" cuando se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido quimérico que comprende un polipéptido o anticuerpo descrito en el presente documento fusionado con un "polipéptido marcador". El polipéptido marcador tiene suficientes restos para proporcionar un epítipo contra el que puede realizarse un anticuerpo, pero es suficientemente corto para que no interfiera con la actividad del polipéptido con el que se fusiona. El polipéptido marcador preferentemente también es bastante único de modo que el anticuerpo no reaccione sustancialmente de forma cruzada con otros epítopos. Los polipéptidos marcadores adecuados generalmente tienen al menos seis restos de aminoácidos y habitualmente entre 8 y 50 restos de aminoácidos (preferentemente, entre aproximadamente 10 y 20 restos de aminoácidos).

Como se usa en el presente documento, el término "*inmuno adhesina*" designa moléculas de tipo anticuerpo que combinan la especificidad de unión de una proteína heteróloga (una "adhesión") con las funciones efectoras de dominios constantes de inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmuno adhesinas comprenden una fusión de una secuencia de aminoácidos con la especificidad de unión deseada que es distinta del sitio de reconocimiento y unión de antígeno de un anticuerpo (es decir, es "heteróloga"), y una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina. La parte de adhesina de una molécula de inmuno adhesina normalmente es una secuencia de aminoácidos contigua que comprende al menos el sitio de unión de un receptor o un ligando. La secuencia de dominio constante de inmunoglobulina en la inmuno adhesina puede obtenerse de cualquier inmunoglobulina, tal como subtipos IgG-1, IgG-2, IgG-3 o IgG-4, IgA (incluyendo IgA-1 e IgA-2), IgE, IgD o IgM. Las fusiones de Ig preferentemente incluyen la sustitución de un dominio de un polipéptido o anticuerpo descrito en el presente documento en lugar de al menos

una región variable dentro de una molécula de Ig. En una realización particularmente preferida, la fusión de inmunoglobulina incluye las regiones bisagra, CH2 y CH3, o la bisagra, CH1, CH2 y CH3 de una molécula de IgG1. Para la producción de fusiones de inmunoglobulina véase también la Patente de Estados Unidos N° 5.428.130 expedida el 27 de junio de 1995. Por ejemplo, las inmunoadhesinas útiles como segundos medicamentos útiles para la terapia de combinación en el presente documento incluyen polipéptidos que comprenden las partes de unión a BLYS de un receptor de BLYS sin la transmembrana de BR3, TACI o BCMA se fusiona con un dominio constante de una secuencia de inmunoglobulina.

Una “*proteína de fusión*” y un “*polipéptido de fusión*” se refieren a un polipéptido que tiene dos partes unidas covalentemente entre sí, en el que cada una de las partes es un polipéptido que tiene una propiedad diferente. La propiedad puede ser una propiedad biológica, tal como actividad *in vitro* o *in vivo*. La propiedad también puede ser una propiedad química o física sencilla, tal como unión con una molécula diana, catálisis de una reacción, etc. Las dos partes pueden unirse directamente por un enlace peptídico sencillo o mediante un enlazador peptídico estarán en fase de lectura entre sí.

Una formulación “*estable*” es una en la que la proteína de la misma esencialmente conserva su estabilidad física y química y su integridad tras el almacenamiento. Están disponibles en este campo diversas técnicas analíticas para medir la estabilidad proteica y se revisan en Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, Nueva York, Pubs. (1991) y Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90 (1993). La estabilidad puede medirse a una temperatura seleccionada durante un periodo de tiempo seleccionado. Para exploración rápida, la formulación puede mantenerse a 40 °C durante 2 semanas a 1 mes, momento en el cual se mide la estabilidad. Cuando la formulación va a almacenarse a 2-8 °C, generalmente la formulación debería ser estable a 30 °C o 40 °C durante al menos 1 mes y/o estable a 2-8 °C durante al menos 2 años. Cuando la formulación va a almacenarse a 30 °C, generalmente la formulación debería ser estable durante al menos 2 años a 30 °C y/o estable a 40 °C durante al menos 6 meses. Por ejemplo, el alcance de la agregación durante el almacenamiento puede usarse como un indicador de la estabilidad proteica. Por lo tanto, una formulación “estable” puede ser una en la que menos de aproximadamente el 10 % y preferentemente menos de aproximadamente el 5 % de la proteína están presentes como un agregado en la formulación. En otras realizaciones, puede determinarse cualquier aumento en la formación de agregados durante el almacenamiento de la formulación.

Una formulación “*reconstituida*” es una que se ha preparado disolviendo una proteína liofilizada o formulación de anticuerpo en un diluyente de modo que la proteína se dispersa por toda ella. La formulación reconstituida es adecuada para administración (por ejemplo, administración parenteral) a un paciente para tratar con la proteína de interés y, en ciertas realizaciones de la invención, puede ser una que sea adecuada para administración subcutánea.

Una formulación “*isotónica*” es una que tiene esencialmente la misma presión osmótica que la sangre humana. Las formulaciones isotónicas generalmente tendrán una presión osmótica de aproximadamente 250 a 350 mOsm. El término “hipotónico” describe una formulación con una presión osmótica por debajo de la de la sangre humana. En consecuencia, el término “hipertónico” se usa para describir una formulación con una presión osmótica por encima de la de la sangre humana. La isotonicidad puede medirse usando un osmómetro de presión de vapor o de tipo congelación en hielo, por ejemplo. Las formulaciones de la presente invención son hipertónicas como resultado de la adición de sal y/o tampón.

Los “*vehículos*” como se usan en el presente documento incluyen vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables que no son tóxicos para la célula o el mamífero que se expone a los mismos a las dosificaciones y concentraciones empleadas. Con frecuencia el vehículo fisiológicamente aceptable es una solución de pH tamponado acuosa. Los ejemplos de vehículos fisiológicamente aceptables incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcares tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, polietilenglicol (PEG) y PLURONICS™.

Un “*prospecto*” se refiere a instrucciones incluidas habitualmente en envases comerciales de medicamentos que contienen información acerca de las instrucciones, uso, dosificación, administración, contraindicaciones, otros medicamentos para combinar con el producto envasado y/o advertencias con respecto al uso de dichos medicamentos, etc.

Un “*ácido farmacéuticamente aceptable*” incluye ácidos orgánicos e inorgánicos que no son tóxicos a la concentración y de la manera en que se formulan. Por ejemplo, los ácidos inorgánicos adecuados incluyen clorhídrico, perclórico, bromhídrico, yodhídrico, nítrico, sulfúrico, sulfónico, sulfínico, sulfanílico, fosfórico, carbónico, etc. Los ácidos orgánicos adecuados incluyen alquilo de cadena sencilla y ramificada, aromático, cíclico, cicloalifático, arilalifático, heterocíclico, saturado, insaturado, mono, di y tricarbóxico, incluyendo, por ejemplo, fórmico, acético, 2-hidroxiacético, trifluoroacético, fenilacético, trimetilacético, t-butil acético, antranílico, propanoico,

2-hidroxiopropanoico, 2-oxopropanoico, propandioico, ciclopentano propiónico, ciclopentano propiónico, 3-fenilpropiónico, butanoico, butanodioico, benzoico, 3-(4-hidroxibenzoil)benzoico, 2-acetoxi-benzoico, ascórbico, cinámico, lauril sulfúrico, esteárico, mucónico, mandélico, succínico, embónico, fumárico, málico, maleico, hidroximaleico, malónico, láctico, cítrico, tartárico, glicólico, glicónico, glucónico, pirúvico, glioxálico, oxálico, mesílico, succínico, salicílico, ftálico, palmoico, palmeico, tiociánico, metanosulfónico, etanosulfónico, 1,2-etanodisulfónico, 2-hidroxietanosulfónico, bencenosulfónico, 4-corobencenosulfónico, naftaleno-2-sulfónico, *p*-toluenosulfónico, canforsulfónico, 4-metilbicio[2.2.2]-oct-2-en-1-carboxílico, glucoheptónico, 4,4'-metilenbis-3-(hidroxi-2-en-1-carboxílico), hidroxinaftoico.

Las “*bases farmacéuticamente aceptables*” incluyen bases orgánicas e inorgánicas que no son tóxicas a la concentración y de la manera en que se formulan. Por ejemplo, las bases adecuadas incluyen las formadas a partir de metales formadores de bases inorgánicas tales como litio, sodio, potasio, magnesio, calcio, amonio, hierro, cinc, cobre, manganeso, aluminio, N-metilglucamina, morfina, piperidina y bases no tóxicas orgánicas incluyendo aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas, aminas cíclicas y resinas de intercambio iónico básicas, [por ejemplo, $N(R')_4^+$ (en la que R' es independientemente H o alquilo C₁₋₄, por ejemplo, amonio, Tris)], por ejemplo, isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina, etanolamina, 2-dietilaminoetanol, trimetamina, diciclohexilamina, lisina, arginina, histidina, cafeína, procaína, hidrabamina, colina, betaína, etilendiamina, glucosamina, metilglucamina, teobromina, purinas, piperazina, piperidina, N-etilpiperidina, resinas de poliaminas y similares. Son bases no tóxicas orgánicas particularmente preferidas isopropilamina, dietilamina, etanolamina, trimetamina, diciclohexilamina, colina y cafeína.

Los ácidos y bases adicionales farmacéuticamente aceptables que pueden utilizarse con la presente invención incluyendo los que derivan de los aminoácidos, por ejemplo, histidina, glicina, fenilalanina, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina y asparagina.

Los tampones y sales “*farmacéuticamente aceptables*” incluyen los derivados de sales de adición tanto de ácidos como de bases de los ácidos y bases anteriormente indicados. Los tampones y/o sales específicos incluyen histidina, succinato y acetato.

Un “*azúcar farmacéuticamente aceptable*” es una molécula que, cuando se combina con una proteína de interés, previene o reduce significativamente la inestabilidad química y/o física de la proteína tras su almacenamiento. Cuando se pretende que la formulación se liofilice y después se reconstituya, los “*azúcares farmacéuticamente aceptables*” también pueden conocerse como “*lioprotectores*”. Los azúcares ejemplares y sus alcoholes de azúcares correspondientes incluyen: un aminoácido tal como glutamato monosódico o histidina; una metilamina tal como betaína; una sal liotrópica tal como sulfato de magnesio; un poliol tal como alcoholes de azúcares trihídricos o de mayor peso molecular, por ejemplo, glicerina, dextrano, eritritol, glicerol, arabitól, xilitol, sorbitol y manitol; propilenglicol; polietilenglicol; PLURONICS®; y combinaciones de los mismos. Los lioprotectores ejemplares adicionales incluyen glicerina y gelatina, y los azúcares melibiosa, melezitosa, rafinosa, manotriosa y estaquiosa. Los ejemplos de azúcares reductores incluyen glucosa, maltosa, lactosa, maltulosa, iso-maltulosa y lactulosa. Los ejemplos de azúcares no reductores incluyen glucósidos no reductores de compuestos de polihidroxi seleccionados de alcoholes de azúcares y otros polialcoholes de cadena sencilla. Son alcoholes de azúcares preferidos los monoglucósidos, especialmente los compuestos obtenidos por reducción de disacáridos tales como lactosa, maltosa, lactulosa y maltulosa. El grupo lateral glicosídico puede ser glucosídico o galactosídico. Son ejemplos adicionales de alcoholes de azúcares glucitol, maltitol, lactitol e isomaltulosa. Los azúcares farmacéuticamente aceptables preferidos son los azúcares no reductores trehalosa o sacarosa. Se añaden azúcares farmacéuticamente aceptables a la formulación en una “*cantidad protectora*” (por ejemplo, preliofilización) lo que significa que la proteína esencialmente conserva su estabilidad física y química e integridad durante el almacenamiento (por ejemplo, después de reconstitución y almacenamiento).

El “*diluyente*” de interés es uno que es farmacéuticamente aceptable (seguro y no tóxico para la administración a un ser humano) y es útil para la preparación de una formulación líquida, tal como una formulación reconstituida después de liofilización. Los diluyentes ejemplares incluyen agua estéril, agua bacteriostática para inyección (BWI), una solución de pH tamponado (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato), solución salina estéril, solución de Ringer o solución de dextrosa. En una realización alternativa, los diluyentes pueden incluir soluciones acuosas de sales y/o tampones.

Un “*conservante*” es un compuesto que puede añadirse a las formulaciones del presente documento para reducir la actividad bacteriana. La adición de un conservante puede, por ejemplo, facilitar la producción de una formulación multiusos (de dosis múltiple). Los ejemplos de conservantes potenciales incluyen cloruro de octadecildimetilbencil amonio, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio (una mezcla de cloruros de alquilbencildimetilamonio en la que los grupos alquilo son compuestos de cadena larga), y cloruro de bencetonio. Otros tipos de conservantes incluyen alcoholes aromáticos tales como fenol, alcohol butílico y bencílico, alquil parabenos tales como metilo o propil parabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol y *m*-cresol. El conservante más preferido en el presente documento es alcohol bencílico.

El “*tratamiento*” se refiere a la intervención clínica diseñada para alterar la evolución natural del individuo o célula

que se trate, y puede realizarse bien para profilaxis o durante el transcurso de la patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen evitar la aparición o reaparición de enfermedad, evitar la metástasis, reducir la velocidad de progresión de la enfermedad, aliviar o paliar la patología y remisión o pronóstico mejorado. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención se usan para retardar el desarrollo de una enfermedad o trastorno. Un sujeto se “trata” de forma exitosa, por ejemplo, usando los anticuerpos anti IgE apoptóticos de la invención si uno o más síntomas asociados con un trastorno mediado por IgE se mitigan.

Una “*cantidad eficaz*” se refiere a al menos una cantidad eficaz, en dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el efecto deseado o indicado, incluyendo un resultado terapéutico o profiláctico.

Una “*cantidad terapéuticamente eficaz*” es al menos la concentración mínima requerida para efectuar una mejora medible o prevención de un trastorno particular. Una cantidad terapéuticamente eficaz en el presente documento puede variar de acuerdo con factores tales como la patología, edad, sexo y peso del paciente, y la capacidad del anticuerpo para inducir una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo se compensa por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una “*cantidad profilácticamente eficaz*” se refiere a una cantidad eficaz, a las dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado profiláctico deseado. Normalmente, pero no necesariamente, dado que se usa una dosis profiláctica en sujetos antes de o en el estadio más temprano de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz puede ser menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

La administración “*crónica*” se refiere a una administración del medicamento o los medicamentos en un modo continuo a diferencia de agudo, para mantener el efecto terapéutico inicial (actividad) durante un periodo de tiempo prolongado. La administración “*intermitente*” es tratamiento que no se realiza de forma consecutiva sin interrupción, sino que es más bien de naturaleza cíclica.

“*Mamífero*” para los fines de tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo seres humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológicos, deportivos o mascotas, tales como perros, caballos, conejos, vacas, cerdos, hámsteres, gerbos, ratones, hurones, ratas, gatos, etc. Preferentemente, el mamífero es un ser humano.

La expresión “*formulación farmacéutica*” se refiere a una preparación que está en tal forma que permite que la actividad biológica del principio activo sea eficaz, y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto al que se administraría la formulación. Dichas formulaciones son estériles.

Una formulación “*estéril*” es aséptica o libre de todos los microorganismos vivos y sus esporas.

El término “*aproximadamente*” como se usa en el presente documento se refiere al intervalo de error habitual para el valor respectivo fácilmente conocido por los expertos en este campo técnico.

Un “*antihistamínico*” como se usa en el presente documento es un agente que antagoniza el efecto fisiológico de la histamina. La unión de la histamina con sus receptores, H₁ y H₂ da como resultado los síntomas alérgicos característicos y efectos o prurito, enrojecimiento, hinchazón, etc. Muchos antihistamínicos actúan bloqueando la unión de la histamina con sus receptores, H₁, H₂; sin embargo se cree que otros actúan inhibiendo la liberación de histamina. Son ejemplos de antihistamínicos clorfeniramina, difenhidramina, prometacina, cromolina sódica, astemizol, maleato de azatadina, maleato de brofeniramina, maleato de carbinoxamina, clorhidrato de cetirizina, fumarato de clemastina, clorhidrato de ciproheptadina, maleato de dexbromfeniramina, maleato de dexclorfeniramina, dimenhidrinato, clorhidrato de difenhidramina, succinato de doxilamina, clorhidrato de fexofenadina, clorhidrato de terfenadina, clorhidrato de hidroxizina, loratidina, clorhidrato de meclizina, citrato de tripelannamina, clorhidrato de tripelennamina, clorhidrato de tripolidina.

Un “*broncodilatador*” como se usa en el presente documento, describe agentes que antagonizan o invierten la broncoconstricción, un acontecimiento fisiológico que se produce normalmente en reacciones asmáticas de fase temprana que da como resultado capacidad pulmonar reducida y apnea. Los broncodilatadores ejemplares incluyen epinefrina, un alfa y beta adrenérgico de acción amplia y los beta adrenérgicos, albuterol, pirbuterol, metaproterenol, salmeterol e isoetarina. La broncodilatación puede conseguirse mediante administración de xantinas, incluyendo aminofilina y teofilina.

Un “*glucocorticoide*” como se usa en el presente documento describe agentes de base esteroidea que tienen actividad antiinflamatoria. Se usan habitualmente glucocorticoides para atenuar la reacción asmática de fase tardía. Los glucocorticoides ejemplares incluyen prednisona, dipropionato de beclometasona, triamcinolona acetona, flunisolida, betametasona, budesonida, dexametasona, dexametasona tramcinolona, acetato de fludrocortisona, flunisolida, propionato de fluticasona, hidrocortisona, prednisolona [incluyendo metilprednisolona (por ejemplo, succinato sódico de metilprednisolona SOLU-MEDROL®)], y triamcinolona.

Un “*fármaco antiinflamatorio no esteroideo*” o “*AINE*” como se usa en el presente documento describe agentes que tienen actividad antiinflamatoria que no se basan en esteroides. Los AINE ejemplares incluyen acematacina, acetaminógeno, aspirina, azapropazona, benorilato, bromfenac sódico, inhibidores de ciclooxigenasa (COX)-2 tales como GR 253035, MK966, celecoxib (CELEBREX®; 4-(5-(4-metilfenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il) bencenosulfonamida) y valdecoxib (BEXTRA®), diclofenaco, diclofenaco retard, diclofenaco sódico, diflunisal, etodolac, fenbufeno, fenoprofeno cálcico, flurbiprofeno, ibuprofeno, ibuprofeno retard, indometacina, ketoprofeno, meclofenamato sódico, ácido mefenámico, meloxicam (MOBIC®), nabumetona, naproxeno, naproxeno sódico, oxifenbutazona, fenilbutazona, piroxicam, sulindaco, tenoxicam, ácido tiaprofénico, tolmetina, tolmetina sódica, incluyendo sales y derivados de los mismos, etc.

La expresión “*trastornos mediados por IgE*” incluye trastorno atópicos, que se caracterizan por una propensión heredada general a responder de forma inmunológica a muchos antígenos de origen natural habituales inhalados e ingeridos y la producción continuada de anticuerpos IgE. Los trastornos atópicos específicos incluyen asma alérgica, rinitis alérgica (conjuntivitis), dermatitis atópica, alergia alimentaria, anafilaxis, dermatitis de contacto, gastroenteropatía alérgica, aspergilosis broncopulmonar alérgica y púrpura alérgica (Henoch-Schönlein). Los pacientes atópicos con frecuencia tienen múltiples alergias, lo que significa que tienen anticuerpos IgE para, y síntomas de, muchos alérgenos ambientales, incluyendo alérgenos de temporada, perennes y ocupacionales. Los alérgenos de temporada ejemplares incluyen pólenes (por ejemplo, hierba, árbol, centeno, fleo, ambrosia), mientras que los alérgenos perennes ejemplares incluyen hongos (por ejemplo, mohos, esporas de mohos), plumas, residuos animales (por ejemplo, caspa de mascotas u otros animales) y de insectos (por ejemplo, ácaros del polvo). Los alérgenos ocupacionales ejemplares también incluyen antígenos animales (por ejemplo ratones) y vegetales así como fármacos, detergentes, metales e inmunopotenciadores tales como isocianatos. Los estímulos específicos no antigénicos que pueden dar como resultado una reacción mediada por IgE incluyen infección, irritantes tales como humo, gases de combustión, partículas de gases de gasóleo y dióxido de azufre, ejercicio, frío y tensión emocional. Las reacciones de hipersensibilidad específicas en individuos atópicos y no atópicos con un cierto fondo genético pueden resultar de exposición a proteínas en los alimentos (por ejemplo, legumbres, cacahuetes), veneno (por ejemplo, de insecto, serpiente), vacunas, hormonas, antisuero, enzimas, látex, antibióticos, relajantes musculares, vitaminas, citotoxinas, opiáceos y polisacáridos tales como dextrina, dextrano de hierro y poligelina.

Otros trastornos asociados con niveles de IgE elevados, que parecen estar mediados por IgE y también son tratables con las formulaciones de la presente invención incluyen: ataxia-telangiectasia, Síndrome de Churg-Strauss, eccema, enteritis, gastroenteropatía, reacción de injerto contra hospedador, síndrome de hiper IgE (de Job), hipersensibilidad (por ejemplo, hipersensibilidad anafiláctica, candidiasis, vasculitis), mieloma de IgE, enfermedad inflamatoria del intestino (por ejemplo enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, colitis indeterminada y colitis infecciosa), mucositis (por ejemplo, mucositis oral, mucositis gastrointestinal, mucositis nasal y proctitis), enterocolitis necrotizante y esofagitis, enfermedades parasitarias (por ejemplo, tripanosomiasis), vasculitis de hipersensibilidad, urticaria y síndrome de Wiskott-Aldrich.

Adicionalmente, los trastornos que pueden ser tratables reduciendo los niveles de IgE, independientemente de si los trastornos en sí mismos están asociados con IgE elevado, y por lo tanto se consideraría que están dentro del alcance de “*trastorno mediado por IgE*” incluyen: enfermedad de Addison (insuficiencia adrenocortical crónica), alopecia, angioedema hereditario, angioedema (enfermedad de Bannister, edema angioneurótico), espondilitis anquilosante, anemia aplásica, arteritis, amiloidosis, trastornos inmunitarios, tales como anemia hemolítica autoinmunitaria, ooforitis autoinmunitaria, orquitis autoinmunitaria, insuficiencia poliendocrina autoinmunitaria, anemia hemolítica autoinmunitaria, autoinmunocitopenia, glomerulonefritis autoinmunitaria, enfermedad de Behcet, bronquitis, enfermedad de Buerger, penfigoide ampolloso, síndrome de Caplan (neumoconiosis reumatoide), carditis, esprúe celíaco, síndrome de Chediak-Higashi, Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), síndrome de Cogan-Reese (síndrome endotelial iridocorneal), síndrome de CREST, dermatitis herpetiforme (enfermedad de Dühring), diabetes mellitus, fascitis eosinófila, nefritis eosinófila, epiescleritis, alveolitis alérgica extrínseca, poliserositis paroxística familiar, síndrome de Felty, alveolitis fibrosante, glomerulonefritis, síndrome de Goodpasture, granulocitopenia, granuloma, granulomatosis, miositis de granuloma, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barre (polineuritis), tiroiditis de Hashimoto (bocio linfadenóide), hemocromatosis, histiocitosis, síndrome hipereosinófilo, síndrome del intestino irritable, artritis juvenil, queratitis, lepra, lupus eritematoso, enfermedad de Lyell, enfermedad de Lyme, enfermedad del tejido conectivo mixta, mononeuritis, mononeuritis múltiple, síndrome de Muckle-Wells, síndrome linfóide mucocutáneo (enfermedad de Kawasaki), reticulohistiocitosis multicéntrica, esclerosis múltiple, miastenia grave, micosis fungoide, paniculitis, penfigoide, pénfigo, pericarditis, polineuritis, poliartritis nodosa, psoriasis, artritis psoriásica, artritis pulmonar, adenomatosis pulmonar, fibrosis pulmonar, policondritis recidivante, fiebre reumática, artritis reumatoide, rinosinusitis (sinusitis) sarcoidosis, escleritis, colangitis esclerosante, enfermedad del suero, síndrome de Sezary, síndrome de Sjögren, síndrome de Stevens-Johnson, mastocitosis sistémica, rechazo de trasplantes, púrpura trombocitopénica, alinfoplasia tímica, uveítis, vitiligo, granulomatosis de Wegener.

Un “*trastorno autoinmunitario*” en el presente documento es una enfermedad o trastorno que surge de y se dirige contra los tejidos u órganos propios de un individuo o una cosegregación o manifestación del mismo o afección resultante del mismo. En muchos de estos trastornos autoinmunitarios e inflamatorios, pueden existir varios marcadores clínicos y de laboratorio, incluyendo, pero sin limitación, hipergammaglobulinemia, altos niveles de

autoanticuerpos, depósitos de complejos antígeno-anticuerpo en tejidos, beneficio de los tratamientos con corticosteroides o inmunosupresores y agregados de células linfoides en tejidos aquejados. Sin quedar limitado a ninguna teoría con respecto al trastorno autoinmunitario mediado por linfocitos B, se cree que los linfocitos B demuestran un efecto patógeno en enfermedades autoinmunitarias humanas mediante una multitud de rutas mecánicas, incluyendo producción de autoanticuerpos, formación de complejos inmunitarios, activación de linfocitos T y células dendríticas, síntesis de citocinas, liberación de quimiocinas directa, y provisión de un nido para neoinfogénesis ectópica. Cada una de estas rutas puede participar en diferentes grados en la patología de enfermedades autoinmunitarias.

La “*enfermedad autoinmunitaria*” puede ser una enfermedad específica de órgano (es decir, la respuesta inmunitaria se dirige específicamente contra un sistema de órganos tal como el sistema endocrino, el sistema hematopoyético, la piel, el sistema cardiopulmonar, los sistemas gastrointestinal y hepático, el sistema renal, el tiroides, los oídos, el sistema neuromuscular, el sistema nervioso central, etc.) o una enfermedad sistémica que puede afectar a múltiples sistemas de órganos (por ejemplo, lupus eritematoso sistémico (SLE), artritis reumatoide (RA), polimiositis, etc.). Dichas enfermedades preferidas incluyen trastornos reumatológicos autoinmunitarios (tales como, por ejemplo, RA, síndrome de Sjögren, esclerodermia, lupus tal como SLE y nefritis lúpica, polimiositis-dermatomiositis, crioglobulinemia, síndrome de anticuerpos antifosfolípidos y artritis psoriásica), trastornos gastrointestinales y de hígado autoinmunitarios (tales como, por ejemplo enfermedades inflamatorias del intestino (por ejemplo, colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn), gastritis autoinmunitaria y anemia perniciosa, hepatitis autoinmunitaria, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria y enfermedad celíaca), vasculitis (tal como, por ejemplo, vasculitis negativa para ANCA y vasculitis asociada con ANCA, incluyendo vasculitis de Churg-Strauss, granulomatosis de Wegener y poliangitis microscópica), trastornos neurológicos autoinmunitarios (tales como, por ejemplo, esclerosis múltiple, síndrome de mioclono opsoclono, miastenia grave, neuromielitis óptica, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer y polineuropatías autoinmunitarias), trastornos renales (tales como, por ejemplo, glomerulonefritis, síndrome de Goodpasture y enfermedad de Berger), trastornos dermatológicos autoinmunitarios (tales como, por ejemplo, psoriasis, urticaria, ronchas, pénfigo vulgar, penfigoide ampolloso y lupus eritematoso cutáneo), trastornos hematológicos (tales como, por ejemplo, púrpura trombocitopénica, púrpura trombocitopénica trombótica, púrpura postransfusión y anemia hemolítica autoinmunitaria), aterosclerosis, uveítis, enfermedades auditivas autoinmunitarias (tales como, por ejemplo, enfermedad del oído interno y pérdida de audición), enfermedad de Behcet, síndrome de Raynaud, trasplante de órganos y trastornos endocrinos autoinmunitarios (tales como, por ejemplo, enfermedades autoinmunitarias relacionadas con diabetes tales como diabetes mellitus insulino dependiente (IDDM), enfermedad de Addison y enfermedad tiroidea autoinmunitaria (por ejemplo, enfermedad de Graves y tiroiditis)). Dichas enfermedades más preferidas incluyen, por ejemplo, RA, colitis ulcerosa, vasculitis asociada con ANCA, lupus, esclerosis múltiple, síndrome de Sjögren, enfermedad de Graves, IDDM, anemia perniciosa, tiroiditis y glomerulonefritis.

La expresión “*agente citotóxico*” como se usa en el presente documento se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de células y/o provoca la destrucción de células. La expresión incluye isótopos radiactivos (por ejemplo At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} e isótopos radiactivos de Lu), y toxinas tales como toxinas de moléculas pequeñas o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de las mismas.

Un “*agente quimioterapéutico*” es un compuesto químico útil en el tratamiento de cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN®); alquil sulfonatos tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carbocuna, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenfosforamida y trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta lapachona; lapachol; colchicinas; ácido betulínico; una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecán (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecán, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, escopolectina y 9-aminocamptotecina); briostatina; pemetrexed; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; tenipósido; criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; TLK-286; CDP323, un inhibidor de integrina alfa 4 oral; una sarcodictina; espongistatina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clomafacina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos enedina (por ejemplo, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gamma II y caliqueamicina omega 1 (véase, por ejemplo, Nicolaou *et al.*, Angew. Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)); dinemicina, incluyendo dinemicina A; una esperamicina; así como cromóforo neocarcinostatina y cromóforos de antibióticos de cromoproteína enedina relacionados), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (incluyendo ADRIAMYCIN®, morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina, inyección de liposoma de doxorubicina HCl (DOXIL®) y desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, maccelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomina, potfiomicina, puomicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex,

cinostatina, zorubicina; anti metabolitos tales como metotrexato, gemcitabina (GEMZAR®), tegafur (UFTORAL®), capecitabina (XELODA®), una epotilona y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina e imatinib (un derivado de 2-fenilaminopirimidina), así como otros inhibidores de c-Kit; anti adrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reforzador de ácido fólico tal como ácido froilínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diacicuona; elfornitina; acetato de eliptinio; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiiurea, lentinano; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; 2-etilhidracida; procarbazona; complejo de polisacáridos PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triacicuona; 2,2',2"-triclolorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®); dacarbacina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL®), formulación de nanopartículas obtenidas por ingeniería de albúmina de paclitaxel (ABRAXANE™), y doxetaxel (TAXOTERE®); clorambucilo; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina (VELBAN®); platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina (ONCOVIN®); oxaliplatino; leucovorina; vinorelbina (NAVELBINE®); novantrona; edatraxato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores; así como combinaciones de dos o más de los anteriores tales como CHOP, una abreviatura de una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisolona y FOLFOX, una abreviatura de un régimen de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATIN™) combinado con 5-FU y leucovorina.

También se incluyen en la presente definición agentes antihormonales que actúan para regular, reducir, bloquear o inhibir los efectos de hormonas que pueden promover el crecimiento de cáncer, y están con frecuencia en forma de tratamiento sistémico, o de todo el cuerpo. Pueden ser hormonas en sí mismos. Los ejemplos incluyen antiestrógenos y moduladores de receptores de estrógenos selectivos (SERM), incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo tamoxifeno NOLVADEX®), raloxifeno (EVISTA®), droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, queoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno (FARESTON®); anti progesteronas; reguladores negativos del receptor de estrógenos (ERD); antagonistas de receptores de estrógenos tales como fulvestrant (FASLODEX®); agentes que actúan para suprimir o cerrar los ovarios, por ejemplo, agonistas de la hormona liberadora de hormona leutinizante (LR) tales como acetato de leuprolide (LUPRON® y ELIGARD®), acetato de goserelina, acetato de buserelina y tripterelina; antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida y bicalutamida; e inhibidores de aromatasa que inhiben la enzima aromatasa, que regula la producción de estrógenos en las glándulas adrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, acetato de megesterol (MEGASE®), exemestano (AROMASIN®), formestano, fadrozol, vorozol (RIVISOR®), letrozol (FEMARA®) y anastrozol (ARIMIDEX®). Además, dicha definición de agentes quimioterapéuticos incluye bisfosfonatos tales como clodronato (por ejemplo, BONEFOS® u OSTAC®), etidronato (DIDROCAL®), NE-58095, ácido zoledrónico/zoledronato (ZOMETA®), alendronato (FOSAMAX®), pamidronato (AREDIA®), tiludronato (SKELID®) o risedronato (ACTONEL®); así como troxacitabina (un análogo de 1,3-dioxolano nucleósido citosina); oligonucleótidos antisentido, particularmente los que inhiben la expresión de genes en rutas de señalización implicadas en proliferación de células aberrantes, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras y receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R); vacunas tales como vacuna THERATOPE® y vacunas de terapia génica, por ejemplo, vacuna ALLOVECTIN®, vacuna LEUVECTIN® y vacuna VAXID®; inhibidor de topoisomerasa 1 (por ejemplo, LURTOTECAN®); un antiestrógeno tal como fulvestrant, un inhibidor de Kit tal como imatinib o EXEL-0862 (un inhibidor de tirosina quinasa); inhibidor de EGFR tal como erlotinib o cetuximab; un inhibidor anti VEGF tal como bevacizumab; arinotecán; rmRH (por ejemplo, ABARELIX®); lapatinib y ditosilato de lapatinib (una molécula pequeña inhibidora de tirosina quinasa doble de ErbB-2 y EGFR también conocido como GW572016); 17AAG (derivado de geldanamicina que es un veneno de proteína de choque térmico (Hsp) 90) y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

Un "agente inhibidor del crecimiento" se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula, cuyo crecimiento depende de la activación del receptor bien *in vitro* o bien *in vivo*. Por lo tanto, el agente inhibidor del crecimiento incluye uno que reduce significativamente el porcentaje de células dependientes de receptor en fase S. Los ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un lugar distinto de la fase S), tales como agentes que inducen la detención en G1 y detención en fase M. Los bloqueadores de fase M Clásicos incluyen las vincas y alcaloides de la vinca (vincristina y vinblastina), taxanos e inhibidores de topoisomerasa II tales como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido y bleomicina. Los agentes que detienen G1 también se extienden a detención en fase S, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbacina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo y ara-C. Puede encontrarse información adicional en The Molecule Basis of Cancer, Mendelsohn y Israel, eds., Capítulo 1, titulado "Regulación del ciclo celular, oncogenes y fármacos antineoplásicos" de Murakami *et al.* (WB Saunders: Filadelfia, 1995), especialmente p. 13. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) son fármacos antineoplásicos derivados ambos del tejo. Docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), derivado del tejo Europeo, es un análogo semisintético de paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb).

El término “*citocina*” es un término genérico para proteínas liberadas por una población celular que actúan en otra célula como mediadores intercelulares. Son ejemplos de dichas citocinas linfocinas, monocinas; interleucinas (IL) tales como IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, incluyendo rIL-2 PROLEUKIN®; un factor de necrosis tumoral tal como TNF- α o TNF- β ; y otros factores polipeptídicos incluyendo LIF y ligando de kit (KL). Como se usa en el presente documento, el término citocina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivo celular recombinante y equivalentes biológicamente activos de las citocinas de secuencia nativa, incluyendo entidades de moléculas pequeñas producidas de forma sintética y derivados y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

El término “*hormona*” se refiere a hormonas polipeptídicas, que generalmente se secretan por órganos glandulares con conductos. Se incluyen entre las hormonas, por ejemplo, la hormona del crecimiento tal como hormona del crecimiento humana, hormona del crecimiento humana N-metionilo y hormona del crecimiento bovina; hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; estradiol; terapia de reemplazo hormonal; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano o testolactona; prorrelaxina; hormonas glucoproteicas tales como hormona folículo estimulante (FSH), hormona estimulante del tiroides (TSH) y hormona luteinizante (LH); prolactina, lactógeno placentario, péptido asociado con gonadotropina de ratón, hormona liberadora de gonadotropina; inhibina, activina; sustancia inhibidora muleriana; y trombopoyetina. Como se usa en el presente documento, el término hormona incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivo celular recombinante y equivalentes biológicamente activos de la hormona de secuencia nativa, incluyendo entidades de moléculas pequeñas producidas de forma sintética y derivados y sales farmacéuticamente aceptables de las mismas.

La expresión “*factor de crecimiento*” se refiere a proteínas que promueven el crecimiento e incluyen, por ejemplo, factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento endotelial vascular; factores de crecimiento nerviosos tales como NGF- β ; factor de crecimiento derivado de plaquetas; factores de crecimiento transformantes (TGF) tales como TGF- α y TGF- β ; factor de crecimiento de tipo insulina I y II; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductores; interferones tales como interferón α , β y γ ; y factores estimulantes de colonias (CSF) tales como CSF de macrófagos (M-CSF); CSF de macrófagos y granulocitos (GM-CSF); y CSF de granulocitos (G-CSF). Como se usa en el presente documento, la expresión factor de crecimiento incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivo celular recombinante y equivalentes biológicamente activos del factor de crecimiento de secuencia nativa, incluyendo entidades de moléculas pequeñas producidos de forma sintética y derivados y sales farmacéuticamente aceptables de las mismas.

El término “*integrina*” se refiere a una proteína receptora que permite que las células se unan y respondan a la matriz extracelular y está implicada en diversas funciones celulares tales como curación de heridas, diferenciación celular, dirección de células tumorales y apoptosis. Son parte de una gran familia de receptores de adhesión celular que están implicados en interacciones célula-matriz extracelular y célula-célula. Las integrinas funcionales consisten en dos subunidades glucoproteicas transmembrana, denominadas alfa y beta, que están unidas de forma no covalente. Las subunidades alfa comparten todas algunas homología entre sí, así como las subunidades beta. Los receptores siempre contienen una cadena alfa y una cadena beta. Los ejemplos incluyen Alfa6beta1, Alfa3beta1, Alfa7beta1, LFA-1, etc. Como se usa en el presente documento, el término “*integrina*” incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivo celular recombinante y equivalentes biológicamente activos de la integrina de secuencia nativa, incluyendo entidades de moléculas pequeñas producidas de forma sintética y derivados y sales farmacéuticamente aceptables de las mismas.

Un “*antagonista de TNF*” se define en el presente documento como una molécula que reduce, bloquea, inhibe, anula o interfiere con la actividad de TNF α *in vitro*, *in situ* y/o preferentemente *in vivo*. Un antagonista de TNF adecuado también puede reducir, bloquear, anular, interferir, prevenir y/o inhibir la síntesis de ARN, ADN o proteína de TNF, liberación de TNF α , señalización del receptor de TNF α , escisión de TNF α de membrana, actividad de TNF α , producción y/o síntesis de TNF α . Dichos antagonistas de TNF incluyen, pero sin limitación, anticuerpos anti TNF α , fragmentos de unión a antígeno de los mismos, mutantes específicos o dominios de los mismos que se unen específicamente con TNF α que, tras la unión con TNF α destruyen o agotan las células que expresan el TNF α en un mamífero y/o interfieren con una o más funciones de esas células, un receptor de TNF soluble (por ejemplo, p55, p70 o p85) o fragmento, polipéptidos de fusión de los mismos, una molécula pequeña antagonista de TNF, por ejemplo, proteína de unión a TNF I o II (TBP-I o TBP-II), nerelimonmab, CDP-571, infliximab, entercept (ENBREL[™]), adalimumab (HUMIRA[™]), CDP-571, CDP-870, afelimomab, lenercept y similares), fragmentos de unión a antígeno de los mismos y moléculas receptoras que se unen específicamente con TNF α ; compuestos que previenen y/o inhiben la síntesis de TNF α , liberación de TNF α o su acción de células diana, tales como talidomida, tenidap, inhibidores de fosfodiesterasa (por ejemplo, pentoxifilina y rolipram), agonistas del receptor de adenosina A2b y potenciadores del receptor de adenosina A2b; compuestos que previenen y/o inhiben la señalización de receptores de TNF α , tales como inhibidores de proteína quinasa activada por mitógeno (MAP); compuestos que bloquean y/o inhiben la escisión de TNF α de membrana, tales como inhibidores de metaloproteínasa; compuestos que bloquean y/o inhiben la actividad de TNF α , tales como inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) (por ejemplo, captoprilo); y compuestos que bloquean y/o inhiben la producción y/o síntesis de TNF α , tales como inhibidores de MAP quinasa. El antagonista preferido comprende un anticuerpo.

El “factor de necrosis tumoral alfa” “TNF-alfa” o “TNF α ” se refiere a una molécula de TNF α humana que comprende la secuencia de aminoácidos de Pennica *et al.*, Nature, 312: 721 (1984) o Aggarwal *et al.*, JBC, 260: 2345 (1985). Un “inhibidor de TNF α ” en el presente documento es un agente que inhibe, en algún grado, una función biológica de TNF α , generalmente mediante unión con TNF α y neutralización de su actividad. Los ejemplos de inhibidores de TNF α en el presente documento incluyen etanercept (ENBREL®), infliximab (REM-ICADE®) y adalimumab (HUMIRA™).

Los ejemplos de “antagonistas o anticuerpos de integrina” en el presente documento incluyen un anticuerpo de LFA-1, tal como efalizumab (RAPTIVA®) disponible en el mercado de Genentech, o un anticuerpo de integrina alfa 4 tal como natalizumab (ANTEGREN®) disponible de Biogen, o derivados de fenilalanina diazáclicos (documento WO 2003/89410), derivados de fenilalanina (documentos WO 2003/70709, WO 2002/28830, WO 2002/16329 y WO 2003/53926), derivados de ácido fenilpropiónico (documento WO 2003/10135), derivados de enamina (documento WO 2001/79173), derivados de ácido propanoico (documento WO 2000/37444), derivados de ácido alcanico (documento WO 2000/32575), derivados de fenilo sustituido (Patentes de Estados Unidos N° 6.677.339 y 6.348.463), derivados de amina aromática (Patente de Estados Unidos N° 6.369.229), polipéptidos de dominio de desintegrina ADAM (documento US2002/0042368), anticuerpos para integrina α v β 3 (documento EP 633945), derivados de aminoácidos bicíclicos con enlace aza (documento WO 2002/02556), etc.

La expresión “agente inmunosupresor” se refiere a una sustancia que actúa para suprimir o enmascarar el sistema inmunitario del sujeto que se trata en el presente documento. Esto incluiría sustancias que suprimen la producción de citocinas, regulan negativamente o suprimen la expresión de autoantígenos, o enmascaran los antígenos del MHC. Los ejemplos de dichos agentes incluyen pirimidinas 2-amino-6-aryl-5-sustituidas (véase documento U.S. 4.665.077); fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE); ganciclovir, tacrolimus, glucocorticoides tales como cortisol o aldosterona, agente antiinflamatorios tales como un inhibidor de ciclooxigenasa, un inhibidor de 5-lipoxigenasa o un antagonista del receptor de leucotrienos; antagonistas de purina tales como azatioprina o mofetil micofenolato (MMF); trocade (Ro32-355); un antagonista del receptor de sigma periférico tal como ISR-31747; agentes alquilantes tales como ciclofosfamida; bromocriptina; danazol; dapsona; glutaraldehído (que enmascara los antígenos del MHC, como se describe en el documento U.S. 4.120.649); anticuerpos anti idiotípicos para antígenos del MHC y fragmentos del MHC; ciclosporina A; esteroides tales como corticosteroides o glucocorticosteroides o análogos de glucocorticoides, por ejemplo, prednisona, metilprednisolona, incluyendo succinato sódico de metilprednisolona SOLUMEDROL®, rimexolona y dexametasona; inhibidores de dihidrofolato reductasa tales como metotrexato (oral o subcutáneo); agentes antimalaria tales como cloroquina e hidroxicloroquina; sulfasalacina; leflunomida; inhibidores de la liberación de citocinas tales como anticuerpos monoclonales SB-210396 y SB-217969 y un antagonista del MHC II tal como ZD2315; un antagonista del receptor de PG1 tal como ZD4953; un bloqueador de la tensión de VLA4 tal como ZD7349; anticuerpos anti citocina o anti receptor de citocina incluyendo anticuerpos anti interferón alfa, beta o gamma, anticuerpos anti TNF α (infliximab (REMICADE®) o adalimumab), inmunoadhesina anti TNF α (etanercept), anticuerpos anti TNF-beta, bloqueadores de interleucina 1 (IL-1) tales como inhibidor de IL-1B y HuIL-1Ra, anticuerpos anti interleucina 2 (IL-2) y anticuerpos anti receptor de IL-2; toxina de fusión con IL-2; anticuerpos anti L3T4; leflunomida; globulina anti linfocitos heteróloga; OPC-14597; NISV (modificador de respuesta inmunitaria); un ácido graso esencial tal como ácido gammalinolénico o ácido eicosapentaenoico; bloqueadores de CD-4, anticuerpos pan T, preferentemente anticuerpos anti CD3 o anti CD4/CD4a; modificador coestimulador (por ejemplo, fusión de CTLA4-Fc, también conocido como ABATACEPT™; anticuerpos anti receptor de interleucina 6 (IL-6) y antagonistas; anticuerpos anti LFA-1, incluyendo anticuerpos anti CD11a y anti CD18; péptido soluble que contiene un dominio de unión a LFA-3 (documento WO 1990/08187); estreptoquinasa; IL-10; antagonistas anti IL-4, antagonistas anti IL-13 y anticuerpos antagonistas específicos anti IL-4/IL-13, factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta); estreptodornasa; ARN o ADN del hospedador; FK506; RS-61443; enlimomab; CDP-855; inhibidor de PNP; CH-3298; GW353430; 4162W94, clorambucilo; desoxiespergualina; rapamicina; receptor de linfocitos T (documento US 5.114.721); fragmentos del receptor de linfocitos T (Offner *et al.*, Science, 251: 430-2 (1991); documento WO 1990/11294; Janeway, Nature, 341: 482-483 (1989); y documento WO 1991/01133); antagonistas de BAFF tales como anticuerpos de BAFF y anticuerpos de BR3; antagonistas de zTNF4 (Mackay y Mackay, Trends Immunol., 23: 113-5 (2002)); agentes biológicos que interfieren con las señales auxiliares de linfocitos T, tales como anti receptor de CD40 o anti ligando de CD40 (CD 154), incluyendo anticuerpos de bloqueo para CD40-ligando de CD40 (por ejemplo, Durie *et al.*, Science, 261: 1328-30 (1993); Mohan *et al.*, J. Immunol., 154: 1470-80 (1995)) y CTLA4-Ig (Finck *et al.*, Science, 265: 1225-7 (1994)); y anticuerpos del receptor de linfocitos T (documento EP 340.109) tal como T10B9. Algunos agentes inmunosupresores preferidos en el presente documento incluyen ciclofosfamida, clorambucilo, azatioprina, leflunomida, MMF o metotrexato (MTX).

Los “fármacos antirreumáticos modificadores de enfermedad” o “DAMARD” incluyen, por ejemplo, cloroquina, hidroxicloroquina, miocrisina, auranofina, sulfasalacina, metotrexato, leflunomida, etanercept, infliximab (y MTX oral y subcutáneo), azatioprina, D-penicilamina, sales de oro (orales), sales de oro (intramusculares), minociclina, ciclosporina, por ejemplo, ciclosporina A y ciclosporina tópica, proteína A estafilocócica (Goodyear y Silverman, J. Exp. Med., 197:1125-39 (2003)), incluyendo sales y derivados de los mismos, etc.

Un “linfocito B” es un linfocito que madura dentro de la médula ósea, e incluye un linfocito B virgen, linfocito B de memoria o linfocito B efector (células plasmáticas). El linfocito B en el presente documento puede ser normal o no

maligno.

Un “marcador de superficie de linfocitos B” o “antígeno de superficie de linfocitos B” en el presente documento es un antígeno expresado en la superficie de un linfocito B al que puede dirigirse un antagonista que se une con el mismo. Los marcadores de superficie de linfocitos B ejemplares incluyen los marcadores de superficie de leucocitos CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD37, CD40, CD53, CD72, CD73, CD74, CDw75, CDw76, CD77, CDw78, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CDw84, CD85 y CD86 (para descripciones, véase *The Leukocyte Antigen Facts Book*, 2ª Edición, 1997, ed. Barclay *et al.* Academic Press, Harcourt Brace & Co., Nueva York). Otros marcadores de superficie de linfocitos B incluyen RP105, FcRH2, CR2 de linfocitos B, CCR6, P2X5, HLA-DOB, CXCR5, FCER2, BR3, Bt γ , NAG14, SLGC16270, FcRH1, IRTA2, ATWD578, FcRH3, IRTA1, FcRH6, BCMA y 239287. El marcador de superficie de linfocitos B preferido se expresa preferentemente en linfocitos B en comparación con otros tejidos no de linfocitos B de un mamífero y puede expresarse en linfocitos B tanto precursores como maduros. Los más preferidos de dichos marcadores con CD20 y CD22.

El antígeno “CD20” o “CD20”, es una fosfoproteína no glucosilada, de aproximadamente 35 kDa, hallada en la superficie de más del 90 % de los linfocitos B de sangre periférica u órganos linfoides. CD20 está presente tanto en linfocitos B normales como en linfocitos B malignos, pero no se expresa en células madre. Otros nombres para CD20 en la bibliografía incluyen “antígeno restringido a linfocitos B” y “Bp35”. El antígeno CD20 se describe en Clark *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 82: 1766 (1985), por ejemplo.

El antígeno “CD22”, o “CD22”, también conocido como BL-CAM o Lyb8, es una glucoproteína de membrana integral de tipo 1 con peso molecular de aproximadamente 130 (reducido) a 140 kD (no reducido). Se expresa tanto en el citoplasma como en la membrana celular de linfocitos B. El antígeno CD22 aparece pronto en la diferenciación de linfocitos B aproximadamente en el mismo estadio que el antígeno CD19. A diferencia de otros marcadores de linfocitos B, la expresión de membrana de CD22 está limitada a los estadios de diferenciación tardíos comprendidos entre los linfocitos B maduros (CD22+) y las células plasmáticas (CD22-). El antígeno CD22 se describe, por ejemplo, en Wilson *et al.*, *J. Exp. Med.* 173: 137 (1991) y Wilson *et al.*, *J. Immunol.* 150: 5013 (1993).

Un “anticuerpo que se une con un marcador de superficie de linfocitos B” es una molécula que, tras su unión con un marcador de superficie de linfocitos B, destruye o agota los linfocitos B en un mamífero y/o interfiere con una o más funciones de linfocitos B, por ejemplo reduciendo o previniendo una respuesta humoral inducida por el linfocito B. El anticuerpo preferentemente es capaz de agotar los linfocitos B (es decir, reduce los niveles de linfocitos B en circulación) en un mamífero tratado con el mismo. Dicho agotamiento puede conseguirse mediante diversos mecanismos tales como citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC) y/o citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), inhibición de la proliferación de linfocitos B y/o inducción de muerte de linfocitos B (por ejemplo, mediante apoptosis).

Los ejemplos de anticuerpos de CD20 incluyen: “C2B8”, que se denomina ahora “rituximab” (“RITUXAN®”) (Patente de Estados Unidos Nº 5.736.137); el anticuerpo murino 2B8 marcado con itrio [90] designado “Y2B8” o “Tiuxetano de Ibritumomab” (ZEVALIN®) disponible en el mercado de IDEC Pharmaceuticals, Inc. (Patente de Estados Unidos Nº 5.736.137; 2B8 depositado en la ATCC con el número de referencia HB11388 el 22 de junio de 1993); IgG2a “B1” murino, también denominado “Tositumomab”, opcionalmente marcado con ¹³¹I para generar el anticuerpo “131I-B1” o “yodo I131 tositumomab” (BEXXAR™) disponible en el mercado de Corixa (véase, también, Patente de Estados Unidos Nº 5.595.721); anticuerpo monoclonal murino “1F5” (Press *et al.* *Blood* 69(2): 584-591 (1987) y variantes del mismo incluyendo “con parche de armazón” o 1F5 humanizado (documento WO 2003/002607, Leung, S.; depósito de ATCC HB-96450); anticuerpo 2H7 murino y 2H7 quimérico (Patente de Estados Unidos Nº 5.677.180); un 2H7 humanizado (documento WO 2004/056312 (Lowman *et al.*) y como se expone posteriormente); anticuerpo de alta afinidad, completamente humano HUMAX-CD20™ dirigido a la molécula CD20 en la membrana celular de linfocitos B (Genmab, Dinamarca; véase, por ejemplo, Glennie y van de Winkel, *Drug Discovery Today* 8: 503-510 (2003) y Cragg *et al.*, *Blood* 101: 1045-1052 (2003)); los anticuerpos monoclonales humanos expuestos en el documento WO04/035607 (Teeling *et al.*); anticuerpos AME-133™ (Applied Molecular Evolution); anticuerpo A20 o variantes del mismo tales como anticuerpo A20 quimérico o humanizado (cA20, hA20, respectivamente) (documento US 2003/0219433, Immunomedics); y anticuerpos monoclonales L27, G28-2, 93-1B3, B-C1 o NU-B2 disponibles del International Leukocyte Typing Workshop (Valentine *et al.*, En: *Leukocyte Typing III* (McMichael, Ed., p. 440, Oxford University Press (1987)). Los anticuerpos de CD20 preferidos en el presente documento son anticuerpos de CD20 quiméricos, humanizados o humanos, más preferentemente rituximab, un anticuerpo 2H7 humanizado, A20 quimérico o humanizado (Immunomedics) y anticuerpo de CD20 humano HUMAX-CD20™ (Genmab).

Los términos “rituximab” o “RITUXAN®” en el presente documento se refieren al anticuerpo monoclonal humano/murino quimérico obtenido por ingeniería genética dirigido contra el antígeno CD20 y designado “C2B8” en la Patente de Estados Unidos Nº 5.736.137, incluyendo fragmentos del mismo que conservan la capacidad para unirse con CD20.

Exclusivamente para los fines del presente documento y a no ser que se indique de otro modo, un “2H7 humanizado” se refiere a un anticuerpo de CD20 humanizado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que el anticuerpo es eficaz para agotar los linfocitos B de primates *in vivo*. El anticuerpo incluye los expuestos en el

documento US 2006/0062787 y las figuras del mismo, e incluyendo la versión 114, cuyas secuencias se proporcionan en el documento US 2006/0188495. Véase también documentos US 2006/0034835 y US 2006/0024300. En un sumario de diversas realizaciones preferidas de la invención, la región V de variantes basadas en la versión 16 de 2H7 como se desvela en el documento US 2006/0062787 tendrá las secuencias de aminoácidos de v16 excepto en las posiciones de las sustituciones de aminoácidos que se indican en la tabla posterior. A no ser que se indique de otro modo, las variantes de 2H7 tendrán la misma cadena L que la de v16.

Versión de 2H7	Cambios de cadena pesada (V _H)	Cambios de cadena ligera (V _L)	Cambios de Fc
16			-
31	-	-	S298A, E333A, K334A
73	N100A	M32L	
75	N100A	M32L	S298A, E333A, K334A
96	D56A, N100A	S92A	
114	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A
115	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, E356D, M358L
116	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, K334A, K322A
138	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, K326A
477	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, K326A, N434W
375	-	-	K334L

Un 2H7 humanizado preferido es un anticuerpo intacto o fragmento de anticuerpo que tiene la secuencia de la versión 16. Otro 2H7 humanizado preferido tiene las secuencias de la versión 114.

Los “antagonistas de BAFF” son cualquier molécula que bloquee la actividad de BAFF o BR3. Incluyen inmunoadhesinas que comprenden una parte de BR3, TACI o BCMA que se une con BAFF, o variantes de las mismas que se unen con BAFF. En otros aspectos, el antagonista de BAFF es un anticuerpo de BAFF. Un “anticuerpo de BAFF” es un anticuerpo que se une con BAFF, y preferentemente se une con BAFF dentro de una región de BAFF humano que comprende los restos 162-275 de BAFF humano. En otro aspecto, el antagonista de BAFF es un anticuerpo de BR3. Un “anticuerpo de BR3” es un anticuerpo que se une con BR3 y preferentemente se une con BR3 dentro de una región de BR3 humano que comprende los restos 23-38 de BR3 humano. Las secuencias de BAFF humano y BR3 humano se encuentran, por ejemplo en el documento US 2006/0062787. Otros ejemplos de polipéptidos que se unen con BAFF o anticuerpos de BAFF pueden encontrarse en, por ejemplo, los documentos WO 2002/092620, WO 2003/014294, Gordon *et al.*, Biochemistry 42(20): 5977-83 (2003), Kelley *et al.*, J. Biol. Chem. 279: 16727-35 (2004), WO 1998/18921, WO 2001/12812, WO 2000/68378 y WO 2000/40716.

El “anticuerpo anti IgE” incluye cualquier anticuerpo que se una específicamente con IgE de tal manera que no induzca entrecruzamiento cuando IgE está unido con el receptor de alta afinidad en mastocitos y basófilos. Los anticuerpos ejemplares incluyen los anticuerpos de la invención así como rhuMabE25 (E25, XOLAIR®), E26, E27, así como CGP-5101 (Hu-901) y el anticuerpo de HA. Las secuencias de aminoácidos de los dominios variables de cadena pesada y ligera de los anticuerpos humanizados anti IgE E25, E26 y E27 se desvelan, por ejemplo en los documentos U.S.P. 6.172.213 y WO 99/01556. El anticuerpo CGP-5101 (Hu-901) se describe en Corne *et al.*, (1997) J. Clin. Invest. 99(5): 879-887, documento WO 92/17207 y ATCC Dep. N° BRL-10706, BRL-11130, BRL-11131, BRL-11132 y BRL-11133. El anticuerpo de HA se describe en los documentos USSN 60/444.229, WO2004/070011 y WO2004/070010.

II. Modos para llevar a cabo la invención

A. Preparación recombinante

La invención también proporciona un ácido nucleico aislado que codifica anticuerpos anti IgE apoptóticos, vectores y células hospedadoras que comprenden dicho ácido nucleico, y técnicas recombinantes para la producción de un anticuerpo.

Para la producción recombinante del anticuerpo, el ácido nucleico que lo codifica se aísla y se inserta en un vector replicable para clonación posterior (amplificación del ADN) o para expresión. El ADN que codifica el anticuerpo monoclonal se aísla fácilmente y se secuencia usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente con genes que codifican las cadenas pesadas y

ligeras del anticuerpo). Están disponibles muchos vectores. Los componentes de vector generalmente incluyen, pero sin limitación, uno o más de los siguientes, una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción.

5 (1) Componente de secuencia señal

Los anticuerpos anti IgE de la presente invención pueden producirse de forma recombinante no solamente directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que es preferentemente una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de escisión específico en el extremo N terminal de la proteína madura o polipéptido. La secuencia señal heteróloga seleccionada preferentemente es una que se reconoce y se procesa (es decir, se escinde por una peptidasa señal) por la célula hospedadora. Para células hospedadoras procariotas que no reconocen y procesan la secuencia señal de mamífero nativa, la secuencia señal se sustituye por una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo de la fosfatasa alcalina, penicilinas, lpp, o líderes de enterotoxina II termoestables. Para secreción de levadura la secuencia señal nativa puede sustituirse por, por ejemplo, el líder de invertasa de levadura, líder de factor (incluyendo líderes de factor de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*), o líder de fosfatasa ácida, el líder de glucoamilasa de *C. albicans*, o la señal descrita en el documento WO 90/13646. En expresión de células de mamífero, están disponibles secuencias señal de mamífero así como líderes secretorios virales, por ejemplo, la señal gD del herpes simple.

20 El ADN para dicha región precursora se liga en fase de lectura con ADN que codifica el anticuerpo de unión a IgE.

(2) Origen de replicación

Los vectores tanto de expresión como de clonación contienen una secuencia de ácido nucleico que permite que el vector se replique en una o más células hospedadoras seleccionadas. Generalmente, en vectores de clonación esta secuencia es una que permite que el vector se replique de forma independiente del ADN cromosómico del hospedador, e incluye orígenes de replicación o secuencias de replicación autónoma. Dichas secuencias se conocen bien para diversas bacterias, levaduras y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de bacterias Gram negativas, el origen del plásmido 2 μ es adecuado para levadura y diversos orígenes virales (SV40, polioma, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para vectores de clonación en células de mamífero. Generalmente, el componente de origen de replicación no es necesario para vectores de expresión de mamíferos (el origen de SV40 puede usarse normalmente solamente porque contiene el promotor temprano).

35 (3) Componente de gen de selección

Los vectores de expresión y clonación pueden contener un gen de selección, también denominado un marcador seleccionable. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan deficiencias auxotróficas o (c) aportan nutrientes críticos no disponibles de medios complejos, por ejemplo, el gen que codifica la D-alanina racemasa para Bacilos.

Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula hospedadora. Esas células que se transforman con éxito con un gen heterólogo producen una proteína que confiere resistencia a fármacos y de este modo sobreviven al régimen de selección. Los ejemplos de dicha selección dominante usa los fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

Otro ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamífero son los que permiten la identificación de células competentes para captar el ácido nucleico del anticuerpo de unión a IgE, tales como DHFR, timidina quinasa, metalotioneína I y II, preferentemente genes de metalotioneína de primate, adenosina desaminasa, ornitina descarboxilasa, etc.

Por ejemplo, las células transformadas con el gen de selección de DHFR se identifican en primer lugar cultivando todos los transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de DHFR. Una célula hospedadora apropiada cuando se emplea DHFR de tipo silvestre es la línea celular de ovario de hámster Chino (CHO) deficiente en actividad DHFR (por ejemplo, ATCC CRL-9096).

Como alternativa, las células hospedadoras (particularmente hospedadores de tipo silvestre que contienen DHFR endógeno) transformadas o cotransformadas con secuencias de ADN que codifican anticuerpo de unión a IgE, proteína de DHFR de tipo silvestre y otro marcador seleccionable tal como aminoglucósido 3'-fosfotransferasa (APH) pueden seleccionarse por crecimiento celular en medio que contiene un agente de selección para marcador seleccionable tal como un antibiótico aminoglucosídico, por ejemplo, kanamicina, neomicina o G418. Véase Patente de Estados Unidos N° 4.965.199.

Un gen de selección adecuado para su uso en levadura es el gen *trp1* presente en el plásmido de levadura YRp7 (Stinchcomb *et al.*, Nature, 282: 39 (1979)). El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC N° 44076 o PEP4-1.

Jones, Genetics, 85: 12 (1977). La presencia de la lesión de *trp1* en el genoma de la célula hospedadora de levadura proporciona después un ambiente eficaz para detectar la transformación por cultivo en ausencia de triptófano. De forma similar, las células de levadura deficientes en *Leu2* (ATCC 20.622 o 38.626) se complementan por plásmidos conocidos que portan el gen de *Leu2*.

Además, pueden usarse vectores derivados del plásmido circular de 1,6 μ m pKD1 para transformación de levaduras *Kluyveromyces*. Como alternativa, se ha presentado un sistema de expresión para producción a gran escala de quimosina de ternero recombinante para *K. lactis*. Van den Berg, Bio/Technology, 8: 135 (1990). También se han desvelado vectores de expresión de múltiples copias estables para secreción de albúmina de suero humano recombinante madura por cepas industriales de *Kluyveromyces*. Fleer *et al.*, Bio/Technology, 9: 968-975 (1991).

(4) Componente promotor

Los vectores de expresión y clonación habitualmente contienen un promotor que se reconoce por el organismo hospedador y se une operativamente con el ácido nucleico que codifica el anticuerpo de unión a IgE. Los promotores adecuados para su uso con hospedadores procariotas incluyen el promotor *phoA*, sistemas promotores de lactamasa y lactosa, promotor de fosfatasa alcalina, un sistema promotor de triptófano (*trp*) y promotores híbridos tales como el promotor de *tac*. Sin embargo, son adecuados otros promotores bacterianos conocidos. Los promotores para su uso en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia de Shine-Dalgarno (S.D.) unida operativamente con el ADN que codifica el anticuerpo de unión a IgE.

Se conocen secuencias promotoras para eucariotas. Prácticamente todos los genes eucariotas tienen una región rica en AT localizada aproximadamente 25 a 30 bases cadena arriba del sitio en el que se inicia la transcripción. Otra secuencia hallada de 70 a 80 bases cadena arriba del inicio de la transcripción de muchos genes es una región CNCAAT en la que N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de los genes eucariotas hay una secuencia AATAAA que puede ser la señal para adición de la cola de poli A al extremo 3' de la secuencia codificante. Todas estas secuencias se insertan de forma adecuada en vectores de expresión eucariotas.

Los ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para su uso con hospedadores de levadura incluyen los promotores para 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glucolíticas, tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfo-fructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, triosafosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucoquinasa.

Otros promotores de levadura, que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de transcripción controlada por condiciones de crecimiento, son las regiones promotoras para alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradantes asociadas con el metabolismo de nitrógeno, metalotioneína, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. Los vectores y promotores adecuados para su uso en la expresión de levadura se describen además en el documento EP 73.657. También se usan provechosamente potenciadores de levadura con promotores de levadura.

La transcripción del anticuerpo de unión a IgE de vectores en células hospedadoras de mamífero se controla, por ejemplo, por promotores obtenidos de los genomas de virus tales como virus del poliovirus, virus de la viruela aviar, adenovirus (tales como Adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B y más preferentemente Virus de Simio 40 (SV40), de promotores de mamífero heterólogos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, de promotores de choque térmico, siempre que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de células hospedadoras.

Los promotores tempranos y tardíos del virus de SV40 se obtienen convenientemente como un fragmento de restricción de SV40 que también contiene el origen de replicación viral de SV40. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene convenientemente como un fragmento de restricción de HindIII E. Se desvela un sistema para expresar ADN en hospedadores de mamífero usando el virus del papiloma bovino como un vector en la Patente de Estados Unidos N° 4.419.446. Se describe una modificación de este sistema en la Patente de Estados Unidos N° 4.601.978. Véase también Reyes *et al.*, Nature 297: 598-601 (1982) en la expresión de ADNc de interferón humano en células de ratón bajo el control de un promotor de timidina quinasa del virus del herpes simple. Como alternativa, puede usarse la repetición terminal larga del Virus del Sarcoma de Rous como el promotor.

(5) Componente de elemento potenciador

La transcripción de un ADN que codifica el anticuerpo de unión a IgE de la presente invención por eucariotas superiores se aumenta con frecuencia insertando una secuencia potenciadora en el vector. Se conocen ahora muchas secuencias potenciadoras de genes de mamífero (globina, elastasa, albúmina, fetoproteína e insulina). Normalmente, sin embargo, se usará un potenciador de un virus de célula eucariota. Los ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de poliovirus en el lado tardío del origen de replicación y potenciadores de adenovirus. Véase también Yaniv, Nature 297: 17-18 (1982) sobre elementos potenciadores para la activación de promotores eucariotas. El potenciador puede cortarse y empalmarse en el vector en una posición 5' o 3' de la

secuencia codificante de anticuerpo de unión a IgE, pero preferentemente se localiza en un sitio 5' del promotor.

(6) *Componente de terminación de la transcripción*

Los vectores de expresión usados en células hospedadoras eucariotas (células de levadura, de hongo, de insecto, vegetales, animales, humanas o nucleadas de otros organismos multicelulares) también contendrán secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Dichas secuencias están disponibles habitualmente de las regiones no traducidas 5' y, ocasionalmente, 3', de ADN o ADNc eucariotas o virales. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la parte no traducida del ARNm que codifica el anticuerpo de unión a IgE. Un componente de terminación de la transcripción útil es la región de poliadenilación de hormona del crecimiento bovina. Véase documento WO94/11026 y el vector de expresión desvelado en el mismo.

(7) *Selección y transformación de células hospedadoras*

Son células hospedadoras adecuadas para clonar o expresar el ADN en los vectores del presente documento las células procariotas, de levadura o eucariotas superiores descritas anteriormente. Los procariotas adecuados para este fin incluyen eubacterias, tales como organismos Gram negativos o Gram positivos, por ejemplo, enterobacterias tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo *Serratia marcescens* y *Shigella*, así como *Bacillus* tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41P desvelado en el documento DD 266.710 publicado el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa* y *Streptomyces*. Un hospedador de clonación de *E. coli* preferido es *E. coli* 294 (ATCC 31.446), aunque son adecuadas otras cepas tales como *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31.537) y *E. coli* W3110 (ATCC 27.325). Estos ejemplos son ilustrativos más que limitantes.

Pueden producirse anticuerpo de longitud completa, fragmentos de anticuerpo y proteínas de fusión de anticuerpos en bacterias, en particular cuando no es necesaria la glucosilación y la función efectora de Fc, tal como cuando el anticuerpo terapéutico se conjuga con un agente citotóxico (por ejemplo, una toxina) y el inmunoconjugado por sí solo muestra eficacia en la destrucción de células tumorales. Los anticuerpos de longitud completa tienen una semivida en circulación mayor. La producción en *E. coli* es más rápida y más rentable. Para la expresión de fragmentos de anticuerpo y polipéptidos en bacterias, véase, por ejemplo, documentos U.S. 5.648.237 (Carter *et al.*), U.S. 5.789.199 (Joly *et al.*) y U.S. 5.840.523 (Simmons *et al.*) que describe secuencias de región de inicio de la traducción (TIR) y señal para optimizar la expresión y secreción. Después de la expresión, el anticuerpo se aísla de la pasta celular de *E. coli* en una fracción soluble y puede purificarse mediante, por ejemplo, columna de proteína A o G dependiendo del isotipo. La purificación final puede llevarse a cabo de forma similar al proceso para purificar el anticuerpo expresado, por ejemplo, en células CHO.

Además de procariotas, microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levadura son hospedadores de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican anticuerpos de unión a IgE. *Saccharomyces cerevisiae*, o la levadura de panadero común, es el más habitualmente usado entre los microorganismos hospedadores eucariotas inferiores. Sin embargo, están disponibles habitualmente varios otros géneros, especies y cepas y son útiles en el presente documento, tales como *Schizosaccharomyces pombe*; hospedadores de *Kluyveromyces* tales como, por ejemplo, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilae* (ATCC 36.906), *K. thermotolerans* y *K. marxianus*; *Yarrowia* (EP 402.226); *Pichia pastoris* (EP 183.070); *Candida*; *Trichoderma reesei* (EP 244.234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* tales como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos tales como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* y hospedadores de *Aspergillus* tales como *A. nidulans* y *A. niger*.

Células hospedadoras adecuadas para la expresión del anticuerpo de unión a IgE glucosilado derivan de organismos multicelulares. Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células vegetales y de insectos. Se han identificado numerosas cepas baculovirales y variantes y células hospedadoras de insecto permisivas correspondientes de hospedadores tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y *Bombyx mori*. Está disponible públicamente diversas cepas virales para transfección, por ejemplo, la variante L-1 de NPV de *Autographa californica* y la cepa Bm-5 de NPV de *Bombyx mori*, y dichos virus pueden usarse como el virus del presente documento de acuerdo con la presente invención, particularmente para transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

También pueden utilizarse como hospedadores cultivos de células vegetales de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate y tabaco.

Sin embargo, el interés ha sido mayor en células de vertebrados, y la propagación de células de vertebrados en cultivo (cultivo tisular) se ha convertido en un procedimiento rutinario. Son ejemplos de líneas celulares hospedadoras de mamífero útiles la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión, Graham *et al.*, J. Gen Virol. 36: 59 (1977)); células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de

ovario de hámster Chino/-DHFR (CHO, Urlaub *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 (1980)); células de sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23: 243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de cercopiteco verde Africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather *et al.*, Annals N. Y. Acad. Sci. 383: 44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

Las células hospedadoras se transforman con los vectores de expresión o clonación anteriormente descritos para la producción de anticuerpo de unión a IgE y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

(8) Cultivar las células hospedadoras

Las células hospedadoras usadas para producir el anticuerpo de unión a IgE de la presente invención pueden cultivarse en diversos medios. Medios disponibles en el mercado tales como F10 de Ham (Sigma), Medio Esencial Mínimo ((MEM), Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y Medio de Eagle Modificado por Dulbecco ((DMEM), Sigma) son adecuados para cultivar las células hospedadoras. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham *et al.*, Meth. Enz. 58: 44 (1979), Barnes *et al.*, Anal. Biochem. 102: 255 (1980), Patentes de Estados Unidos N° 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; documentos WO 90/03430; WO 87/00195; o Patente de Estados Unidos Re. 30.985 pueden usarse como medio de cultivo para las células hospedadoras. Cualquiera de estos medios puede complementarse según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro sódico, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco GENTAMYCIN™), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos habitualmente presentes a concentraciones finales en el intervalo micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. También puede incluirse cualquier otro complemento necesario a concentraciones apropiadas que se conocerían por los expertos en la materia. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similares, son las previamente usadas con la célula hospedadora seleccionada para expresión, y resultarán evidentes para el experto habitual en la técnica.

(9) Purificación de anticuerpo

Cuando se usan técnicas recombinantes, el anticuerpo puede producirse de forma intracelular, en el espacio periplásmico, o secretarse directamente al medio. Si el anticuerpo se produce de forma intracelular, como una primera etapa, los residuos de partículas, bien células hospedadoras o fragmentos lisados, se retiran, por ejemplo, por centrifugación o ultrafiltración. Carter *et al.*, Bio/Technology 10: 163-167 (1992) describe un procedimiento para aislar anticuerpos que se secretan al espacio periplásmico de *E. coli*. Brevemente, la pasta celular se descongela en presencia de acetato sódico (pH 3,5), EDTA y fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) durante aproximadamente 30 minutos. Los residuos celulares pueden retirarse por centrifugación. Cuando el anticuerpo se secreta al medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión generalmente se concentran en primer lugar usando un filtro de concentración de proteínas disponible en el mercado, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Puede incluirse un inhibidor de proteasa tal como PMSF en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y pueden incluirse antibióticos para prevenir el crecimiento de contaminantes adventicios.

La composición de anticuerpos preparada a partir de las células puede purificarse usando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad la técnica de purificación preferida. La idoneidad de la proteína A como un ligando de afinidad depende de la especie e isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. La proteína A puede usarse para purificar anticuerpos que se basan en las cadenas pesadas 1, 2 o 4 humanas (Lindmark *et al.*, J. Immunol. Meth. 62: 1-13 (1983)). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para 3 humana (Guss *et al.*, EMBO J. 5: 15671575 (1986)). La matriz a la que se une el ligando de afinidad es más frecuentemente agarosa, pero están disponibles otras matrices. Matrices mecánicamente estables tales como vidrio poroso controlado o poli(estiren-divinil)benceno permiten caudales más rápidos y tiempos de procesamiento más cortos que los que pueden conseguirse con la agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio C_H3, la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) es útil para purificación. También están disponibles otras técnicas para purificación de proteínas tales como fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía en sílice, cromatografía de SEPHAROSE™ de heparina en una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatografía de SDS-PAGE y precipitación con sulfato de amonio dependiendo del anticuerpo para recuperar.

Después de cualquier etapa de purificación preliminar, la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y contaminantes puede someterse a cromatografía de interacción hidrófoba de pH bajo usando un tampón de elución a un pH entre aproximadamente 2,5 y 4,5, preferentemente realizado a concentraciones salinas bajas (por ejemplo, sal de aproximadamente 0 a 0,25 M).

B. Preparación de anticuerpos1) *Anticuerpos policlonales*

Los anticuerpos policlonales generalmente se inducen en animales por múltiples inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) del antígeno relevante y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno relevante con una proteína que es inmunogénica en la especie para inmunizar, por ejemplo, la hemocianina de lapa californiana (KLH), albúmina de suero, tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de soja, usando un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo, maleimidobenzil sulfosuccinimida éster (conjugación mediante restos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (mediante restos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl_2 , o $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, en la que R y R^1 son de forma independiente grupos de alquilo inferiores. Los ejemplos de adyuvantes que pueden emplearse incluyen adyuvante completo de Freund y adyuvante MPL-TDM (monofosforil Lípido A, trehalosa dicorinomicolato sintética). El protocolo de inmunización puede seleccionarse por un experto en la materia sin experimentación indebida.

Los animales se inmunizan contra el antígeno, conjugados inmunogénicos o derivados combinando, por ejemplo, 100 μg o 5 μg de la proteína o conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund e inyectando la solución por vía intradérmica en múltiples sitios. Un mes después, los animales se refuerzan con 1/5 a 1/10 de la cantidad original de péptido o conjugado en adyuvante completo de Freund por inyección subcutánea en múltiples sitios. De siete a catorce días después, se toman muestras sanguíneas de los animales y se ensaya el suero con respecto a título de anticuerpos. Los animales se refuerzan hasta que el título se estabiliza. También pueden realizarse conjugados en cultivo celular recombinante como fusiones proteicas. Además, agentes agregantes tales como el alumbre son adecuados para potenciar la respuesta inmunitaria.

2) *Anticuerpos monoclonales*

Se obtienen anticuerpos monoclonales de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprende la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural y/o modificaciones post-traduccionales (por ejemplo, isomerizaciones, amidaciones) que pueden estar presentes en cantidades menores. Por lo tanto, el modificador "monoclonal" indica que el anticuerpo no es una mezcla de anticuerpos discretos.

Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden realizarse usando el método de hibridoma descrito en primer lugar en Kohler *et al.*, Nature, 256: 495 (1975), o pueden prepararse por métodos de ADN recombinantes (Patente de Estados Unidos N° 4.816.567).

En el método de hibridoma, se inmuniza un ratón u otro animal hospedador apropiado, tal como un hámster, como se ha descrito anteriormente en el presente documento para inducir que los linfocitos produzcan o sean capaces de producir anticuerpos que se unan específicamente con la proteína usada para inmunización. Como alternativa, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*. Después los linfocitos se fusionan con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986).

El agente inmunizador normalmente incluirá la proteína antigénica o una variante de fusión de la misma. Generalmente se usan linfocitos de sangre periférica ("PBL") si se desean células de origen humano, o se usan células del bazo o células de ganglios linfáticos si se desean fuentes de mamífero no humano. Los linfocitos se fusionan después con una línea celular inmortalizada usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma. Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press (1986), pp. 59-103.

Las líneas celulares inmortalizadas son habitualmente células de mamífero transformadas, particularmente células de mieloma de origen roedor, bovino y humano. Habitualmente, se emplean líneas celulares de mieloma de rata o ratón. Las células de hibridoma preparadas de este modo se siembran y se cultivan en un medio de cultivo adecuado que contiene preferentemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o supervivencia de las células de mieloma parental, no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma parental carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas normalmente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), que son sustancias que previenen el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

Son células de mieloma inmortalizadas preferidas las que se fusionan eficazmente, soportan producción de alto nivel estable del anticuerpo por las células productoras de anticuerpo seleccionadas, y son sensibles a un medio tal como medio HAT. Entre estas, se prefieren líneas de mieloma murino, tales como las derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles del Centro de Distribución Celular del Instituto Salk, San Diego, California, Estados Unidos y células SP-2 (y derivados de las mismas, por ejemplo, X63-Ag8-653) disponibles de la Colección Americana de Cultivo Tipo, Manassas, Virginia, Estados Unidos. También se han descrito líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos

(Kozbor, J. Immunol., 133: 3001 (1984); Brodeur *et al.*, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Decker, Inc., Nueva York, 1987)).

El medio de cultivo en el que crecen las células de hibridoma se ensaya con respecto a la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferentemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma se determina por inmunoprecipitación o por un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

El medio de cultivo en el que las células de hibridoma se cultivan puede ensayarse con respecto a la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno deseado. Preferentemente, la afinidad y especificidad de unión del anticuerpo monoclonal puede determinarse por inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo ligado a enzimas (ELISA). Dichas técnicas y ensayos se conocen en la técnica. Por ejemplo, la afinidad de unión puede determinarse por el análisis de Scatchard de Munson *et al.*, Anal. Biochem., 107: 220 (1980).

Después de identificarse las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones pueden subclonarse por procedimientos de dilución limitante y cultivarse por métodos convencionales (Goding, mencionado anteriormente). Los medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden cultivarse *in vivo* como tumores en un mamífero.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, líquido ascítico o suero por procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

También pueden prepararse anticuerpos monoclonales por métodos de ADN recombinante, tales como los descritos en la Patente de Estados Unidos Nº 4.816.567, y como se ha descrito anteriormente. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla y secuencia fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente con genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma actúan como una fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión, que después se transfectan en células hospedadoras tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que no producen de otro modo proteínas de inmunoglobulina, para sintetizar anticuerpos monoclonales en dichas células hospedadoras recombinantes. Los artículos de revisión sobre expresión recombinante en bacterias de ADN que codifican anticuerpo incluyen Skerra *et al.*, Curr. Opinion in Immunol., 5: 256-262 (1993) y Plückthun, Immunol. Revs. 130: 151-188 (1992).

En una realización adicional, los anticuerpos pueden aislarse de bibliotecas de fagos de anticuerpos generadas usando las técnicas descritas en McCafferty *et al.*, Nature, 348: 552-554 (1990). Clackson *et al.*, Nature, 352: 624-628 (1991) y Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, usando bibliotecas de fagos. Publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (intervalo nM) por redistribución de cadenas (Marks *et al.*, Bio/Technology, 10: 779-783 (1992)), así como infección combinatoria y recombinación *in vivo* como una estrategia para construir bibliotecas de fagos muy grandes (Waterhouse *et al.*, Nucl. Acids Res., 21: 2265-2266 (1993)). Por lo tanto, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas de hibridoma de anticuerpos monoclonales tradicionales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

El ADN también puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante de dominios constantes de cadena pesada y ligera humanos en lugar de las secuencias murinas homólogas (Patente de Estados Unidos Nº 4.816.567; Morrison, *et al.*, Proc. Natl Acad. Sci. USA, 81: 6851 (1984)), o uniendo covalentemente con la secuencia codificante de inmunoglobulina toda o parte de la secuencia codificante de un polipéptido no de inmunoglobulina. Normalmente, dichos polipéptidos no de inmunoglobulina sustituyen los dominios constantes de un anticuerpo, o sustituyen los dominios variables de un sitio de combinación de antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprende un sitio de combinación de antígenos que tiene especificidad por un antígeno y otro sitio de combinación de antígenos que tiene especificidad por un antígeno diferente.

Los anticuerpos monoclonales descritos en el presente documento pueden ser monovalentes, cuya preparación se conoce bien en la técnica. Por ejemplo, un método implica la expresión recombinante de cadena ligera de inmunoglobulina y una cadena pesada modificada. La cadena pesada se trunca generalmente en cualquier punto en la región Fc para evitar el entrecruzamiento de cadena pesada. Como alternativa, los restos de cisteína relevantes pueden sustituirse con otro resto de aminoácido o se suprimen para evitar el entrecruzamiento. También son adecuados métodos *in vitro* para preparar anticuerpos monovalentes. La digestión de anticuerpos para producir fragmentos de los mismos, particularmente fragmentos Fab, puede conseguirse usando técnicas rutinarias conocidas en este campo.

También pueden prepararse anticuerpos quiméricos o híbridos *in vitro* usando métodos conocidos en química proteica sintética, incluyendo los que implican agentes de entrecruzamiento. Por ejemplo, pueden construirse inmunotoxinas usando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéter. Los ejemplos de reactivos adecuados para este fin incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato.

3) Anticuerpos humanizados.

Los anticuerpos de la invención pueden comprender además anticuerpos humanizados o humanos. Son formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión a antígeno de los anticuerpos) que contienen secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que se reemplazan restos de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor por restos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata o conejo que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseada. En algunos casos, los restos marco conservados de Fv de la inmunoglobulina humana se reemplazan por restos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en las secuencias de CDR o marco conservado importadas. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado óptimamente también comprenderá al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Jones *et al.*, Nature 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature 332: 323-329 (1988) y Presta, Curr. Opin. Struct. Biol. 2: 593-596 (1992).

Se conocen bien en la técnica métodos para humanizar anticuerpos no humanos. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos en él desde una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácidos no humanos se denominan con frecuencia restos "importados", que normalmente se toman de un dominio variable "importado". La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores, Jones *et al.*, Nature 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature 332: 323-327 (1988); Verhoeyen *et al.*, Science 239: 1534-1536 (1988), o mediante sustitución con CDR de roedor o secuencias de CDR las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. En consecuencia, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente de Estados Unidos N° 4.816.567), en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que algunos restos de CDR y posiblemente algunos restos de FR se sustituyen por restos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, para usar en la preparación de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el método denominado "de mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se explora frente a la biblioteca completa de secuencias de dominio variable humanas conocidas. La secuencia humana que es más cercana a la del roedor se acepta entonces como el marco conservado humano (FR) para el anticuerpo humanizado. Sims *et al.*, J. Immunol., 151: 2296 (1993); Chothia *et al.*, J. Mol. Biol., 196: 901 (1987). Otro método usa un marco conservado particular derivado de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. El mismo marco puede usarse para varios anticuerpos humanizados diferentes. Carter *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4285 (1992); Presta *et al.*, J. Immunol., 151: 2623 (1993).

Es importante además que los anticuerpos se humanicen con conservación de alta afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, de acuerdo con un método preferido, se preparan anticuerpos humanizados por un proceso de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos de inmunoglobulina tridimensionales están disponibles habitualmente y los expertos en la materia están familiarizados con ellos. Están disponibles programas informáticos que ilustran y presentan probables estructuras conformacionales tridimensionales de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas presentaciones permite el análisis del papel probable de los restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de restos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse con su antígeno. De esta manera, los restos de FR pueden seleccionarse y combinarse de las secuencias receptora e importada de modo que se consiga la característica de anticuerpo deseada, tal como afinidad aumentada por el antígeno o los antígenos diana. En general, los restos de CDR están implicados directamente y más sustancialmente en la alteración de la unión a antígeno.

Se contemplan diversas formas del anticuerpo humanizado. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado puede ser un fragmento de anticuerpo, tal como un Fab, que se conjuga opcionalmente con uno o más agentes citotóxicos para generar un inmunoconjugado. Como alternativa, el anticuerpo humanizado puede ser un anticuerpo intacto, tal como un anticuerpo IgG1 intacto.

4) Anticuerpos humanos

Como alternativa a la humanización, pueden generarse anticuerpos humanos. Por ejemplo, es posible ahora producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, tras su inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la supresión homocigota del gen de región de unión de cadena pesada de anticuerpo (J_H) en ratones mutantes de línea germinal y quiméricos da como resultado la inhibición completa de la producción de anticuerpo endógeno. La transferencia de la matriz de genes de inmunoglobulina de línea germinal humana en dichos ratones mutantes de línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la presentación de antígenos. Véase, por ejemplo, Jakobovits *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 2551 (1993); Jakobovits *et al.*, Nature, 362: 255-258 (1993); Bruggermann *et al.*, Year in Immuno., 7: 33 (1993); Patentes de Estados Unidos N° 5.591.669 y documento WO 97/17852.

Como alternativa, la tecnología de presentación de fagos puede usarse para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpo *in vitro*, de repertorios de genes de dominio variable de inmunoglobulina (V) de donantes no o inmunizados. McCafferty *et al.*, Nature 348: 552-553 (1990); Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol. 227: 381 (1991). De acuerdo con esta técnica, se clonan genes de dominio V de anticuerpo en fase en un gen de proteína de cubierta mayor o menor de un bacteriófago filamentoso, tal como M13 o fd, y se presentan como fragmentos de anticuerpo funcionales en la superficie de la partícula de fago. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN monocatenaria del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan como resultado la selección del gen que codifica el anticuerpo que muestra esas propiedades. Por lo tanto, el fago imita alguna de las propiedades del linfocito B. La presentación de fagos puede realizarse en diversos formatos, revisados en, por ejemplo, Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., Curr. Opin. Struct. Biol. 3: 564-571 (1993). Pueden usarse varias fuentes de segmentos de genes V para presentación de fagos. Clackson *et al.*, Nature 352: 624-628 (1991) aislaron una serie diversa de anticuerpos anti oxazolona a partir de una biblioteca combinatoria aleatoria pequeña de genes V derivados de los bazo de ratones inmunizados. Puede construirse un repertorio de genes V de donantes humanos no inmunizados y pueden aislarse anticuerpos para una serie diversa de antígenos (incluyendo autoantígenos) esencialmente siguiendo las técnicas descritas en Marks *et al.*, J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1991), o Griffith *et al.*, EMBO J. 12: 725-734 (1993). Véase también, Patentes de Estados Unidos N° 5.565.332 y 5.573.905.

Las técnicas de Cole *et al.*, y Boerner *et al.*, también están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole *et al.*, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985) y Boerner *et al.*, J. Immunol. 147(1): 86-95 (1991). De forma similar, pueden prepararse anticuerpos humanos introduciendo loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que se han inactivado parcial o completamente genes de inmunoglobulina endógena. Tras la presentación, se observa la producción de anticuerpos humanos, que se asemeja estrechamente a la vista en seres humanos en todos los sentidos, incluyendo reordenación génica, ensamblaje y repertorio de anticuerpos. Este enfoque se describe, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos N° 5.545.807; 5.545.806, 5.569.825, 5.625.126, 5.633.425, 5.661.016 y en las siguientes publicaciones científicas: Marks *et al.*, Bio/Technology 10: 779-783 (1992); Lonberg *et al.*, Nature 368: 856-859 (1994); Morrison, Nature 368: 812-13 (1994), Fishwild *et al.*, Nature Biotechnology 14: 845-51 (1996), Neuberger, Nature Biotechnology 14: 826 (1996) y Lonberg y Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93 (1995).

Finalmente, los anticuerpos humanos también pueden generarse *in vitro* por linfocitos B activados (véase Patentes de Estados Unidos N° 5.567.610 y 5.229.275).

5) Fragmentos de anticuerpo

En ciertas circunstancias usar fragmentos de anticuerpo, en lugar de anticuerpos completos tiene ventajas. Los tamaños de fragmento más pequeños permiten una eliminación rápida, y pueden conducir a mejor acceso a tumores sólidos.

Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, estos fragmentos se han derivado mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto *et al.*, J Biochem Biophys. Method. 24: 107-117 (1992); y Brennan *et al.*, Science 229: 81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos pueden producirse ahora directamente por células hospedadoras recombinantes. Los fragmentos de anticuerpo Fab, Fv y scFv pueden expresarse todos en y secretarse de *E. coli*, permitiendo de este modo la producción fácil de cantidades grandes de estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpo pueden aislarse de las bibliotecas de fagos de anticuerpo analizadas anteriormente. Como alternativa, pueden recuperarse directamente fragmentos Fab'-SH de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter *et al.*, Bio/Technology 10: 163-167 (1992)). De acuerdo con otro enfoque, pueden aislarse fragmentos F(ab')₂ directamente de cultivo de células hospedadoras recombinantes. Fab y F(ab')₂ con aumento de la semivida *in vivo* se describen en la Patente de Estados Unidos N° 5.869.046. En otras realizaciones, el anticuerpo elegido es un fragmento Fv monocatenario (scFv). Véase documento WO 93/16185; Patente de Estados Unidos N° 5.571.894 y Patente de Estados Unidos N° 5.587.458. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, como se describe en la Patente de Estados Unidos 5.641.870. Dichos fragmentos de anticuerpo lineales pueden ser

monoespecíficos o biespecíficos.

6) Terapia de profármaco mediada por enzimas dependiente de anticuerpo (ADEPT)

5 Los anticuerpos de la presente invención también pueden usarse en ADEPT conjugando el anticuerpo con una enzima activadora de profármaco que convierte un profármaco (por ejemplo, un agente quimioterapéutico de peptidilo, véase documento WO 81/01145) en un fármaco antineoplásico activo. Véase, por ejemplo, documento WO 88/07378 y Patente de Estados Unidos Nº 4.975.278.

10 El componente enzimático del inmunocóncugado útil para ADEPT incluye cualquier enzima capaz de actuar en un profármaco de tal manera que lo convierta en su forma citotóxica, más activa.

Las enzimas que son útiles en el método de la presente invención, incluyen pero sin limitación, glucosidasa, glucosa oxidasa, lisozima humana, glucuronidasa humana, fosfatasa alcalina útil para convertir profármacos que contienen fosfato en fármacos libres, arilsulfatasa útil para convertir profármacos que contienen sulfato en fármacos libres, citosina desaminasa útil para convertir 5-fluorocitosina no tóxica en el fármaco antineoplásico 5-fluorouracilo; proteasas, tales como proteasa de *Serratia*, termolisina, subtilisina, carboxipeptidasas (por ejemplo, carboxipeptidasa G2 y carboxipeptidasa A) y catepsinas (tales como catepsinas B y L) que son útiles para convertir profármacos que contienen péptidos en fármacos libres; D-alanilcarboxipeptidasas, útiles para convertir profármacos que contienen sustituyentes de aminoácidos D; enzimas que escinden carbohidratos, tales como β -galactosidasa y neuraminidasa útiles para convertir profármacos glucosilados en fármacos libres; β -lactamasa útil para convertir fármacos derivatizados con β -lactamas en fármacos libres; y penicilina amidasas, tales como penicilina Vamidasa o penicilina G amidasa, útiles para convertir fármacos derivatizados en sus nitrógenos de amina con grupos fenoxiacetilo o fenilacetilo, respectivamente, en fármacos libres. Como alternativa, pueden usarse anticuerpos con actividad enzimática, también conocidos en la técnica como "abzimas" para convertir los profármacos de la invención en fármacos activos libres (véase, por ejemplo, Massey, Nature 328: 457-458 (1987)). Los cóncugados de anticuerpo-abzima pueden prepararse como se ha descrito en el presente documento para suministro de la abzima a una población de células tumorales.

30 Las enzimas anteriores pueden unirse covalentemente con el polipéptido o anticuerpos descritos en el presente documento por técnicas bien conocidas en este campo tales como el uso de agentes de entrecruzamiento heterobifuncionales analizados anteriormente. Como alternativa, pueden construirse proteínas de fusión que comprenden al menos la región de unión a antígeno del anticuerpo de la invención unida con al menos una parte funcionalmente activa de una enzima de la invención usando técnicas de ADN recombinante bien conocidas en este campo (véase, por ejemplo, Neuberger *et al.*, Nature 312: 604-608 (1984)).

7) Anticuerpos biespecíficos y poliespecíficos

40 Los anticuerpos biespecíficos (BsAb) son anticuerpos que tienen especificidades de unión por al menos dos epítopos diferentes, incluyendo los de la misma u otra proteína. Como alternativa, una rama puede armarse para unirse con el antígeno diana, y otra rama puede combinarse con una rama que se une con una molécula desencadenante en un leucocito tal como una molécula receptora de linfocitos T (por ejemplo, CD3), o receptores de Fc para IgG (Fc γ R) tales como Fc γ R1 (CD64), Fc γ RII (CD32) y Fc γ RIII (CD 16), para enfocar y localizar los mecanismos de defensa celular en la célula que expresa antígeno diana. Dichos anticuerpos pueden derivar de anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo anticuerpos biespecíficos F(ab')₂).

También puede usarse anticuerpos biespecíficos para localizar agentes citotóxicos en células que expresan el antígeno diana. Dichos anticuerpos poseen una rama que se une con el antígeno deseado y otra rama que se une con el agente citotóxico (por ejemplo saporina, anti interferón α , alcaloide de la vinca, cadena de ricina A, metotrexato o hapteno de isótopo radiactivo). Los ejemplos de anticuerpos biespecíficos conocidos incluyen anti-ErbB2/anti-Fc γ RIII (documento WO 96/16673), anti-ErbB2/anti-Fc γ RI (documento U.S.P. 5.837.234), anti-ErbB2/anti-CD3 (documento U.S.P. 5.821.337).

55 Se conocen en la técnica métodos para preparar anticuerpos biespecíficos. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina, en los que las dos cadenas tienen especificidades diferentes. Millstein *et al.*, Nature, 305: 537-539 (1983). Debido a la mezcla aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpo diferentes, de las cuales solamente una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que habitualmente se realiza por etapas de cromatografía de afinidad, es más bien molesta, y los rendimientos de producto son bajo. Se desvelan procedimientos similares en el documento WO 93/08829 y en Traunecker *et al.*, EMBO J., 10: 3655-3659 (1991).

De acuerdo con un enfoque diferente, se fusionan dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación de anticuerpo-antígeno) con secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión es preferentemente con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. Se prefiere tener la primera región constante de cadena pesada

(CH1) que contiene el sitio necesario para unión de cadena ligera, presente en al menos una de las fusiones. Se insertan ADN que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina en vectores de expresión separados, y se cotransfectan en un organismo hospedador adecuado. Esto proporciona gran flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos polipeptídicos en realizaciones cuando relaciones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas usadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Es posible, sin embargo, insertar las secuencias codificantes para dos o las tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en relaciones iguales da como resultado altos rendimientos o cuando las relaciones no son particularmente importantes.

En una realización preferida de este enfoque, los anticuerpos biespecíficos se componen de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en una rama, y un par de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrido (que proporciona una segunda especificidad de unión) en la otra rama. Se descubrió que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones de cadenas de inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en solamente la mitad de las moléculas biespecíficas proporciona un modo de separación fácil. Este enfoque se desvela en el documento WO 94/04690. Para más detalles de la generación de anticuerpos biespecíficos, véase, por ejemplo, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology* 121: 210 (1986).

De acuerdo con otro enfoque descrito en el documento WO 96/27011 o U.S.P. 5.731.168, la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpo puede modificarse por ingeniería genética para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo celular recombinante. La interfaz preferida comprende al menos una parte de la región CH3 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, se reemplazan una o más cadenas laterales de aminoácidos de la interfaz de la primera molécula de anticuerpo con cadenas laterales mayores (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la cadena o las cadenas laterales grandes en la interfaz de la segunda molécula de anticuerpo reemplazando cadenas laterales de aminoácidos grandes con unas más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero frente a otros productos finales no deseados tales como homodímeros.

Se han descrito en la bibliografía técnicas para generar anticuerpos biespecíficos de fragmentos de anticuerpo. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos biespecíficos usando enlace químico. Brennan *et al.*, *Science* 229: 81 (1985) describen un procedimiento en el que se escinden proteolíticamente anticuerpos intactos para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente formador de complejo de ditiol arsenita sódica para estabilizar ditiolos vecinos y evitar la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos Fab' generados se convierten después en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados de Fab'-TNB se reconvierte después en el derivado de Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden usarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

Pueden recuperarse directamente fragmentos Fab' de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby *et al.*, *J. Exp. Med.* 175: 217-225 (1992) describe la producción de moléculas de anticuerpo biespecíficas completamente humanizadas F(ab')₂. Cada fragmento Fab' se secretó por separado de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico directo *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico formado de este modo fue capaz de unirse con células que sobreexpresaban el receptor ErbB2 y linfocitos T humanos normales, así como desencadenar la actividad lítica de linfocitos citotóxicos humanos contra dianas de tumor de mama humano.

También se han descrito diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpos bivalentes directamente de cultivo celular recombinante. Por ejemplo, se han producido heterodímeros bivalentes usando cremalleras de leucina. Kostelny *et al.*, *J. Immunol.*, 148(5): 1547-1553 (1992). Los péptidos de cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se ligaron a las partes Fab' de dos anticuerpos diferentes por fusión génica. Los homodímeros de anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y después se volvieron a oxidar para formar los heterodímeros de anticuerpo. La tecnología de "diacuerpo" descrita por Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpo bivalentes/biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado con un dominio variable de cadena ligera (V_L) por un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. En consecuencia, se obliga a los dominios V_H y V_L de un fragmento a emparejarse con los dominios V_L y V_H complementarios de otro fragmento, formando de este modo dos sitios de unión a antígeno. También se ha presentado otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpo bivalentes/biespecíficos mediante el uso de dímeros de Fv monocatenarios (sFv). Véase Gruber *et al.*, *J. Immunol.*, 152: 5368 (1994).

Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos triespecíficos. Tutt *et al.*, *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

Pueden unirse anticuerpos biespecíficos ejemplares con dos epítomos diferentes en una molécula dada. Como alternativa, puede combinarse una rama antiproteína con una rama que se une con una molécula desencadenante en un leucocito tal como una molécula receptora de linfocitos T (por ejemplo, CD2, CD3, CD28 o B7), o receptores de Fc para IgG (Fc γ R), tales como Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) y Fc γ RIII (CD 16) para centrar los mecanismo de defensa celular en la célula que expresa la proteína particular. También pueden usarse anticuerpos biespecíficos para localizar agentes citotóxicos en células que expresan una proteína particular. Dichos anticuerpos poseen una rama de unión a proteína y una rama que se une con un agente citotóxico o un quelante de radionúclidos, tal como EOTUBE, DPTA, DOTA o TETA. Otro anticuerpo biespecífico de interés se une con la proteína de interés y se une además con el factor tisular (TF).

8) Anticuerpos multivalentes

Un anticuerpo multivalente puede internalizarse (y/o catabolizarse) más rápido que un anticuerpo bivalente por una célula que expresa un antígeno con el que se unen los anticuerpos. Los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos multivalentes (que son distintos de la clase IgM) con tres o más sitios de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpos tetravalentes), que pueden producirse fácilmente por expresión recombinante de ácido nucleico que codifica las cadenas polipeptídicas del anticuerpo. El anticuerpo multivalente puede comprender un dominio de dimerización y tres o más sitios de unión a antígeno. El dominio de dimerización preferido comprende (o consiste en) una región Fc o una región bisagra. En este escenario, el anticuerpo comprenderá una región Fc y tres o más sitios de unión a antígeno amino terminales de la región Fc. El anticuerpo multivalente preferido en el presente documento comprende (o consiste en) de tres a aproximadamente ocho, pero preferentemente cuatro sitios de unión a antígeno. El anticuerpo multivalente comprende al menos una cadena polipeptídica (preferentemente dos cadenas polipeptídicas), en comprendiendo la cadena o las cadenas polipeptídicas dos o más dominios variables. Por ejemplo, la cadena o las cadenas polipeptídicas pueden comprender VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc, en la que VD1 es un primer dominio variable, VD2 es un segundo dominio variable, Fc es una cadena polipeptídica de una región Fc, X1 y X2 representan un aminoácido o polipéptido y n es 0 o 1. Por ejemplo, la cadena o las cadenas polipeptídicas pueden comprender: VH-CH1-enlazador flexible-VH-CH1-cadena de región Fc; o VH-CH1-VH-CH1-cadena de región Fc. El anticuerpo multivalente en el presente documento comprende preferentemente además al menos dos (y preferentemente cuatro) polipéptidos de dominio variable de cadena ligera. El anticuerpo multivalente en el presente documento puede, por ejemplo, comprender de aproximadamente dos a aproximadamente ocho polipéptidos de dominio variable de cadena ligera. Los polipéptidos de dominio variable de cadena ligera contemplados aquí comprenden un dominio variable de cadena ligera y, opcionalmente, comprenden además un dominio CL.

9) Anticuerpos heteroconjugados

Los anticuerpos heteroconjugados también están dentro del alcance de la presente invención. Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos de dos anticuerpos unidos covalentemente. Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede acoplarse con avidina, el otro con biotina. Se ha propuesto que dichos anticuerpos, por ejemplo, dirigen células del sistema inmunitario a células no deseadas, documento U.S.P. 4.676.980, y para el tratamiento de infección por VIH. Documentos WO 91/00360, WO 92/200373 y EP 0308936. Se contempla que los anticuerpos pueden prepararse *in vitro* usando métodos conocidos en la química de proteínas sintéticas, incluyendo los que implican agentes de entrecruzamiento. Por ejemplo, pueden construirse inmunotoxinas usando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace de tioéter. Los ejemplos de reactivos adecuados para este fin incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato y los desvelados, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 4.676.980. Pueden prepararse anticuerpos heteroconjugados usando cualquier método de entrecruzamiento conveniente. Se conocen bien en la técnica agentes de entrecruzamiento adecuados, y se desvelan en la Patente de Estados Unidos N° 4.676.980, junto con varias técnicas de entrecruzamiento.

10) Ingeniería de la función efectora

Puede ser deseable modificar el anticuerpo de la invención con respecto a la función efectora, por ejemplo, para potenciar la citotoxicidad mediada por células dependiente de antígeno (ADCC) y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) del anticuerpo. Esto puede conseguirse introduciendo una o más sustituciones de aminoácidos en una región Fc del anticuerpo. Como alternativa o adicionalmente, puede introducirse un resto o restos de cisteína en la región Fc, permitiendo de este modo la formación de enlaces disulfuro intercatenarios en esta región. El anticuerpo homodimérico generado de este modo puede tener capacidad de internalización mejorada y/o destrucción celular medida por complemento y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) aumentadas. Véase Caron *et al.*, J. Exp Med. 176: 1191-1195 (1992) y Shopes, B. J. Immunol. 148: 2918-2922 (1992). También pueden prepararse anticuerpos homodiméricos con actividad antitumoral potenciada usando agentes de entrecruzamiento heterobifuncionales como se describe en Wolff *et al.*, Cancer Research 53: 2560-2565 (1993). Como alternativa, puede obtenerse por ingeniería genética un anticuerpo que tiene regiones Fc dobles y puede tener por lo tanto lisis del complemento y capacidades de ADCC potenciados. Véase Stevenson *et al.*, Anti-Cancer Drug Design 3: 219-230 (1989).

Para aumentar la semivida en suero del anticuerpo, se puede incorporar un epítipo de unión a receptor de rescate en el anticuerpo (especialmente un fragmento de anticuerpo) como se describe en la Patente de Estados Unidos 5.739.277, por ejemplo. Como se usa en el presente documento, la expresión "epítipo de unión a receptor de rescate" se refiere a un epítipo de la región Fc de una molécula de IgG (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄) que es responsable de aumentar la semivida en suero *in vivo* de la molécula de IgG.

11) Inmunconjugados

La invención también se refiere a inmunconjugados o conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC), que comprenden un anticuerpo conjugado con un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico, toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma), o un isótopo radiactivo (por ejemplo, un radioconjugado). Dicho ADC debe mostrar un perfil de seguridad aceptable.

El uso de ADC para el suministro local de agentes citotóxicos o citostáticos, por ejemplo, fármacos para destruir o inhibir células tumorales en el tratamiento de cáncer [Syrigos y Epenetos, *Anticancer Research* 19: 605-14 (1999); Niculescu-Duvaz y Springer, *Adv. Drug Del. Rev.* 26: 151-72 (1997); documento US 4.975.278] permite teóricamente el suministro dirigido del resto farmacológico a tumores, y la acumulación intracelular en los mismos, en los que la administración sistémica de estos agentes farmacológicos no conjugados puede dar como resultado niveles inaceptables de toxicidad para células normales así como las células tumorales que se intenta eliminar (Baldwin *et al.*, *Lancet*, 603-05 (1986); Thorpe, (1985) *Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review*, en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, A. Pinchera *et al.* (eds), pp. 475-506). Se busca de este modo máxima eficacia con mínima toxicidad. Se ha indicado que tanto los anticuerpos policlonales como los anticuerpos monoclonales son útiles en estas estrategias (Rowland *et al.*, *Cancer Immunol. Immunother.* 21: 183-87 (1986)). Los fármacos usados en estos métodos incluyen daunomicina, doxorubicina, metotrexato y vindesina. Las toxinas usadas en conjugados de anticuerpo-toxina incluyen toxinas bacterianas tales como toxina diftérica, toxinas vegetales tales como ricina, toxinas de moléculas pequeñas tales como geldanamicina (Mandler *et al.* *J. Nat. Cancer Inst.* 92(19): 1573-81 (2000); Mandler *et al.*, *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10: 1025-28 (2000); Mandler *et al.* *Bioconjugate Chem.* 13: 786-91 (2002)), maitansinoides (documento EP 1391213; Liu *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 8618-23 (1996)) y caliqueamicina (Lode *et al.*, *Cancer Res.* 58: 2928 (1998); y Hinman *et al.*, *Cancer Res.* 53: 3336-42 (1993)). Las toxinas pueden ejercer sus efectos citotóxicos y citostáticos por mecanismos que incluyen la unión a tubulina, unión a ADN o inhibición de topoisomerasa. Algunos fármacos citotóxicos tienden a estar inactivos o menos activos cuando se conjugan con anticuerpos grandes o ligandos de receptor de proteínas.

Se han descrito anteriormente agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de dichos inmunconjugados, e incluyen BANU, estreptozocina, vincristina, vinblastina, adriamicina y 5-fluorouracilo.

Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que pueden usarse incluyen cadena de difteria A, fragmentos activos sin unión de toxina diftérica, cadena de exotoxina A (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena de ricina A, cadena de abrina A, cadena de modeccina A, alfa sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Está disponible diversos radionúclidos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen ²¹²Bi, ¹³¹I, ¹³¹In, ⁹⁰Y y ¹⁸⁶Re. Se preparan conjugados del anticuerpo y agente citotóxico usando diversos agentes de acoplamiento con proteínas bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno 2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, puede prepararse una inmunotoxina de ricina como se describe en Vitetta *et al.*, *Science*, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilen triaminopentaacético marcado con carbono 14 (MX-DTPA) es un agente quelante ejemplar para la conjugación de radionucleótidos con el anticuerpo. Véase, por ejemplo, documento WO 1994/11026.

Se preparan conjugados del anticuerpo y agente citotóxico usando diversos agentes de acoplamiento con proteínas bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno 2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, puede prepararse una inmunotoxina de ricina como se describe en Vitetta *et al.*, *Science*, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilen triaminopentaacético marcado con carbono 14 (MX-DTPA) es un agente quelante ejemplar para la conjugación del radionucleótido con el anticuerpo. Véase, documento WO94/11026. El enlazador puede ser un "enlazador escindible" que facilita la liberación del fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, puede usarse un enlazador lábil por ácidos, enlazador sensible a peptidasa, enlazador de dimetilo o enlazador que contiene disulfuro (Chari *et al.*, *Cancer Res.* 52: 127-131 (1992)).

Adicionalmente, las toxinas de moléculas pequeñas tales como caliqueamicina, maitansina (documento U.S.P. 5.208.020), tricoteceno y CC1065 también se contemplan como toxinas conjugables para su uso con la formulación de la invención. En una realización, el anticuerpo de longitud completa o fragmentos de unión a antígeno del mismo pueden conjugarse con una o más moléculas de maitansinoide (por ejemplo, de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 moléculas de maitansinoide por molécula de anticuerpo). Los maitansinoides son inhibidores mitóticos que actúan inhibiendo la polimerización de tubulina. Se han descrito maitansinoides, aislados de fuentes naturales o preparados de forma sintética, incluyendo maitansina, maitansinal y derivados y análogos de los mismos, véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 5.208.020 y referencias citadas en la misma (véase col. 2, línea 53 a col. 3, línea 10) y Patentes de Estados Unidos 3.896.111 y 4.151.042. También se describen métodos para preparar conjugados de anticuerpo-maitansinoide en la Patente de Estados Unidos N° 5.208.020. En una realización preferida, un maitansinoide se une con el anticuerpo mediante un grupo enlazador disulfuro u otro que contenga azufre. La maitansina puede, por ejemplo, convertirse a May-SS-Me, que puede reducirse a May-SH3 y hacerse reaccionar con anticuerpo modificado para generar un inmunoconjugado de maitansinoide-anticuerpo. Chari *et al.*, Cancer Res. 52: 127-131 (1992). El anticuerpo puede modificarse por métodos conocidos y el anticuerpo que contiene grupos tioles libres o protegidos se hace reaccionar después con un disulfuro que contiene maitansinoide para producir el conjugado. La citotoxicidad del conjugado de anticuerpo-maitansinoide puede medirse *in vitro* o *in vivo* por métodos conocidos y determinarse la CI_{50} .

La caliqueamicina es otro inmunoconjugado de interés. La familia de caliqueamicina de antibióticos es capaz de producir roturas de ADN bicatenarias a concentraciones subpicomolares. Los análogos estructurales de caliqueamicina que pueden usarse incluyen, pero sin limitación, γ_1^1 , α_2^1 , α_3^1 , N-acetil- γ_1^1 , PSAG y θ_1^1 (Hinman *et al.*, Cancer Res. 53: 3336-3342 (1993) y Lode *et al.*, Cancer Res. 58: 2925-2928 (1998)). Otros fármacos antitumorales con los que puede conjugarse el anticuerpo incluyen QFA que es un anti folato. Tanto caliqueamicina como QFA tienen sitios intracelulares de acciones y no cruzan fácilmente la membrana plasmática. Por lo tanto, la captación celular de estos agentes mediante internalización mediada por anticuerpos potencia en gran medida sus efectos citotóxicos.

También se contemplan inmunoconjugados formados entre un anticuerpo y un compuesto con actividad nucleolítica (por ejemplo, una ribonucleasa o ADN endonucleasa tal como desoxirribonucleasa, DNasa).

En los ADC de la invención, un anticuerpo (Ab) se conjuga con uno o más restos farmacológicos (D), por ejemplo de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 restos farmacológicos por anticuerpo, mediante un enlazador (L). El ADC de la Fórmula I puede prepararse por varias rutas, empleando reacciones de química orgánica, condiciones y reactivos conocidos por los expertos en la materia, incluyendo: (1) reacción de un grupo nucleófilo de un anticuerpo con un reactivo enlazador bivalente, para formar Ab-L, mediante un enlace covalente, seguido de reacción con un resto farmacológico D; y (2) reacción de un grupo nucleófilo de un resto farmacológico con un reactivo enlazador bivalente, para formar D-L, mediante un enlace covalente seguido de reacción con el grupo nucleófilo de un anticuerpo.

Ab-(L-D)_p Fórmula I

Los grupos nucleófilos en anticuerpos incluyen, pero sin limitación: (i) grupos de amina N terminal, (ii) grupos de amina de cadena lateral, por ejemplo, lisina, (iii) grupos de tiol de cadena lateral, por ejemplo cisteína, y (iv) grupos de hidroxilo o amino de azúcares en los que el anticuerpo está glucosilado. Los grupos de amina, tiol e hidroxilo son nucleófilos y capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en restos enlazadores y reactivos enlazadores incluyendo: (i) ésteres activos tales como ésteres de NHS, ésteres de HOBt, haloformatos y haluros ácidos; (ii) alquil y bencil haluros tales como haloacetamidas; y (iii) aldehídos, cetonas, grupos carboxilo y maleimida. Ciertos anticuerpos tienen disulfuros intercatenarios reducibles, es decir enlaces de cisteína. Los anticuerpos pueden hacerse reactivos para conjugación con reactivos enlazadores mediante tratamiento con un agente reductor tal como DTT (ditiotreitól). Cada enlace de cisteína formará por lo tanto, teóricamente, dos nucleófilos de tiol reactivos. Pueden introducirse grupos nucleófilos adicionales en anticuerpos mediante la reacción de lisinas con 2-iminotiolano (reactivo de Traut) que da como resultado conversión de una amina en un tiol.

Los ADC de la invención también pueden producirse por modificación del anticuerpo para introducir restos electrófilos, que pueden reaccionar con sustituyentes nucleófilos en el reactivo enlazador o fármaco. Los azúcares de anticuerpos glucosilados pueden oxidarse, por ejemplo con reactivos oxidantes de peryodato, para formar grupos de aldehído o cetona que pueden reaccionar con el grupo amina de reactivos enlazadores o restos farmacológicos. Los grupos básicos de Schiff de imina resultantes pueden formar un enlace estable, o pueden reducirse, por ejemplo mediante reactivos de borohidruro para formar enlaces de amina estables. En una realización, la reacción de la parte de carbohidrato de un anticuerpo glucosilado con galactosa oxidasa o metaperyodato sódico puede producir grupos carbonilo (aldehído y cetona) en la proteína que pueden reaccionar con grupos apropiados en el fármaco (Domen *et al.*, J. Chromatog., 510: 293-302 (1990)). En otra realización, las proteínas que contienen restos de serina o treonina N terminales pueden reaccionar con metaperyodato sódico, dando como resultado la producción de un aldehído en lugar del primer aminoácido (Geoghegan y Stroh, Bioconjugate Chem. 3: 138-46 (1992); documento US 5.362.852). Dicho aldehído puede reaccionar con un resto farmacológico o nucleófilo enlazador.

De forma similar, los grupos nucleófilos en un resto farmacológico incluyen, pero sin limitación: grupos amina, tiol, hidroxilo, hidrazida, oxima, hidrazina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidrazina y arilhidrazida capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en restos enlazadores y reactivos enlazadores incluyendo: (i) ésteres activos tales como ésteres de NHS, ésteres de HOBt, haloformatos y haluros ácidos; (ii) alquil y bencil haluros tales como haloacetamidas; y (iii) aldehídos, cetonas, grupos carboxilo y maleimido

Como alternativa, una proteína de fusión que comprende el anticuerpo y agente citotóxico puede prepararse, por ejemplo, por técnicas recombinantes o síntesis peptídica. El tramo de ADN puede comprender regiones respectivas que codifican las dos partes del conjugado bien adyacentes entre sí o bien separadas por una región que codifica un péptido enlazador que no destruye las propiedades deseadas del conjugado.

En otra realización más, el anticuerpo puede conjugarse con un "receptor" (tal como estreptavidina) para utilización en predirección tumoral en la que el conjugado de anticuerpo-receptor se administra al paciente, seguido de retirada de conjugado no unido de la circulación usando un agente de eliminación y después de administración de un "ligando" (por ejemplo, avidina) que se conjuga con un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido).

Los ADC del presente documento se preparan opcionalmente con reactivos de entrecruzamiento: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC y sulfo-SMPB y SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona)benzoato), que están disponibles en el mercado (por ejemplo, Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL).

El anticuerpo también puede conjugarse con un átomo altamente radiactivo. Está disponible diversos radionúclidos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen At^{211} , Bi^{212} , I^{131} , In^{111} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , P^{32} y Pb^{212} e isótopos radiactivos de Lu. Cuando el conjugado se usa para diagnóstico, puede comprender un átomo radiactivo para estudios escintigráficos, por ejemplo Tc^{99} o I^{123} , o un marcador de espín para captura de imágenes por resonancia magnética nuclear (nmr) (también conocida como captura de imágenes por resonancia magnética, mri), tal como yodo-123, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

Los radiomarcadores u otros marcadores pueden incorporarse en el conjugado de maneras conocidas. Por ejemplo, el péptido puede biosintetizarse o puede sintetizarse por síntesis de aminoácidos química usando precursores de aminoácidos adecuados que implican, por ejemplo, flúor 19 en lugar de hidrógeno. Pueden unirse marcadores tales como Tc^{99} o I^{123} , Re^{186} , Re^{188} e In^{111} mediante un resto de cisteína en el péptido. Puede unirse Itrio 90 mediante un resto de lisina. Puede usarse el método de IODOGEN[®] para incorporar yodo 123, Fraker *et al.*, Biohem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57 (1978). Otros métodos para conjugar radionúclidos se describen en "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy," (Chatal, CRC Press 1989).

Como alternativa, puede realizarse una proteína de fusión que comprende el anticuerpo y el agente citotóxico por técnicas recombinantes o síntesis peptídica. El tramo de ADN puede comprender regiones respectivas que codifican las dos partes del conjugado bien adyacentes entre sí o bien separadas por una región que codifica un péptido enlazador que no destruye las propiedades deseadas del conjugado.

En otra realización, el anticuerpo puede conjugarse con un "receptor" (tal como estreptavidina) para su utilización en la predirección tumoral en la que el conjugado anticuerpo-receptor se administra al paciente, seguido de retirada de conjugado no unido de la circulación usando un agente de eliminación y después administración de un "ligando" (por ejemplo, avidina) que se conjuga con un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido).

12) Otras modificaciones de secuencia de aminoácidos

Se contemplan una modificación o modificaciones de secuencia de aminoácidos de los anticuerpos descritos en el presente documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Se preparan variantes de secuencia de aminoácidos del anticuerpo introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ácido nucleico del anticuerpo o mediante síntesis peptídica. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones de y/o inserciones en y/o sustituciones de, restos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución se realiza para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas. Los cambios de aminoácidos también pueden alterar los procesos post-traduccionales del anticuerpo, tales como cambiar el número o posición de los sitios de glucosilación.

Un método útil para la identificación de ciertos restos o regiones del anticuerpo que son localizaciones preferidas para mutagénesis se denomina "mutagénesis de exploración de alanina" como se describe en Cunningham y Wells en Science, 244: 1081-1085 (1989). Aquí se identifica un resto o grupo de restos diana (por ejemplo, restos cargados tales como arg, asp, his, lys y glu) y se reemplazan por un aminoácido con carga negativa o neutro (más preferentemente alanina o polialanina) para afectar a la interacción del antígeno de los aminoácidos. Esas localizaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan después introduciendo variantes adicionales u otras en, o para, los sitios de sustitución. Por lo tanto, aunque el sitio para

introducir una variación de secuencia de aminoácidos está predeterminado, no es necesario que la naturaleza de la mutación en sí misma esté predeterminada. Por ejemplo, para analizar el rendimiento de una mutación en un sitio dado, se realiza exploración de alanina o mutagénesis aleatoria en el codón o región diana y las variantes de anticuerpo expresadas se exploran con respecto a la actividad deseada.

Las inserciones de secuencia de aminoácidos incluyen fusiones amino y/o carboxilo terminales que varían de longitud de un resto a polipéptidos que contienen cien o más restos, así como inserciones intrasecuencia de restos de aminoácidos individuales o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un resto de metionilo N terminal o el anticuerpo fusionado con un polipéptido citotóxico. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión con el extremo N o C terminal del anticuerpo con una enzima (por ejemplo para ADEPT) o un polipéptido que aumenta la semivida en suero del anticuerpo.

Otro tipo de variante es una variante de sustitución de aminoácidos. Estas variantes tienen al menos un resto de aminoácido en la molécula de anticuerpo reemplazado por un resto diferente. Los sitios de mayor interés para mutagénesis de sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan alteraciones de FR. Se muestran sustituciones conservativas en la Tabla A bajo el encabezamiento de "sustituciones preferidas". Si dichas sustituciones dan como resultado un cambio de la actividad biológica, entonces pueden introducirse más cambios sustanciales, denominados "sustituciones ejemplares" en la Tabla A, o como se describe adicionalmente posteriormente en referencia a clases de aminoácidos, y explorarse los productos.

TABLA A

Sustituciones de aminoácidos		
Resto Original	Sustituciones Ejemplares	Sustituciones Preferidas
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; asp, lys; arg	gln
Asp (D)	glu; asn	glu
Cys (C)	ser; ala	ser
Gln (Q)	asn; glu	asn
Glu (E)	asp; gln	asp
Gly (G)	ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucina	leu
Leu (L)	norleucina; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	tyr
Pro (P)	Ala	ala
Ser (S)	Thr	thr
Thr (T)	Ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucina	leu

Se consiguen modificaciones sustanciales de las propiedades biológicas del anticuerpo seleccionando sustituciones que difieren significativamente en su efecto en el mantenimiento de (a) la estructura de la cadena principal polipeptídica en el área de sustitución, por ejemplo, como una conformación de lámina o helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana o (c) el volumen de la cadena lateral. Los restos de origen natural se dividen en grupos basándose en propiedades de cadena lateral comunes:

- (1) hidrófobos: norleucina, met, ala, val, leu, ile;
- (2) hidrófilos neutros: cys, ser, thr;
- (3) ácidos: asp, glu;
- (4) básicos: asn, gln, his, lys, arg;
- (5) restos que influyen en la orientación de cadena: gly, pro; y
- (6) aromáticos: trp, tyr, phe.

Las sustituciones no conservativas implicarán intercambiar un miembro de una de estas clases por otra clase.

También puede sustituirse cualquier resto de cisteína no implicado en el mantenimiento de la conformación apropiada del anticuerpo, generalmente con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar el entrecruzamiento aberrante. Por el contrario, pueden añadirse un enlace o enlaces de cisteína al anticuerpo para mejorar su estabilidad (particularmente cuando el anticuerpo sea un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fv).

Un tipo particularmente preferido de variante de sustitución implica sustituir uno o más restos de región hipervariable de un anticuerpo parental (por ejemplo un anticuerpo humanizado o humano). Generalmente, la variante o las variantes resultantes seleccionadas para desarrollo posterior tendrán propiedades biológicas mejoradas en relación con el anticuerpo parental del que se generaron. Un modo conveniente para generar dichas variantes de sustitución implica maduración por afinidad usando presentación de fagos. Brevemente, se mutan varios sitios de región hipervariable (por ejemplo, 6-7 sitios) para generar todas las posibles sustituciones amino en cada sitio. Las variantes de anticuerpo generadas de este modo se presentan de una manera monovalente de partículas de fago filamentoso como fusiones con el producto del gen III de M13 empaquetado dentro de cada partícula. Las variantes presentadas en fagos se exploran después con respecto a su actividad biológica (por ejemplo afinidad de unión) como se desvela en el presente documento. Para identificar sitios de región hipervariable candidatos para modificación, puede realizarse mutagénesis de exploración de alanina para identificar restos de región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión de antígeno. Como alternativa, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo e IgE. Dichos restos de contacto y restos adyacentes son candidatos para sustitución de acuerdo con las técnicas elaboradas en el presente documento. Una vez que se han generado dichas variantes, el panel de variantes se somete a exploración como se describe en el presente documento y pueden seleccionarse anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes para desarrollo posterior.

Otro tipo de variante de aminoácidos del anticuerpo altera el patrón de glucosilación original del anticuerpo. Por alterar se entiende suprimir uno o más restos de carbohidratos hallados en el anticuerpo y/o añadir uno o más sitios de glucosilación que no están presentes en el anticuerpo.

La glucosilación de anticuerpos es normalmente ligada a N o ligada a O. Ligada a N se refiere a la unión del resto de carbohidrato con la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en las que X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para unión enzimática del resto de carbohidrato con la cadena lateral de asparagina. Por lo tanto, la presencia de una de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio de glucosilación potencial. La glucosilación ligada a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa con un hidroxiaminoácido, más habitualmente serina o treonina, aunque también puede usarse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

La adición de sitios de glucosilación al anticuerpo se consigue convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de modo que contenga una o más de las secuencias tripeptídicas anteriormente descritas (para sitios de glucosilación ligados a N). La alteración también puede realizarse mediante la adición de, o sustitución por, uno o más restos de serina o treonina en la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glucosilación ligados a O).

Se preparan moléculas de ácido nucleico que codifican variantes de secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti IgE por diversos métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, pero sin limitación, aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencia de aminoácidos de origen natural) o preparación por mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida), mutagénesis por PCR y mutagénesis por casete de una versión variante o una no variante preparada anteriormente del anticuerpo anti IgE.

13) Otras modificaciones de anticuerpos

Los anticuerpos de la presente invención pueden modificarse adicionalmente para contener restos no proteicos adicionales que se conocen en la técnica y están fácilmente disponibles. Preferentemente, los restos adecuados para derivatización del anticuerpo son polímeros solubles en agua. Los ejemplos no limitantes de polímeros solubles en agua incluyen, pero sin limitación, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhidrido maleico, poliaminoácidos (homopolímeros o copolímeros aleatorios) y dextrano o poli(*n*-vinil pirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de polipropilenglicol, copolímeros de óxido de

polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxietilados (por ejemplo, glicerol), alcohol polivinílico y mezclas de los mismos. El polietilenglicol propionaldehído puede tener ventajas en la preparación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede ser de cualquier peso molecular, y puede ser ramificado o no ramificado. El número de polímeros unidos con el anticuerpo puede variar, y si se unen más de un polímero, pueden ser moléculas iguales o diferentes.

En general, el número y/o tipo de polímeros usados para derivatización puede determinarse basándose en consideraciones que incluyen, pero sin limitación, las propiedades y funciones particulares del anticuerpo para mejorar, si el derivado de anticuerpo se usará en una terapia en condiciones definidas, etc. Dichas técnicas y otras formulaciones adecuadas se desvelan en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª Ed., Alfonso Gennaro, Ed., Philadelphia College of Pharmacy and Science (2000).

C. Formulaciones farmacéuticas

Se preparan formulaciones terapéuticas para almacenamiento mezclando el principio activo que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizadores opcionales farmacéuticamente aceptables (Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª Ed., Lippincott Williams & Wilkins, Pub., Gennaro Ed., Philadelphia, PA 2000). Los vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones, antioxidantes incluyendo ácido ascórbico, metionina, Vitamina E, metabisulfito sódico; conservantes, isotonicadores, estabilizadores, complejos metálicos (por ejemplo complejos de Zn-proteína); agentes quelantes tales como EDTA y/o tensioactivos no iónicos.

Cuando el agente terapéutico es un fragmento de anticuerpo, se prefiere el fragmento inhibidor más pequeño que se une específicamente con el dominio de unión de la proteína diana. Por ejemplo, basándose en las secuencias de región variable de un anticuerpo, pueden diseñarse fragmentos de anticuerpo o incluso moléculas peptídicas que conservan la capacidad para unirse con la secuencia proteica diana. Dichos péptidos pueden sintetizarse químicamente y/o producirse por tecnología de ADN recombinante (véase, por ejemplo, Marasco *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 7889-7893 [1993]).

Se usan tampones para controlar el pH en un intervalo que optimiza la eficacia terapéutica, especialmente si la estabilidad es dependiente de pH. Los tampones están preferentemente presentes a concentraciones que varían de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 250 mM. Los agentes tamponantes adecuados para su uso con la presente invención incluyen ácidos orgánicos e inorgánicos y sales de los mismos. Por ejemplo, citrato, fosfato, succinato, tartrato, fumarato, gluconato, oxalato, lactato, acetato. Adicionalmente, los tampones pueden comprender histidina y sales de trimetilamina tales como Tris.

Se añaden conservantes para retardar el crecimiento microbiano, y están presentes normalmente en un intervalo de 0,2 % a 1,0 % (p/v). Los conservantes adecuados para su uso con la presente invención incluyen cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; haluros de benzalconio (por ejemplo, cloruro, bromuro, yoduro), cloruro de bencetonio; timerosal, fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol, resorcinol; ciclohexanol, 3-pentanol y *m*-cresol.

Están presentes agentes de tonicidad, en ocasiones conocidos como “estabilizadores” para ajustar o mantener la tonicidad del líquido en una composición. Cuando se usa con biomoléculas cargadas, grandes, tales como proteínas y anticuerpos, se denominan “estabilizadores” porque pueden interaccionar con los grupos cargados de las cadenas laterales de aminoácidos, reduciendo de este modo el potencial de interacciones inter e intramoleculares. Pueden estar presentes agentes de tonicidad en cualquier cantidad entre 0,1 % y 25 % en peso, preferentemente de 1 % a 5 %, teniendo en cuenta las cantidades relativas de los otros ingredientes. Los agentes de tonicidad preferidos incluyen alcoholes de azúcares polihídricos, preferentemente alcoholes de azúcares trihídricos o superiores, tales como glicerina, eritritol, arabitol, xilitol, sorbitol y manitol.

Los excipientes adicionales incluyen agentes que pueden actuar como uno o más de los siguientes: (1) agentes de masificación, (2) potenciadores de la solubilidad, (3) estabilizadores y (4) agentes que evitan la desnaturalización o adherencia a la pared del recipiente. Dichos excipientes incluyen: alcoholes de azúcares polihídricos (enumerados anteriormente); aminoácidos tales como alanina, glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, lisina, ornitina, leucina, 2-fenilalanina, ácido glutámico, treonina, etc.; azúcares orgánicos o alcoholes de azúcares tales como sacarosa, lactosa, lactitol, trehalosa, estaquiosa, manosa, sorbosa, xilosa, ribosa, ribitol, mioininitosa, mioininitol, galactosa, galactitol, glicerol, ciclitols (por ejemplo, inositol), polietilenglicol; agentes reductores que contienen azufre, tales como urea, glutatión, ácido tióctico, tioglicolato sódico, tioglicerol, α -monotioglicerol y tiosulfato sódico; proteínas de bajo peso molecular tales como albúmina de suero humano, albúmina de suero bovino, gelatina u otras inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; monosacáridos (por ejemplo, xilosa, manosa, fructosa, glucosa); disacáridos (por ejemplo, lactosa, maltosa, sacarosa); trisacáridos tales como rafinosa; y polisacáridos tales como dextrina o dextrano.

Están presentes tensioactivos no iónicos o detergentes (también conocidos como “agentes humectantes”) para ayudar a solubilizar el agente terapéutico así como para proteger la proteína terapéutica contra agregación inducida por agitación, que también permite que la formulación se exponga a tensión de cizallamiento superficial sin provocar la desnaturalización de la proteína terapéutica activa o anticuerpo. Los tensioactivos no iónicos están presentes en

un intervalo de aproximadamente 0,05 mg/ml a aproximadamente 1,0 mg/ml, preferentemente aproximadamente 0,07 mg/ml a aproximadamente 0,2 mg/ml.

Los tensioactivos no iónicos adecuados incluyen polisorbatos (20, 40, 60, 65, 80, etc.), polioxámeros (184, 188, etc.), polioles PLURONIC®, TRITON®, polioxietilen sorbitán monoéteres (TWEEN®-20, TWEEN®-80, etc.), laurmacrogol 400, estearato de polioxilo 40, aceite de ricino hidrogenado con polioxietileno 10, 50 y 60, monoestearato de glicerol, éster de ácidos grasos de sacarosa, metil celulosa y carboximetil celulosa. Los detergentes aniónicos que pueden usarse incluyen lauril sulfato sódico, dioctil sulfosuccinato sódico y dioctil sulfonato sódico. Los detergentes catiónicos incluyen cloruro de benzalconio o cloruro de bencetonio.

Para que las formulaciones se usen para administración *in vivo*, deben ser estériles. La formulación puede hacerse estéril por filtración mediante membranas de filtración estériles. Las composiciones terapéuticas en el presente documento generalmente se colocan en un recipiente que tiene un orificio de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa de solución intravenosa o recipiente que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica.

La vía de administración es de acuerdo con métodos conocidos y aceptados, tales como por embolada sencilla o múltiple o infusión durante un periodo largo de tiempo de una manera adecuada, por ejemplo, inyección o infusión por vías subcutánea, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intraarterial, intralesional o intraarticular, administración tópica, inhalación o por medios de liberación sostenida o liberación prolongada.

La formulación en el presente documento también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que se trate, preferentemente las que tienen actividades complementarias que no se afectan de forma adversa entre sí. Como alternativa, o además, la composición puede comprender un agente citotóxico, citocina o agente inhibidor del crecimiento. Dichas moléculas están presentes de forma adecuada en combinación en cantidades que son eficaces para el fin pretendido.

Los principios activos también pueden atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de suministro de fármaco coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se desvelan en Remington's Pharmaceutical Sciences 18ª edición, mencionada anteriormente.

La estabilidad de las proteínas y anticuerpos descritos en el presente documento puede potenciarse mediante el uso de "sales metálicas polivalentes solubles en agua" no tóxicas. Los ejemplos incluyen Ga^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Sn^{2+} , Sn^{4+} , Al^{2+} y Al^{3+} . Los aniones ejemplares que pueden formar sales solubles en agua con los cationes metálicos polivalentes anteriores incluyen los formados a partir de ácidos inorgánicos y/o ácidos orgánicos. Dichas sales solubles en agua tienen una solubilidad en agua (20 °C) de al menos aproximadamente 20 mg/ml, como alternativa al menos aproximadamente 100 mg/ml, como alternativa al menos aproximadamente 200 mg/ml.

Los ácidos inorgánicos adecuados que pueden usarse para formar las "sales metálicas polivalentes solubles en agua" incluyen ácido clorhídrico, acético, sulfúrico, nítrico, tiocianico y fosfórico. Los ácidos orgánicos adecuados que pueden usarse incluyen ácido carboxílico alifático y ácidos aromáticos. Los ácidos alifáticos dentro de esta definición pueden definirse como ácidos carboxílicos C_{2-9} saturados o insaturados (por ejemplo, ácidos alifáticos mono, di y tricarboxílicos). Por ejemplo, los ácidos monocarboxílicos ejemplares dentro de esta definición incluyen los ácidos monocarboxílicos C_{2-9} saturados acético, propiónico, butírico, valérico, caproico, enántico, caprílico, pelargónico y capríónico, y los ácidos monocarboxílicos C_{2-9} insaturados, ácidos acrílico, propiólico, metacrílico, crotonico e isocrotonico. Los ácidos dicarboxílicos ejemplares incluyen los ácidos dicarboxílicos C_{2-9} saturados malónico, succínico, glutárico, adípico y pimélico, mientras que los ácidos dicarboxílicos C_{2-9} insaturados incluyen ácidos maleico, fumárico, citracónico y mesacónico. Los ácidos tricarboxílicos ejemplares incluyen los ácidos tricarboxílicos C_{2-9} saturados ácido tricarbálico y 1,2,3-butanotricarboxílico. Adicionalmente, los ácidos carboxílicos de esta definición también pueden contener uno o dos grupos hidroxilo para formar ácidos hidroxicarboxílicos. Los ácidos hidroxicarboxílicos ejemplares incluyen ácido glicólico, láctico, glicérico, tartrónico, málico, tartárico y cítrico. Los ácidos aromáticos dentro de esta definición incluyen ácido benzoico y salicílico.

Las sales metálicas polivalentes solubles en agua empleadas habitualmente que pueden usarse para ayudar a estabilizar los polipéptidos encapsulados de la presente invención incluyen, por ejemplo: (1) las sales metálicas de ácido inorgánico de haluros (por ejemplo, cloruro de cinc, cloruro de calcio), sulfatos, nitratos, fosfatos y tiocianatos; (2) las sales metálicas de ácido carboxílico alifáticas (por ejemplo, acetato de calcio, acetato de cinc, propionato de calcio, glicolato de cinc, lactato de calcio, lactato de cinc y tartrato de cinc), y (3) las sales metálicas de ácido carboxílico aromáticas de benzoatos (por ejemplo, benzoato de cinc) y salicilatos.

D. Métodos de tratamiento

Para la prevención o tratamiento de enfermedad, la dosificación apropiada de un agente activo, dependerá del tipo de enfermedad para tratar, como se ha definido anteriormente, la gravedad y evolución de la enfermedad, si el

agente se administra para fines preventivos o terapéuticos, la terapia previa, el historial clínico del paciente y las respuesta al agente, y el criterio del médico a cargo. El agente se administra de forma adecuada al paciente en una vez o durante una serie de tratamientos.

- 5 Un método preferido de tratamiento es el tratamiento de trastornos mediados por IgE. Los trastornos mediados por IgE incluyen trastornos atópicos, que se caracterizan por una propensión heredada a responder inmunológicamente a muchos antígenos inhalados e ingeridos de origen natural habituales y la producción continua de anticuerpos IgE. Los trastornos atópicos específicos incluyen asma alérgica, rinitis alérgica, dermatitis atópica y gastroenteropatía alérgica. Los pacientes atópicos tienen con frecuencia múltiples alergias, lo que significa que tienen anticuerpos IgE para, y síntomas de, muchos alérgenos ambientales, incluyendo pólenes, hongos (por ejemplo, mohos), residuos animales y de insectos y ciertos alimentos.

15 Sin embargo los trastornos asociados con niveles de IgE elevados no se limitan a los que tienen una etiología heredada (atópica). Otros trastornos asociados con niveles de IgE elevados, que parecen estar mediados por IgE y son tratables con las formulaciones de la presente invención incluyen hipersensibilidad (por ejemplo, hipersensibilidad anafiláctica), eccema, urticaria, aspergilosis broncopulmonar alérgica, enfermedades parasitarias, síndrome de hiper IgE, ataxia-telangiectasia, síndrome de Wiskott-Aldrich, alinfoplasia tímica, mieloma de IgE y reacción de injerto contra hospedador.

20 La *rinitis alérgica*, también conocida como rinoconjuntivitis alérgica o fiebre del heno, es la manifestación más habitual de una reacción atópica a alérgenos inhalados, cuya gravedad y duración es con frecuencia correlativa a la intensidad y duración de la exposición al alérgeno. Es una enfermedad crónica, que puede aparecer en primer lugar a cualquier edad, pero la aparición es habitualmente durante la infancia o la adolescencia. Un ataque típico consiste en rinorrea acuosa profusa, estornudos paroxísmicos, obstrucción nasal y prurito de la nariz y el paladar. El drenaje de mucus postnasal también provoca dolor de garganta, carraspeo y tos. También puede haber síntomas de blefaroconjuntivitis alérgica, con prurito intenso de la conjuntiva y los párpados, enrojecimiento, lagrimeo y fotofobia. Los ataques graves se ven acompañados con frecuencia de malestar sistémico, debilidad, fatiga y en ocasiones dolor muscular después de periodos intensos de estornudos.

30 El *asma*, también conocida como enfermedad de las vías respiratorias obstructiva reversible, se caracteriza por hipersensibilidad del árbol traqueobronquial a irritantes respiratorios y productos químicos broncoconstrictores, produciendo ataques de sibilancia, disnea, compresión en el pecho y tos que son reversibles espontáneamente o con tratamiento. Es una enfermedad crónica que implica a las vías respiratorias completas, pero varía en gravedad de episodios transitorios leves ocasionales a obstrucción bronquial grave, crónica, con peligro para la vida. El asma y la atopía pueden coexistir, pero solamente aproximadamente la mitad de los asmáticos también son atópicos, y un porcentaje aún menor de pacientes atópicos también tienen asma. Sin embargo, la atopía y el asma no son completamente independientes porque el asma aparece más frecuentemente entre individuos atópicos que entre no atópicos, especialmente durante la infancia. El asma se ha dividido históricamente adicionalmente en dos subgrupos, asma extrínseca y asma intrínseca.

40 El asma extrínseca, también conocida como asma alérgica, atópica o inmunológica, describe pacientes que generalmente desarrollan asma en una etapa temprana de la vida, habitualmente durante la infancia o la niñez. Con frecuencia coexisten otras manifestaciones de atopía, incluyendo eccema o rinitis alérgica. Pueden producirse ataques asmáticos durante las temporadas de polen, en presencia de animales o tras exposición a polvo del hogar, almohadas de plumas u otros alérgenos. Los ensayos cutáneos muestran reacciones de roncha y grano positivas a los alérgenos causantes. Resulta interesante que las concentraciones de IgE en suero totales están frecuentemente elevadas, pero en ocasiones son normales.

50 El asma intrínseca, también conocida como asma no alérgica o idiopática, normalmente aparece en primer lugar durante la vida adulta, después de una infección respiratoria aparente. Los síntomas incluyen obstrucción bronquial crónica o recurrente no relacionada con las temporadas de polen o exposición a otros alérgenos. Los ensayos cutáneos son negativos para los alérgenos tópicos habituales, la concentración de IgE en suero es normal. Los síntomas adicionales incluyen sangre en el esputo y eosinofilia. Otros esquemas para clasificar el asma en subgrupos, como sensible a aspirina, inducida por ejercicio, infecciosa y psicológica meramente definen factores desencadenantes externos que afectan a ciertos pacientes más que a otros.

60 Finalmente, es importante observar que aunque algunas clasificaciones han asociado históricamente solamente el asma alérgica con dependencia de IgE, hay ahora datos estadísticamente significativos fuertes que muestran una correlación entre IgE y el asma (tanto alérgica como no alérgica). Capítulo 27, "The Atopic Diseases", A. I. Terr en Medical Immunology, 9ª Ed., Simon y Schuster, Stites *et al*, Ed. (1997). Como resultado, la expresión "trastornos mediados por IgE" para fines de la presente solicitud de patente, incluye asma tanto alérgica como no alérgica.

65 Las señales físicas de un ataque de asma incluyen taquipnea, sibilación audible y uso de los músculos accesorios de la respiración. También están normalmente presentes pulso rápido y presión sanguínea elevada, así como niveles elevados de eosinófilos en la sangre periférica y secreciones nasales. Las funciones pulmonares muestran una reducción de los caudales y volumen espiratorio forzado en un segundo (FEV₁). La capacidad pulmonar total y

capacidad residual funcional son normalmente normales o están ligeramente aumentadas, pero pueden reducirse con broncoespasmo extremo.

La patología del asma puede distinguirse por reacciones de fase temprana y fase tardía. La fase temprana se caracteriza por contracción del músculo liso, edema e hipersecreción, mientras que las reacciones de fase tardía se caracterizan por inflamación celular. El asma puede inducirse por diversos desencadenantes no específicos incluyendo infecciones (por ejemplo, infecciones respiratorias virales), factores fisiológicos (por ejemplo, ejercicio, hiperventilación, respiración profunda, factores psicológicos), factores atmosféricos (por ejemplo dióxido de azufre, amoníaco, aire frío, ozono, vapor de agua destilado), productos ingeridos (por ejemplo, propanolol, aspirina, fármacos antiinflamatorios no esteroideos), inhalantes experimentales (por ejemplo, soluciones hipertónicas, ácido cítrico, histamina, metacolina, prostaglandina $F_{2\alpha}$) e inhalantes ocupacionales (por ejemplo, isocianatos). Diversos alérgenos ocupacionales o ambientales adicionales que provocan asma alérgica pueden incluir productos animales, polvos de insectos, criaturas marinas, productos vegetales, frutas, semillas, hojas y pólenes, colorantes orgánicos y tintas, agentes microbianos, enzimas, agentes terapéuticos, agentes esterilizantes y productos químicos inorgánicos y orgánicos.

La *dermatitis atópica*, también conocida como eccema, neurodermatitis, eccema atópico o prurigo de Besnier, es un trastorno cutáneo crónico común específico de un subconjunto de pacientes con las características familiares inmunológicas de la atopia. La característica esencial es una respuesta inflamatoria dérmica prurítica, que induce una erupción cutánea con distribución simétrica característica con predilección por ciertos sitios. También es frecuente la sobreproducción de IgE por linfocitos B. Aunque la dermatitis atópica se clasifica como una forma cutánea de atopia porque se asocia con rinitis alérgica y asma y altos niveles de IgE, la gravedad de la dermatitis, sin embargo, no siempre se correlaciona con exposición a alérgenos en ensayos cutáneos, y la desensibilización (a diferencia de otras enfermedades alérgicas) no es un tratamiento eficaz. Aunque IgE alto en suero confirma un diagnóstico del asma alérgica, los niveles normales no lo excluyen. La aparición de la enfermedad puede producirse a cualquier edad, y las lesiones comienzan de forma aguda con pápula edematosa eritematosa o placa con escamas. El prurito conduce a supuración y formación de costra, después a liquenificación crónica. Al nivel celular, la lesión aguda es edémica y se infiltran células mononucleares, linfocitos CD4 en la dermis. Los neutrófilos, eosinófilos, células plasmáticas y basófilos son poco comunes, pero están presentes mastocitos desgranulados. Las lesiones crónicas presentan hiperplasia epidérmica, hiperqueratosis y paraqueratosis, y se infiltran células mononucleares, células de Langerhans y mastocitos en la dermis. Puede haber también áreas focales de fibrosis, incluyendo implicación del perineuro de nervios pequeños.

La *gastroenteropatía alérgica*, también conocida como gastroenteropatía eosinófila, es una manifestación atópica inusual en la que se asocian múltiples sensibilidades alimentarias de IgE con una reacción mucosa del tracto gastrointestinal local. Es poco común en adultos, pero más habitual, aunque transitoria, en niños. La afección aparece cuando alérgenos alimentarios ingeridos reaccionan con anticuerpos IgE locales en la mucosa del yeyuno que libera mediadores de mastocitos, dando como resultado síntomas gastrointestinales poco después de la comida. La exposición continuada produce inflamación crónica, que da como resultado pérdida de proteínas gastrointestinales y edema hipoproteínémico. La pérdida de sangre a través de la mucosa intestinal inflamada puede ser suficientemente significativa para provocar anemia por deficiencia de hierro. La reacción alérgica se produce localmente en la mucosa gastrointestinal superior después de la exposición al alérgeno, pero se resuelve con evitación del alérgeno.

La *anafilaxis* y *urticaria* están claramente mediadas por IgE, pero carecen de determinantes genéticos, y no tienen predilección por individuos atópicos. La anafilaxis es una reacción alérgica generalizada, aguda, con implicación simultánea de varios sistemas de órganos, habitualmente cardiovascular, respiratorio, cutáneo y gastrointestinal. La reacción está mediada inmunológicamente y se produce tras la exposición a un alérgeno al que el sujeto se ha sensibilizado previamente. La urticaria y el angioedema se refieren al hinchamiento físico, eritema y prurito resultantes de receptor estimulado por histamina en vasos sanguíneos cutáneos superficiales, y es la característica cutánea distintiva de la anafilaxis sistémica. La anafilaxis sistémica es la aparición de una reacción mediada por IgE simultáneamente en múltiples órganos resultante de fármaco, veneno de insectos o alimento. Se provoca repentinamente por IgE cargado en mastocitos, inducido por alérgenos, dando como resultado una alteración profunda y con peligro para la vida en el funcionamiento de diversos órganos vitales. Se producen colapso vascular, obstrucción de las vías respiratorias aguda, vasodilatación cutánea y edema, y espasmo muscular gastrointestinal y genitourinario casi simultáneamente, aunque no siempre en el mismo grado.

La patología de la anafilaxis incluye angioedema y pulmones hiperinflados, con tapones mucosos en las vías respiratorias y atelectasia focal. A nivel celular, los pulmones tienen una apariencia similar a la que tienen durante un ataque de asma agudo, con hipersecreción de glándulas submucosas bronquiales, edema mucoso y submucoso, congestión vascular peribronquial y eosinofilia en las paredes bronquiales. Puede estar presente edema pulmonar y hemorragia. También pueden estar presentes espasmo muscular bronquial, hiperinflación e incluso rotura de alvéolos. Las características importantes de la anafilaxis humana incluyen edema, congestión vascular y eosinofilia en la lámina propia de la laringe, tráquea, epiglotis e hipofaringe.

La exposición al alérgeno puede ser mediante ingestión, inyección, inhalación o contacto con la piel o membrana mucosa. La reacción comienza en un periodo de segundos o minutos después de la exposición al alérgeno. Puede haber un susto inicial o sensación de fatalidad inminente, seguido rápidamente de síntomas en uno o más sistemas de órganos diana: cardiovascular, respiratorio, cutáneo o gastrointestinal.

Los alérgenos responsables de la anafilaxis difieren de los habitualmente asociados con la atopia. Los alimentos, fármacos, venenos de insectos o látex son las fuentes habituales. Los alérgenos alimentarios incluyen los hallados en crustáceos, moluscos (por ejemplo, langosta, camarón, cangrejo), pescados, legumbres (por ejemplo, cacahuètes, guisantes, judías, regaliz), semillas (por ejemplo sésamo, semilla de algodón, alcarabea, mostaza, semilla de lino, girasol), nueces, bayas, clara de huevo, alforfón y leche. Los alérgenos farmacológicos incluyen los hallados en proteínas y polipéptidos heterólogos, polisacáridos y fármacos hapténicos. Los alérgenos de insecto incluyen insectos Himenópteros, incluyendo la abeja melífera, vespula, avispon, avispa y hormiga roja.

Aunque la epinefrina es el tratamiento típico para la anafilaxis, se prescriben normalmente antihistamínicos u otros bloqueadores de histamina para urticaria menos grave o reacción angioedémica.

E. Terapias de combinación

El método de la invención puede combinarse con métodos conocidos de tratamiento para trastorno mediado por IgE, bien como etapas de tratamiento combinadas o adicionales o bien como componentes adicionales de una formulación terapéutica.

Por ejemplo, pueden administrarse antihistamínicos, especialmente antihistamínicos no sedantes, antes, previamente a, o simultáneamente con los anticuerpos anti IgE de la invención. Los antihistamínicos adecuados incluyen los de la alquilamina (por ejemplo, clorfeniramina), etanolamina (por ejemplo, difenhidramina) y fenotiazina (por ejemplo, prometazina). Aunque muchos antihistamínicos antagonizan los efectos farmacológicos de la histamina bloqueando sus sitios receptores en las células efectoras, otros fármacos antihistamínicos habituales actúan bloqueando la liberación de mastocitos que se han sensibilizado y armado con IgE específico de alérgeno (por ejemplo, cromolina sódica). Los antihistamínicos ejemplares incluyen astemizol, maleato de azatadina, maleato de brofeniramina, maleato de carbinoxamina, clorhidrato de cetirizina, fumarato de clemastina, clorhidrato de ciproheptadina, maleato de dexbromfeniramina, maleato de dexclorfenilamina, dimenhidrinato, clorhidrato de difenhidramina, succinato de doxilamina, clorhidrato de fexofenadina, clorhidrato de terfenadina, clorhidrato de hidroxizina, loratidina, clorhidrato de meclizina, citrato de tripelaminina, clorhidrato de tripelaminina, clorhidrato de triplidina.

Los síntomas particulares de trastornos mediados por IgE (por ejemplo regiones en fase temprana) pueden aliviarse con simpatomiméticos o fármacos que tengan efecto broncodilatador. La epinefrina es un alfa y beta adrenérgico de acción amplia que se administra con frecuencia por vía subcutánea en una dosis de 0,2 a 0,5 ml de solución acuosa 1:100. También se usa una forma de acción más larga de epinefrina (es decir, terbutalina) en suspensión 1:200 cuando se desea un efecto de duración más larga. Los beta adrenérgicos adicionales adecuados incluyen albuterol, pirbuterol, metaproterenol, salmeterol, isoetarina y formeterol para administración por vía nasal (por ejemplo, nebulizador portátil, dispositivo de respiración de presión positiva intermitente o inhaladores presurizados de dosis medida) o por vía oral.

También puede conseguirse broncodilatación mediante la administración de xantinas, especialmente cuando se administran en combinación con los fármacos simpatomiméticos anteriores. Las xantinas ejemplares incluyen aminofilina (iv 250-500 mg) y teofilina (oral, concentración en suero 10-20 µg/ml).

Otros síntomas para diversos trastornos mediados por IgE (por ejemplo, reacciones de fase tardía) pueden atenuarse por tratamiento con glucocorticoides u otros fármacos que tienen efectos antiinflamatorios. Se administra prednisona (30-60 mg diarios) por vía sistémica para varios ataques, mientras que se administran dipropionato de beclometasona, triamcinolona acetónida y flunisolida en forma aerosolizada como terapia de mantenimiento a largo plazo. Los corticosteroides adicionales que tienen efectos antiinflamatorios incluyen: betametasona, budesonida, dexametasona, acetato de fludrocortisona, flunisolida, propionato de fluticasona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisolona, prednisona, triamcinolona.

Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos que pueden usarse también en combinación con los métodos terapéuticos de la invención incluyen acetaminófono, aspirina, bromfenac sódico, diclofenaco sódico, diflunisal, etodolac, fenoprofeno cálcico, flurbiprofeno, ibuprofeno, indometacina, quetoprofeno, meclofenamato sódico, ácido mefenámico, nabumetona, naproxeno, naproxeno sódico, oxifenbutazona, fenilbutazona, piroxicam, sulindac, tolmetina sódica.

Adicionalmente, el beneficio terapéutico máximo puede conseguirse también con la administración de descongestionantes (por ejemplo, fenilefrina, fenilpropanolamina, pseudoefadrina), supresores de tos (por ejemplo, dextrometorfano, codeína o hidrocodona) o analgésicos (por ejemplo, acetaminófono, aspirina).

La desensibilización de alérgenos es una forma de tratamiento en la que se inyectan alérgenos al paciente para el fin de reducir o eliminar la respuesta alérgica. También se conoce como inmunoterapia de alérgenos, hiposensibilización o terapia de inyección de alergia. Se usa con frecuencia en combinación con otros tratamientos de alergia, pero no frecuentemente como un tratamiento primario. Se ha empleado exitosamente cuando es imposible la evitación del alérgeno. Un tratamiento de desensibilización de alérgeno típico incorpora inyección subcutánea de alérgeno estéril en dosis crecientes una vez o dos veces a la semana hasta que se consigue una dosis que produce un área local pequeña transitoria de inflamación en el sitio de inyección. Después se proporciona la dosis en un programa de mantenimiento una vez cada 2-4 semanas. Se usa con más frecuencia la desensibilización alérgica en el tratamiento de asma alérgica y rinitis alérgica, aunque ha tenido éxito en el tratamiento de anafilaxis. También se ha usado eficazmente la desensibilización mediante el uso de adyuvantes, tales como adyuvante incompleto de Freund, que es una emulsión de antígeno acuoso en aceite mineral. El efecto fisiológico crea un depósito líquido insoluble del que se liberan gradualmente gotas de alérgeno. Otra forma de desensibilización de alérgenos es polimerizar alérgenos monoméricos con glutaraldehído para crear una molécula con alergenicidad relativamente baja (es decir, provoca respuesta alérgica), manteniendo a la vez un grado eficaz de inmunogenicidad.

F. Dosificaciones farmacéuticas:

Las dosificaciones y la concentración de fármaco deseada de composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variar dependiendo del uso particular previsto. La determinación de la dosificación o vía de administración apropiada está dentro de la experiencia de un experto habitual. Los experimentos animales proporcionan directrices fiables para la determinación de dosis eficaces para terapia humana. El cambio de escala entre especies de dosis eficaces puede realizarse siguiendo los principios expuestos por Mordenti, J. y Chappell, W. "The Use of Interspecies Scaling in Toxicokinetics," En *Toxicokinetics and New Drug Development*, Yacobi *et al.*, Eds, Pergamon Press, Nueva York 1989, pp.42-46.

Cuando se usa administración *in vivo* de los polipéptidos o anticuerpos descritos en el presente documento, las cantidades de dosificación normales pueden variar de aproximadamente 10 ng/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal de mamífero o más por día, preferentemente de aproximadamente 1 mg/kg/día a 10 mg/kg/día, dependiendo de la vía de administración. Se proporcionan directrices con respecto a las dosificaciones y métodos de suministro particulares en la bibliografía, véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos N° 4.657.760; 5.206.344; o 5.225.212. Está dentro del alcance de la invención que diferentes formulaciones sean eficaces para diferentes tratamientos y diferentes trastornos, y que la administración que se pretende que trate un órgano o tejido específico puede necesitar suministro de una manera diferente al de otro órgano o tejido. Además, pueden administrarse dosificaciones en una o más administraciones separadas, o por infusión continua. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento se mantiene hasta que se produce una supresión deseada de síntomas de enfermedad. Sin embargo, pueden ser útiles otros regímenes de dosificación. El progreso de esta terapia se controla fácilmente por técnicas y ensayos convencionales.

G. Administración de la formulación

Las formulaciones de la presente invención, incluyendo pero sin limitación formulaciones reconstituidas, se administran a un mamífero que necesite tratamiento con la proteína, preferentemente un ser humano, de acuerdo con métodos conocidos, tales como administración intravenosa como una embolada o por infusión continua durante un periodo de tiempo, por vías intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasnovial, intratecal, oral, tópica o de inhalación.

En realizaciones preferidas, las formulaciones se administran al mamífero por administración subcutánea (es decir debajo de la piel). Para dichos fines, la formulación puede inyectarse usando una jeringa. Sin embargo, están disponibles otros dispositivos para administración de la formulación tales como dispositivos de inyección (por ejemplo los dispositivos INJECTEASE™ y GENJECT™); bolígrafos inyectoros (tales como el GENPEN™); dispositivos autoinyectores, dispositivos sin aguja (por ejemplo, MEDIJECTOR™ y BIOJECTOR™); y sistemas de suministro de parche subcutáneo.

En una realización específica, la presente invención se refiere a kits para una unidad de administración de una única dosis. Dichos kits comprenden un recipiente de una formulación acuosa de proteína o anticuerpo terapéutico, que incluye jeringas precargadas de cámaras individuales o múltiples. Están disponibles jeringas precargadas ejemplares de Vetter GmbH, Ravensburg, Alemania.

La dosificación apropiada ("cantidad terapéuticamente eficaz") de la proteína dependerá, por ejemplo, de la afección para tratar, la gravedad y evolución de la afección, si la proteína se administra para fines preventivos o terapéuticos, terapia previa, el historial clínico del paciente y la respuesta a la proteína, el tipo de proteína usado y el criterio del médico a cargo. La proteína se administra de forma adecuada al paciente en una vez o durante una serie de tratamientos y puede administrarse al paciente en cualquier momento desde el diagnóstico en adelante. La proteína puede administrarse como el único tratamiento o junto con otros fármacos o terapias útiles para tratar la afección en

cuestión.

Cuando la proteína elegida sea un anticuerpo, de aproximadamente 0.1 a 20 mg/kg es una dosificación candidata inicial para administración al paciente, bien, por ejemplo, por una o más administraciones separadas. Sin embargo, pueden ser útiles otros regímenes de dosificación. El progreso de esta terapia se controla fácilmente por técnicas convencionales.

Los usos para una formulación anti IgE (por ejemplo, rhuMAbE-25, rhMAbE-26, Hu-901) incluyen el tratamiento o profilaxis de enfermedades alérgicas mediadas por IgE, infecciones parasitarias, cistitis intersticial y asma, por ejemplo. Dependiendo de la enfermedad o trastorno para tratar, se administra una cantidad terapéuticamente eficaz (por ejemplo de aproximadamente 1 a 15 mg/kg) del anticuerpo anti IgE al paciente.

H. Artículos de fabricación

En otra realización de la invención, se proporciona un artículo de fabricación que contiene la formulación y preferentemente proporciona instrucciones para su uso. El artículo de fabricación comprende un recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales (por ejemplo viales de cámara doble), jeringas (tales como jeringas de cámara doble o individual) y tubos de ensayo. El recipiente puede formarse a partir de diversos materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene la formulación. La etiqueta, que está en, o asociada con, el recipiente puede indicar instrucciones para reconstitución y/o uso. La etiqueta puede indicar además que la formulación es útil o se pretende para administración subcutánea. El recipiente que contiene la formulación puede ser un vial multiusos, que permite administraciones repetidas (por ejemplo de 2 a 6 administraciones) de la formulación reconstituida. El artículo de fabricación puede comprender además un segundo recipiente que comprende un diluyente adecuado (por ejemplo BWF1). Tras la mezcla del diluyente y la formulación liofilizada, la concentración de proteína final en la formulación reconstituida generalmente será de al menos 50 mg/ml. El artículo de fabricación puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos con instrucciones para su uso.

La invención se entenderá más completamente por referencia a los siguientes ejemplos. No deberían, sin embargo, interpretarse como limitantes del alcance de la invención. Todas las citas a lo largo de la divulgación se incorporan expresamente por la presente por referencia.

En otra realización, la invención proporciona un artículo de fabricación que comprende las formulaciones descritas en el presente documento para administración en un dispositivo autoinyector. Puede describirse un autoinyector como un dispositivo de inyección que, tras la activación, suministrará sus contenidos sin acción necesaria adicional del paciente o administrador. Son particularmente adecuados para automedicación de formulaciones terapéuticas cuando la velocidad de suministro debe ser constante y el momento de suministro es mayor que algunos momentos.

EJEMPLO 1

Aislamiento de IgE de primate

Se clonó IgE humano de la línea celular de mieloma de IgE humano U266 (ATCC, Manassas, VA, TIB N° 196). Se determinaron secuencias de IgE de Rhesus y cyno clonando y secuenciando el IgE de ADNc derivado de células mononucleares de sangre periférica de rhesus y cyno que se habían estimulado para generar células con cambio de IgE (PBMC). Se han diseñado cebadores directos e inversos (mostrados posteriormente) a partir de las secuencias de IgE humanas. Se diseñó un cebador directo justo cadena arriba del dominio CH2. El cebador inverso se diseñó en el extremo del dominio transmembrana. Se obtuvieron PBMC de Rhesus y Cyno del Centro de Investigación de Primates Nacional de California (Davis, CA). Se cultivaron 5×10^6 PBMC con IL-4 (100 ng/ml) y CD40L (3 µg/ml) (R&D Systems, Minneapolis, MN, N° 204-IL y N° 617-CL respectivamente) durante 4 días. Después se recogieron las células, se preparó el ARN (Mini Kit RNeasy, N° 74106, Qiagen, Valencia, CA) y se realizó ADNc usando el kit de cebadores de oligo dT BD Sprint Powerscript (BD Biosciences, San Jose, CA, N° 639558). Después se realizó RT-PCR [94 °C 2 minutos; 94 °C 15 segundos; 60 °C 30 segundos; 68 °C 2 minutos; 30 ciclos; 68 °C 10 minutos]. Se añadió Taq polimerasa (10 minutos 72 °C) después de los ciclos indicados para añadir salientes A para clonación de TA (Invitrogen, Carlsbad, CA, N° 45-0641). Se clonaron productos de PCR por clonación de TOPO-TA y después se verificó la secuencia de los clones (Genentech, Inc.). Se alinearon las secuencias humana, de Rhesus y de Cyno usando programas de análisis internos (Genentech, Inc.). Las siguientes homologías son para secuencias entre los dominios CH2 y transmembrana. Entre Rhesus (432 aminoácidos) y Cyno (431 aminoácidos) hubo 6 diferencias lo que es aproximadamente 98,6 % de homología. Entre humano y Rhesus hubo 53 diferencias lo que equivale a 87,7 % de homología. Entre humano y Cyno hubo 56 diferencias lo que equivale a 87 % de homología (Véase Figura 1).

Cebadores usados para clonación:

Cebadores directos cadena arriba de la secuencia de CH2:

5'-ccgcccaccgtgaagatcttacagtc (SEC ID N°: 63)

Cebador inverso al final del dominio transmembrana:

5'-cggctcgagactaggcgtgggctggaggacgttg (SEC ID N°: 64)

EJEMPLO 2

Aislamiento de Ab anti IgE/M1'

Generación de la proteína de fusión CH3-CH4-M1'/Fc

La proteína de fusión IgE humana CH3-CH4-M1'/Fc se generó por amplificación por PCR de los dominios de IgE humano CH3-CH4-M1', más 15 aminoácidos adicionales inmediatamente cadena abajo del dominio M1' de ADNc preparados a partir de células U266 (ATTC Manassas, VA, TIB N° 196). Se preparó ARN a partir de células U266 (Mini Kit RNeasy, N° 74106, Qiagen, Valencia, CA) y se preparó ADNc usando cebadores oligo dT BD Sprint Powerscript (BD Biosciences, San Jose, CA, N° 639558). Se realizó RT-PCR, y el producto de PCR se clonó por clonación de TOPO-TA (Invitrogen, Carlsbad, CA, N° 45-0641). Se añadió una secuencia señal N terminal por mutagénesis por PCR para expresión en células de mamífero, y la secuencia señal +CH3+CH4+M1'+15 aminoácidos se clonó en un vector de expresión (pRK hulG1 Fc; Genentech) para generar una fusión C terminal con la región Fc IgG1 humana. La secuencia de la proteína final, incluyendo secuencia señal y Fc IgG1 humana es la siguiente:

MGWSCILFLVATATGVHSTKKCADSNPRGVSA YLSRPSPFDLFIRKSPTITCLVVD
LAPSKGTVNLTWSRASGKPVNHSTRKEEKQRNGTLTVTSTLPVGT RDWIEGETY
QCRVTHPHLPRALMRSTTKTSGPRAAPEVYAFATPEWPGSRDKRTLACLIQNFMF
EDISVQWLHNEVQLPDARHSTTQPRKTKGSGFFVFSRLEVTRA EWEQKDEFICRA
VHEAASPSQTVQRAVSVNPGLAGGSAQSQRAPDRVLCHSGQQQGLPRAAGGSPV
HPRCHCGAGRADWPGPPELDVCVEEAEGEAPWRAQVTDKAAHYTLCPPCPAPE
LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP
VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
(SEC ID N°: 65)

La proteína se produjo por transfección transitoria de células CHO (Genentech), y se purificó la proteína a partir del sobrenadante de cultivo celular usando técnicas de cromatografía en columna de sepharose de Proteína A convencionales.

Inmunización y creación de hibridomas

Se generó un panel de anticuerpos pan específicos que se unían selectivamente con la parte M1' de IgE-M1' humano usando la proteína CH3-CH4-M1'/Fc. Se inyectó en cada almohadilla plantar trasera de un ratón BALB/c 1 µg de CH3-CH4-M1'/Fc resuspendido en adyuvante de monofosforil lípido A y trehalosa dicorinomicolato (MPL™ + TDM) (Corixa, Hamilton, MT) a intervalos de 3 a 4 días. Se tomó suero después de 8 refuerzos y se valoró por ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y separación de células activadas por fluorescencia y citometría de flujo (exploración de FACS, véase siguiente sección) para asegurar que el ratón tenía una buena respuesta inmunitaria a CH3-CH4-M1'/Fc. Tres días después del refuerzo final, se fusionaron células del ganglio poplíteo con la línea celular de mieloma de ratón P3X63Ag.U.1 (véase, por ejemplo, Chuntharapai *et al.*, 1997, Methods Enzymol. 288: 15-27). Se seleccionaron células de hibridoma fusionadas de células de ganglio poplíteo no fusionadas o de mieloma usando selección de hipoxantina-aminopterina-timidina (HAT) en Medio D del kit de selección de hibridoma ClonaCell® (StemCell Technologies, Inc., Vancouver, BC, Canadá), dando como resultado la generación de 4224 clones.

Exploración con respecto a anticuerpos anti M1' humano pan específicos

Se exploraron clones de hibridoma generados como se ha descrito previamente con respecto a producción de anticuerpos monoclonales que se unían con la región M1' de la proteína CH3-CH4-M1'/Fc, la región M1' de IgE-M1' humano expresada de forma estable en la superficie de la línea celular de linfoma de linfocitos B de ratón A20 (IgE-M1'/A20), y la región M1' de IgE-M1' humano expresada de forma estable en la superficie de la línea celular de linfoma de linfocitos B humano BJAB (IgE-M1'/BJAB). Los controles negativos incluyeron CD-4/Fc humano, IgE humano expresado de forma estable en la superficie de la línea celular de linfoma de linfocitos B de ratón A20

(IgE/A20), línea celular de linfoma de linfocitos B de ratón A20 (A20), IgE humano expresado de forma estable en la superficie de la línea celular de linfoma de linfocitos B humano BJAB (IgE/BJAB) y línea celular de linfoma de linfocitos B humano BJAB (BJAB).

5 Exploración de ELISA

Para explorar los 4224 clones, se realizó un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) en general como se ha descrito en Baker *et al.*, 2002, Trends Biotechnol., 20: 149-156. Los ensayos se realizaron en placas tanto de 384 como de 96 pocillos. Brevemente, se recubrió una placa de 384 (o una de 96) pocillos con 50 µl de Fc anti IgG humano de cabra (MP Biomedicals, Irvine, CA) a una concentración de 2 µg/ml en tampón de recubrimiento (tampón de carbonato 0,05 M, pH 9,6), se selló y se almacenó durante una noche a 4 °C. Después de retirar la solución de recubrimiento, se añadieron 80 µl (o 200 µl para una placa de 96 pocillos) de solución de ensayo/bloqueo que contenía albúmina de suero bovino al 0,5 % y Tween®-20 0,05 % en PBS (pH 7,4) (diluyente de ELISA) a cada pocillo, y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante una hora con agitación. Los pocillos se lavaron después tres veces con 100 µl (o 300 µl para una placa de 96 pocillos) de Tween®-20 0,05 % en PBS (tampón de lavado).

Después de la etapa de lavado, se añadieron 50 µl (o 100 µl para una placa de 96 pocillos) de solución de antígeno que contenía 0,4 µg/ml de CH3-CH4-M1'/Fc o CD-4/Fc humano en diluyente de ELISA a cada pocillo, y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante una hora con agitación. Los pocillos se lavaron tres veces con tampón de lavado como antes. Se añadió sobrenadante de clones de hibridoma individuales de modo que un pocillo con CH3-CH4-M1'/Fc y un pocillo con CD-4/Fc humano recibieran cada uno 50 µl (o 100 µl para una placa de 96 pocillos) del sobrenadante a partir de un único clon de hibridoma. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante una hora con agitación, y los pocillos se lavaron tres veces con tampón de lavado como antes.

Después de lavar, se añadieron 50 µl (o 100 µl para una placa de 96 pocillos) de una dilución 1:1000 de IgG anti ratón de oveja acoplado con peroxidasa de rábano rusticano (sin reactividad cruzada con IgG humano (MP Biomedicals)) en diluyente de ELISA a cada pocillo. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante una hora con agitación, se lavaron tres veces con tampón de lavado como antes y se secaron por absorción. Los pocillos se desarrollaron añadiendo 50 µl (o 100 µl para una placa de 96 pocillos) de sustrato de peroxidasa de micropocillos de tetrametilbencidina (TMB) (BioFX Laboratories, Owing Mills, MD, catálogo N° TMBW-0100-01) a cada pocillo y se incubaron a temperatura ambiente durante 5-10 minutos o hasta que se observó un buen cambio de color. El desarrollo se detuvo añadiendo 50 µl (o 100 µl para una placa de 96 pocillos) a Solución de Parada TMB (BioFX Laboratories catálogo N° BSTP-0100-01) a cada pocillo. Las placas se analizaron con un lector de placas Sunrise (Tecan US, Inc., Research Triangle Park, NC) a 650 nm.

Se usaron el presangrado y polisiero como controles. Las muestra presangrado contenían suero de ratón antes de la inmunización, y las muestras de polisiero contenía antisueros de ratón obtenidos después de 10 inmunizaciones.

40 Exploración de FACS

Para explorar 3221 clones generados en el Ejemplo 1, se realizó separación de células activadas por fluorescencia (FACS) usando líneas celulares IgE-M1'/A20 e IgE-M1'/BJAB. Las líneas celulares IgE/A20, IgE/BJAB, A20 y BJAB actuaron como controles negativos. Las células se resuspendieron y se centrifugaron a 500 g durante 5 minutos a 4 °C. Los medios se aspiraron y las células se resuspendieron en tampón FACSFlow a 4 °C (BD Biosciences, San Jose, CA) con suero bovino fetal al 1 % (tampón de tinción celular). Las células se centrifugaron como antes, se aspiró el medio y las células se resuspendieron a 2×10^6 células/ml de tampón de tinción celular a 4 °C. Las células se añadieron a placas de fondo redondo de 96 pocillos a 50 µl/pocillo (1×10^5 células/pocillo) y se añadieron 100 µl de sobrenadante de clones de hibridoma individuales a cada pocillo de modo que se incubó cada sobrenadante de hibridoma con un pocillo que contenía cada línea celular. La placa se incubó en hielo durante 30 minutos. La placa se centrifugó a 500 g durante 5 minutos a 4 °C y se aspiraron los sobrenadantes. Cada pocillo se resuspendió en 200 µl de tampón de tinción celular a 4 °C, y las placas se centrifugaron como antes. Se aspiró el tampón de tinción celular.

Después de la etapa de lavado, se resuspendieron las células en cada pocillo en 100 µl de una dilución 1:1000 de Fc de cabra anti IgG de ratón acoplado con R-ficoeritrina (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) en tampón de tinción celular a 4 °C, y las placas se incubaron en oscuridad en hielo durante 30 minutos. La placa se centrifugó a 500 g durante 5 minutos a 4 °C y se aspiraron los sobrenadantes. Cada pocillo se resuspendió en 200 µl de tampón de tinción celular a 4 °C, y las placas se centrifugaron como antes. Se aspiró el tampón de tinción celular. Las células en cada pocillo se resuspendieron en 200 µl de tampón de tinción celular a 4 °C y se transfirieron a tubos de microtitulación de 1,2 ml (Quality Scientific Plastics, Petaluma, CA). Se realizó FACS en un FACScan o FACSCalibur (BD Biosciences).

Secuenciación N terminal/aislamiento de ARN/secuenciación y clonación

- Los anticuerpos se purificaron a partir del sobrenadante de hibridomas anti IgE/M1' y se analizaron con respecto a secuenciación N terminal para determinación de la clonalidad en solución salina tamponada con fosfato. Cada anticuerpo se separó en un SDS-PAGE Tris HCl 4-20 % Premoldeado (Invitrogen, Carlsbad, CA) en condiciones reductoras. La cadena pesada (HC) y la cadena ligera (LC) resueltas se sometieron cada una a una secuenciación N terminal usando un secuenciador N terminal Procise 494 (Applied Biosystems, Foster City, CA) usando el ciclo de 20 minutos que se ha descrito en Henzel *et al.* Analytical Biochemistry 267, 148-160 (1999). Los primeros 25 restos se secuenciaron para establecer la monoclonalidad. Cuando la cadena HC o LC del Ab se bloqueó con un grupo piroglutamilo que hacía al aminoácido N terminal inaccesible a la secuenciación de Edman, se realizó retirada del grupo de bloqueo antes de la secuenciación. El grupo de piroglutamilo se retiró con la enzima piroglutamato aminopeptidasa (PGAP, Sigma, St Louis, MO) usando el protocolo descrito en Pham *et al.* Electrophoresis 2005, 26 4243-4251.
- Se determinó que la secuencia de los anticuerpos M1' de cadena pesada (HC) y cadena ligera (LC) 7A6, 1C11, 47H4, 26A11, 45C1 y 28E9 era la siguiente:

7A6		
HC	QVQLQQSGAELVRPGASVTLCKAS	(SEC ID N°: 66)
LC	DIVMSQSPSSLTVSVGEKVTLSCKS	(SEC ID N°: 67)
1C11		
HC	QVQLQQSGAELVRPGASVTLCKAS	(SEC ID N°: 68)
LC	DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSCKS	(SEC ID N°: 69)
47H4		
HC	EVKLVESGGGLVQPGGSRKLSAAS	(SEC ID N°: 70)
LC	DVVLTTQTPSLPVSIGDQASI	(SEC ID N°: 71)
26A11		
HC	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKAS	(SEC ID N°: 72)
LC	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTITCRS	(SEC ID N°: 73)
45C1		
HC	QIQLVQSGPELKKPGETVK	(SEC ID N°: 74)
LC	DVVMQTQPLTSLVTIGQPASISCK	(SEC ID N°: 75)
28E9		
HC	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCATS	(SEC ID N°: 76)
LC	DIQMTQSPASLSVSVGETVTFTCR	(SEC ID N°: 77)

- Para determinar las secuencias de longitud completa, se diseñaron cebadores degradados 5' a partir de las secuencias de aminoácidos N terminales y segmentos génicos de Ig conocidos, y se realizó PCR con secuencias conservadas de cadena pesada y ligera cadena abajo degradadas.

Cebadores Directos

7A6		
HC	DIR.BsiWI	5'-tcgacgtacgctcaggttcagctgcagcaatctgggctgagctgg (SEC ID N°: 78)
LC	DIR.EcoRV	5'-gatcgatatcgtgatgtcccagctctccctcctccctaac (SEC ID N°: 79)
1C11		
HC	DIR.BsiWI	5'-tcgacgtacgctcaggttcaattgcagcagctctgggctgagctgg (SEC ID N°: 80)
LC	DIR.EcoRV	5'-gatcgatatcgtaatgtctcagctctcctcctccctagc (SEC ID N°: 81)
47H4		
HC	9.1HCF.BsiWI	5'-tcgacgtacgctgaggtgaagttggtggagctctggggaggcttag (SEC ID N°: 82)
LC	47H4LCF.EcoRV	5'-gatcgatatcgtgctgactcagactccactctccctgcc (SEC ID N°: 83)

26A11

 HC G7F7HCF.BsiWI 5'-tcgacgtacgctgaggtccagctccagcagctctggacctgagc (SEC ID N°: 84)

LC 2B4LCF.EcoRV 5'-gatcgatatccagatgacccaaactacatcctcctg (SEC ID N°: 85)

45C1

 HC 2G6HCF.BsiWI 5'-tcgacgtacgctcagatccagttggtgagctctggacctgagctg (SEC ID N°: 86)

LC 9C10LCF.EcoRV 5'-gatcgatatcgtgatgacgcagactccactcactttgtcgg (SEC ID N°: 87)

28E9

 HC 9.1HCFBsiWI 5'-tcgacgtacgctgaggtgaagctggtgagctgaaggaggcttg (SEC ID N°: 88)

LC 5E10.LCF.EcoRV 5'-gatcgatatccagatgcccagctccagcctcctatc (SEC ID N°: 89)

Cebadores Inversos

Cebador de Cadena Pesada (HCR) 5'-ctggacagggatccagagttccaggtcactgtcactggctcaggg (SEC ID N°: 90)

Cebador de Cadena Ligera (LCR) 5'-ctgtaggtgctgtctttgctgctgatcagtcactg (SEC ID N°: 91)

Se recogió ARN de hibridomas anti IgE/M1' (Mini Kit RNeasy, N° 74106, Qiagen, Valencia, CA) y se preparó ADNc usando el kit de cebadores de oligo dT BD Sprint Powerscript (BD Biosciences, San Jose, CA, N° 639558). Se realizó PCR usando los cebadores anteriores y se clonaron productos de PCR usando el kit TOPO-TA (Invitrogen, Carlsbad, CA, N° 45-0641). Se realizó PCR usando Polimerasa de Alta Fidelidad Pfx Platinum (Invitrogen, Carlsbad, CA, N° 11708-039) con condiciones de PCR [94 °C 2 minutos; 94 °C 15 segundos; 60 °C 30 segundos; 68 °C 2 minutos; 30 ciclos; 68 °C 10 minutos]. Los clones se exploraron con respecto a insertos y se secuenciaron múltiples clones (Genentech, Inc.) para verificar la secuencia génica de cadena pesada y cadena ligera de anti IgE /M1' original.

Se subclonaron dominios variables de anticuerpo anti M1' en vectores de expresión con diferentes regiones Fc para generar anticuerpos quiméricos con Fc de diferentes especies y/o isotipos. Los cebadores se diseñaron para clonar el dominio variable (CDR + marco conservado) en regiones Fc IgG2a de ratón, IgG2a-DANA de ratón e IgG1 humana.

Los cebadores se diseñaron para incorporar sitios de restricción con secuencia de cadena pesada y ligera. Las cadenas pesadas se clonaron usando BsiWI y Apal. Las cadenas ligeras se clonaron usando EcoRV y KpnI. Se digirieron después nuevos productos de PCR y se ligaron en mlgG2a (LPG10), mlgG2a-DANA (pErk-E27DANA) o hulG1 para cadena pesada, o vectores de expresión mKappa (LPG2) o huKappa (Genentech, Inc.). Se verificó la secuencia de los clones finales (Genentech, Inc.).

Las combinaciones de cebadores 3' y cebadores directo e inverso para clonación de secuencias de CDR Variables son las siguientes:

Cebadores Inversos

7A6

 HC INV.Apal 5'-accgatgggccccttggtggaggctgaagagactgtgag (SEC ID N°: 92)

LC INV.KpnI 5'-ccttggtaccccctccgaacgtgtacggatagctataatattg (SEC ID N°: 93)

1C11

 HC INV.Apal 5'-gaccgatgggccccttggtggaggctgaggagactgtg (SEC ID N°: 94)

LC INV.KpnI 5'-ccttggtaccccctccgaacgtgtacggatagctataa (SEC ID N°: 95)

47H4

 HC 47H4HCR.Apal 5'-tgggccccttggtggaggctgaggagacgggtgactgag (SEC ID N°: 96)

LC 47H4LCR.KpnI 5'-ttccaacttggtacctccacc (SEC ID N°: 97)

26A11

 HC 7G8HCR.Apal 5'- gaccgatgggccccttggtggargctgcagagacagtgaccagag (SEC ID N°: 98)

LC 47H4LCR.KpnI 5'-ttccaacttggtacctccacc (SEC ID N°: 99)

45C1

HC	45C1HCR.Apai	5'-cgatgggccccttggtggargckgaggagacggtgagaatg (SEC ID N°: 100)
LC	5C2LCR.Kpnl	5'-agcttggtaccccctccg (SEC ID N°: 101)
28E9		
HC	28E9.HC.REV.Apai	5'-cgatgggccccttggtggaggctgaggagacggcgactgag (SEC ID N°: 102)
LC	1D5.2LCR,Kpnl	5'-ttccaaacttggtaccgcgagccg (SEC ID N°: 103)

Combinaciones de Cebadores:

	Directo	Inverso
<u>7A6:</u>	HC 7A6.DIR.BsiWI	--- 7A6.INV.Apai
	LC 7A6.DIR.EcoRV	--- 7A6.INV.Kpnl
<u>1C11:</u>	HC 1C11.DIR.BsiWI	--- 1C11.INV.Apai
	LC 1C11.DIR.EcoRV	--- 1C11.INV.Kpnl
<u>47H4:</u>	HC 9.1.HCF.BsiWI	--- 7H4HCR.Apai
	LC* 47H4.LCF.EcoRV	--- 47H4.LCR.Kpnl
<u>26A11</u>	HC C7F7.HCF.BsiWI	--- 7G8.HCR.Apai
	LC 2B4.LCF.EcoRV	--- 47H4.LCR.Kpnl
<u>45C1</u>	HC 2G6.HCF.BsiWI	--- 45C1.HCR.Apai
	LC 9C10.LCF.EcoRV	--- 5C2.LCR.Kpnl
<u>28E9</u>	HC 9.1.HCF.BsiWI	--- 28E9.HCR.Apai
	LC 5E10.LCF.EcoRV	--- 1D52.LCR.Kpnl

La cadena ligera de 47H4 tenía un sitio Kpnl interno que evitaba la clonación directa en los vectores de expresión mKappa y huKappa. El sitio Kpnl interno se mutó usando el Kit de Mutagénesis Dirigida Quick Change XL (Stratagene, Cedar Creek, Texas, N° 200517-5) [95 °C 1 minuto; 95 °C 50 segundos; 60 °C 50 segundos; 68 °C 4,5 minutos; 68 °C 7 minutos]. Los cebadores se diseñaron de acuerdo con requisitos del kit para mutar un único nucleótido dentro del sitio Kpnl que no cambió la secuencia de aminoácidos. TAC se mutó a TAT que conservaba la tirosina (Y) en esa posición. Se verificó la secuencia de los clones finales (Genentech, Inc.).

Los cebadores usados para mutagénesis fueron:

DIR 5'-cc tat tta cat tgg tat ctg cag aag cca ggc c (SEC ID N°: 104)
INV 5'-ggc ctg gct tct gca gat acc aat gta aat agg (SEC ID N°: 105)

EJEMPLO 2A

Humanización de anticuerpos anti IgE/M1'

Este ejemplo describe la humanización de los anticuerpos anti IgE/M1' murinos 26A11, 7A6 y 47H4.

Materiales y métodos

El dominio M1' de IgE humano asociado a membrana se expresó como una fusión de Fc en células CHO y se purificó por medios convencionales. Se obtuvieron hibridomas que expresaban los anticuerpos 26A11, 7A6 y 47H4 inmunizando ratones con la proteína de fusión M1'-Fc recombinante y se identificaron por ELISA usando placas recubiertas con M1'-Fc. Los anticuerpos funcionales se identificaron por su capacidad para unirse con células que expresaban M1' y promover la apoptosis.

Clonación de dominios variables de 26A11, 7A6 y 47H4 murino. Se extrajo ARN total de células de hibridoma que producían 26A11, 7A6 o 47H4 usando métodos convencionales. Los dominios variable ligero (VL) y variable pesado (VH) se amplificaron usando RT-PCR con cebadores degradados para las cadenas pesadas y ligeras. Los cebadores directos fueron específicos para la secuencia de aminoácidos N terminal de las regiones VL y VH. Respectivamente, los cebadores inversos LC y HC se diseñaron para hibridar con una región en el dominio constante ligero (CL) y constante pesado 1 (CH1), que estaban altamente conservados entre especies. La secuencia polinucleotídica de los insectos se determinó usando métodos de secuenciación rutinarios. Las secuencias de

aminoácidos VL y VH 26A11, 7A6 y 47H4 se muestran en las **Figuras 6A y 6D, 6B y 6E, y 6C y 6F**, respectivamente.

Injertos de región hipervariable directos en el marco conservado consenso humano aceptador. El fagémido usado para este trabajo es un vector de presentación de Fab-g3 monovalente y consiste en 2 fases abiertas de lectura bajo el control de un único promotor phoA. La primera fase abierta de lectura consiste en la secuencia señal stII fusionada con los dominios VL y CH1 de la cadena ligera aceptora y la segunda consiste en la secuencia señal stII fusionada con los dominios VH y CH1 de la cadena pesada aceptora seguido de la proteína de cubierta de fago menor P3.

Los dominios VL y VH de anticuerpos 26A11, 7A6 o 47H4 murinos (mu26A11, mu7A6 o mu47H4) se alinearon con las secuencias consenso de VL kappa I humano (huKI) y VH humano subgrupo III (huIII). Para realizar los injertos de CDR, se injertaron regiones hipervariables de mu26A11, mu7A6 o mu47H4 en los marcos conservados aceptores consenso de huKJ y huIII para generar el injerto de CDR directo (26A11.v1, 7A6.v1 o 47H4.v1) (**Figuras 6A-6F**). En el dominio VL las siguientes regiones se injertaron en el aceptor consenso humano: posiciones 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3). En el dominio VH, se injertaron las posiciones 26-35 (H1), 49-65 (H2) y 94-102 (H3). MacCallum *et al.* [MacCallum *et al.* J. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996)] han analizado las estructuras cristalinas de complejos de anticuerpo y antígeno y han descubierto que las posiciones 49 y 94 de la cadena pesada son parte de la región de contacto, por lo tanto parece razonable incluir estas posiciones en la definición de CDR-H2 y CDR-H3 cuando se humanizan anticuerpos.

Se generaron anticuerpos humanizados anti IgE/M1' 26A11.v1, 7A6.v1 y 47H4.v1 como anticuerpos IgG por mutagénesis de Kunkel de vectores de expresión de LC y HC usando oligonucleótidos separados para cada región hipervariable. También se realizaron cambios de aminoácidos para aumentar la estabilidad usando mutagénesis de Kunkel. Kunkel *et al.*, J. Biol. Chem. 263(29): 14784-14789 (1988). Se identificaron clones correctos por secuenciación de ADN.

Producción de IgG. Para fines de exploración, se produjeron inicialmente variantes de IgG en células 293. Se transfectaron vectores que codificaban VL y VH (25 µg) en células 293 usando el sistema FuGene. Se mezclaron 500 µl de FuGene con 4,5 ml de medio DMEM que no contenía FBS y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. Cada cadena (25 µg) se añadió a esta mezcla y se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos y después se transfirió a cinco matraces T-150 para transfección durante una noche a 37 °C en CO₂ 5 %. Al día siguiente los medios que contenían la mezcla de transfección se retiraron y se reemplazaron con 23 ml de medio PS04 con oligoelementos 0,1 ml/l (A0934) e insulina 10 mg/l (A0940). Las células se incubaron durante 5 días adicionales después de lo cual se recogieron los medios a 1000 rpm durante 5 minutos y se esterilizaron por filtración usando un filtro de unión a proteína baja de 0,22 µm. Las muestras podrían almacenarse a 4 °C después de la adición de 2,5 ml de PMSF 0,1 % por cada 125 ml de medio.

Determinaciones de afinidad. Se realizaron determinaciones de afinidad por análisis de Scatchard, un ELISA de unión celular y por resonancia de plasmón superficial usando un BIAcore™-2000 o A100.

Análisis de Scatchard. Se prepararon células de IgE/M1' Daudi humanas, de Rhesus y de Cyno para unión en tampón de unión frío compuesto de medio básico, con HEPES 10 mM pH 7,4 y FBS 2 % así como IgG humano 40 µg/ml. Las células se eluyeron a una concentración de $1,7 \times 10^6$ células/ml, y se mantuvieron en hielo hasta que se añadieron al ensayo. Las proteínas/anticuerpos se yodaron con el método de Iodogen. Se prepararon diversas concentraciones de proteína fría por triplicado, usando una dilución 1:2 comenzando con la concentración de saturación y terminando a una concentración de cero, con un total de 14 concentraciones. Se añadió proteína caliente de una única concentración a todas las diluciones para competir con la proteína fría. En último lugar se añadieron las células a la mezcla de proteína caliente y fría, se usaron 250.000 células por muestra. El ensayo se mantuvo a 4 °C durante 4 horas, en agitación. Cada muestra se recogió y se filtró después en membrana, se lavó al menos 3 veces con tampón de unión, se permitió que se secara y después se contó durante 1 minuto usando el Contador Gamma Auto Perkin Elmer Wizard 1470.

Ensayo de unión celular electroquimioluminiscente competitivo. Se midieron las afinidades de unión relativas de variantes humanizadas usando un ensayo de unión celular electroquimioluminiscente competitivo: se lavaron células BJAB transfectadas que expresaban IgE-M1' (BJAB-IgE/M1') (largo) o células transfectadas con control que no expresaban M1' (BJAB-IgE) (corto) con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se sembraron a 25.000 células/pocillo en 25 µl de PBS en placas de Alta Unión MULTI-ARRAY de 96 pocillos (Meso Scale Discovery). Las células se incubaron en las placas durante una hora a temperatura ambiente para permitir la unión de células a los pocillos. Para bloquear la unión no específica, se añadieron 25 µl de FBS 30 % en PBS a cada pocillo. Las placas se incubaron después a temperatura ambiente durante 30 minutos con agitación suave. La solución de bloqueo se decantó y se añadieron diluciones en serie de variantes humanizadas (0,022-1333 nM) complementadas con una cantidad fija de anticuerpo anti IgE M1' biotinilado (26A11 o 47H4 33,3 nM) en 25 µl de PBS que contenía FBS 2 % (tampón de ensayo). Después de una incubación de una hora a temperatura ambiente con agitación suave, las placas se lavaron tres veces con PBS (300 µl/pocillo), usando un lavador de microplacas (ELx405 Select, Bio-Tek

Instruments, Inc., Winooski, VT). Se detectaron anticuerpos unidos añadiendo 25 μ l de estreptavidina marcada con rutenio 0,25 μ g/ml en tampón de ensayo. Después de una incubación de una hora a temperatura ambiente, las placas se lavaron y se añadió Tampón de Lectura basado en Tris T (1x, sin tensioactivo) (Meso Scale Discovery) (150 μ l/pocillo). Se registraron las señales electroquimioluminiscentes usando un lector Sector Imager 6000 (Meso Scale Discovery).

Biacore 2000. Se usaron dos orientaciones; se inmovilizó bien M1'-Fc o bien una variante de anticuerpo particular (aproximadamente 100 UR, en Acetato Sódico 10 mM pH 4,8 en una microplaca sensora CM5) y el ligando correspondiente (variante de anticuerpo o M1'-Fc, respectivamente) actuó como el analito (inyectado a un caudal de 30 μ l/minuto, usando una dilución en serie 2 veces de 0,5 a 1000 nM en PBST). Cada muestra se analizó con una asociación de 3 minutos y disociación de 10 minutos. Después de cada inyección la microplaca se regeneró usando glicina 10 mM pH 1,7.

Biacore A-100. Se inmovilizó M1' (aproximadamente 100 UR, en Acetato Sódico 10 mM pH 4,8 en una microplaca sensora CM5) y la variante de anticuerpo actuó como el analito (inyectado a un caudal de 30 μ l/minuto, usando una dilución en serie 2 veces de 0,5 a 1000 nM en PBST). Cada muestra se analizó con asociación de 5 minutos y disociación de 5 minutos. Después de cada inyección la microplaca se regeneró usando Glicina 10 mM pH 1,7.

La respuesta de unión se corrigió restando una celda de flujo de control de celdas de flujo de IgG variante 18F7. Se usó un modelo de Languir 1:1 de ajuste simultáneo de K_{on} y K_{off} para el análisis cinético.

Resultados y análisis

Injertos de CDR de 26A11, 7A6 y 47H4. El marco conservado aceptor humano usado para humanización se basa en el dominio VL kappa I humano consenso y el dominio VH subgrupo III humano consenso. Los dominios VL y VH de mu26A11, mu7A6 y mu47H4 se alinearon con los dominios kappa I y subgrupo III humanos; cada región determinante de complementariedad (CDR) se identificó y se injertó en el marco conservado aceptor humano para generar un injerto de CDR que podría expresarse como un IgG (**Figuras 6A-6F**).

Evaluación de afinidad. Se evaluaron 26A11.v1, 7A6.v1 y 47H4.v1 usando un ELISA de unión celular y por resonancia de plasmón superficial (**Tabla 1**). Estos ensayos indicaron que los injertos de CDR tenían afinidades muy similares a sus anticuerpos de hibridoma respectivos.

Eliminación de la desamidación potencial y sitios de formación de ácido isoaspártico en CDR-L1 of 26A11 y 47H4. Para evitar problemas de fabricación potenciales, se eliminaron los sitios de formación de ácido isoaspártico potenciales Asn₂₈-Gly₂₉ en CDR-L1 de 47H4.v1 y Asn₃₁-Ser₃₂ en CDR-L1 de 26A11.v1 tomando muestras de restos hallados en otros anticuerpos en estas posiciones (**Figura 6A, 6C, Tabla I**). Se descubrió que el cambio de Gly₂₉ a Ala₂₉ en CDR-L1 de 47H4.v1 (47H4.v2 y 47H4.v5) y Ser₃₂ a Tyr₃₂ en CDR-L1 de 26A11 (26A11.v3 y 26A11.v6) o Ala₃₂ (26A11.v2 o 26A11.v5) eran reemplazados adecuados. Además, el cambio de Asn₃₁ a bien Ser₃₁ (26A11.v13 o 26A11.v15) o Gln₃₁ (26A11.v14 o 26A11.v16) también sirvió para eliminar la desamidación potencial y formación de ácido isoaspártico y proporcionar candidatos con afinidades similares a sus anticuerpos de hibridoma respectivos.

Se evitó la oxidación potencial de Met₃₄ en CDR-H1 de 26A11.v1 o 47H4.v1 cambiando este resto a Ile₃₄ en ambos anticuerpos sin afectar a la unión de M1'.

EJEMPLO 3

Especificidad de los Ab anti M1'

La especificidad de los clones de anticuerpo anti IgE/M1' se ensayó en la línea de linfocitos B humana BJAB (ATCC Manassas, VA, N° HB-136) transfectada con IgE con la secuencia M1' ("forma larga") o IgE sin la secuencia M1' ("forma corta"). Se generaron líneas celulares BJAB IgE por transducción retroviral de células BJAB usando un vector de expresión pMSCV (Washington University, St. Louis, MO). Se obtuvo ADNc de las cadenas pesada y ligera de longitud completa del receptor de linfocitos B IgE humano a partir de la línea celular de mieloma IgE humano U266 (ATCC, Manassas, VA, TIB N° 196) y se subclonaron en el vector retroviral en combinación con una IRES (Secuencia de Entrada Ribosómica Interna) para permitir la cotransfección bicistónica y coexpresión de las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpo. Se proporciona descripción adicional del método de transducción retroviral posteriormente.

Se sembraron células de empaquetamiento PG13 (ATCC CRL-10686) en una placa de cultivo tisular de 10 cm a 2 x 10⁶ células por placa (DMEM alto en glucosa, FBS 10 %, penicilina, estreptomycin, L-glutamina 2 mM) durante 24 horas. Las células se transfectaron con construcciones de ADN pMSCV usando FuGENE 6 y se cultivaron durante 2 días a 37 °C, CO₂ 5 %. Se recogió sobrenadante de cultivo celular que contenía partículas retrovirales y se filtró a través de un filtro de 0,4 micrómetros. Se añadió sulfato de protamina estéril a una concentración final de 10 μ g/ml, y se usaron 4 ml de sobrenadante para infectar aproximadamente 1 x 10⁶ BJAB por infección rotatoria a 32 °C durante

90 minutos, seguido de cultivo continuado en sobrenadante retroviral durante 3-4 horas a 37 °C en CO₂ 5 %. Se recuperaron células BJAB infectadas, se transfirieron a medio de cultivo celular RPMI (RPMI, FBS 10% (Hyclone, Logun, UT, N° SH30071.03), penicilina, estreptomina, L-glutamina 2 mM) y se expandieron para clasificación. Se identificaron células transfectadas positivamente por citometría de flujo usando anticuerpo anti IgE humano MAE11 (Genentech) para detectar IgE en superficie.

Los anticuerpos anti IgE/M1' son específicos para la forma larga y no la forma corta de IgE de membrana, como se determina por tinción de citometría de flujo de las líneas celulares de forma corta y larga de IgE BJAB. Se usó anticuerpo anti IgE humano (Mae11) (Genentech, Inc.) como un control positivo por su capacidad para unirse tanto a la forma larga como a la corta de IgE. Se usaron anticuerpos mIgG1 anti gp120 o mIgG2a anti ambrosía como controles de isotipo (Genentech, Inc).

Se cultivan células BJAB en RPMI FBS 10% (Hyclone, Logun, UT, N° SH30071.03), Penicilina/Estreptomina, L-Glutamina 2 mM (Genentech, Inc.). Se bloquearon 0,5 x 10⁶ células BJAB-Largo o BJAB-corto con suero de ratón (10 µl) (VWR, N° RLD108-0100) y humano (10 µl) (Sigma, St. Louis, MO, N° S-2257) durante 15 minutos en hielo en 100 µl de Tampón de Lavado de FACS (FBS 2 % en PBS 1X (Genentech, Inc.)). Las células se tiñeron después con 1 µg/ml de cada anticuerpo M1' durante otros 20 minutos en hielo y después se lavaron con 1 ml de Tampón de Lavado de FACS y se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 minutos. Las células se resuspendieron en 100 µl de Tampón de Lavado de FACS y después se tiñeron con IgG-PE de cabra anti ratón (5 µl) (Caltag/Invitrogen, Carlsbad, CA, N° M30004-4) en hielo durante 20 minutos. Las células se lavaron como antes y se resuspendieron en 1 ml de Tampón de Lavado de FACS para análisis en la máquina FACS Calibur (BD, Inc, Franklin Lakes, NJ). Todos los anticuerpos ensayados fueron específicos para la forma larga de IgE y no se unieron con células BJAB-IgE/corto por encima del control de isotipo. Los inventores observaron un amplio intervalo de afinidades relativas basándose en las intensidades de tinción.

Los inventores también evaluaron la unión del anticuerpo anti M1' con la línea celular U266 (ATCC, Manassas, VA, N° TIB196) que expresa de forma natural un bajo nivel de IgE humano que contiene M1' en la superficie celular. Las células U266 se mantienen a alta densidad (1-2 x 10⁶/ml) en medio de hibridoma [RPMI 1640, suero bovino Fetal 15 %, L-glutamina 2 mM, HEPES 10 mM, glucosa 4,5 g/l, bicarbonato 1,5 g/l]. Las células U266 se tiñeron con anticuerpos anti M1' a 1 µg/ml. 47H4, 47G4 y 42A5 tiñeron U266 a niveles similares a Mae11. Los anticuerpos 42H4, 45C1 y 28E9 tiñeron U266 a niveles muy bajos. 7A6, 1C11, 26A11, 51D2 y 26B11 no tiñeron U266. (Figura 2C)

EJEMPLO 3A

Especificidad de unión de anti IgE/M1' murino

Las Figuras 2D-F muestran la unión de anticuerpos murinos anti IgE/M1' 47H4, 26A11 y 7A6 a una colección de líneas celulares que expresan IgE/M1' humano, de Rhesus o de Cyno.

La especificidad de los clones de anticuerpo anti IgE/M1' se ensayó en la línea de linfocitos B humana BJAB (ATCC Manassas, VA, N° HB-136) y Daudi (ATCC N° CCL-213) infectada por retrovirus para expresar la forma larga de IgE con la secuencia M1' o la forma corta de IgE sin la secuencia M1'. Se cultivan células BJAB en RPMI FBS 10 % (Hyclone, Logun, UT, N° SH30071.03), Penicilina/Estreptomina, L-Glutamina 2 mM (Genentech, Inc.). Se bloquearon 0,5 x 10⁶ células BJAB-Largo o BJAB-corto con suero de ratón (10 µl) (VWR, N° RLD108-0100) y humano (10 µl) (Sigma, St. Louis, MO, N° S-2257) durante 15 minutos en hielo en 100 µl de Tampón de Lavado de FACS (FBS 2 % en PBS 1X (Genentech, Inc.)). Las células se tiñeron después con 1 µg/ml de cada anticuerpo anti M1' durante otros 20 minutos en hielo y después se lavaron con 1 ml de Tampón de Lavado de FACS y se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 minutos. Las células se resuspendieron en 100 µl de Tampón de Lavado de FACS y después se tiñeron con IgG-PE de cabra anti ratón (5 µl) (Caltag/Invitrogen, Carlsbad, CA, N° M30004-4) en hielo durante 20 minutos. Las células se lavaron como antes y se resuspendieron en 1 ml de Tampón de Lavado de FACS para análisis en la máquina FACS Calibur (BD, Inc, Franklin Lakes, NJ). Todos los anticuerpos ensayados fueron específicos para la forma larga de IgE y no se unieron con células BJAB-IgE/corto por encima del control de isotipo. Los inventores observaron un amplio intervalo de afinidades relativas basándose en las intensidades de tinción.

La especificidad de los clones de anticuerpo anti IgE/M1' se ensayaron en la línea de linfocitos B humana Daudi infectada por retrovirus para expresar IgE de membrana con la secuencia M1' (forma larga) o un IgE de membrana sin la secuencia M1' (forma corta). Los anticuerpos anti IgE/M1' (47H4, 26A11, 7A6) son específicos para la forma larga y no la forma corta (Figura 2D). Se usó un anticuerpo mIgG1 anti gp120 como un control de isotipo (Genentech, Inc).

La línea de linfocitos B humana Daudi se transdujo con el retrovirus que contenía el casete de IgE humano/M1' de primate para IgE/M1' bien rhesus o bien cyno o el humano. Después de la transducción las células que expresaban IgE/M1' humano, de rhesus o de cyno se clasificaron por separación de FACS a > 98 % de pureza durante el transcurso de 3-4 clasificaciones.

La Figura 2F demuestra la capacidad de los anticuerpos anti IgE/M1' para unirse con M1' de Rhesus y de Cyno. 47H4 y 7A6 se unen ambos con M1' de Rhesus y de Cyno, mientras que 26A11 se une solamente con M1' de Rhesus.

Además de las líneas celulares transfectantes de Daudi, los inventores evaluaron la unión del anticuerpo anti IgE/M1' con U266, una línea celular de mieloma de IgE humana (ATCC, Manassas, VA, N° TIB196). Se mantienen células U266 a alta densidad ($1-2 \times 10^6$ /ml) en medio de hibridoma [RPMI 1640, suero bovino Fetal 15%, L-glutamina 2 mM, HEPES 10 mM, glucosa 4,5 g/l, bicarbonato 1,5 g/l]. Las células U266 se tiñeron con anticuerpos anti M1' a 1 µg/ml. El anticuerpo anti IgE/M1' 47H4 se unió a U266 mientras que 26A11 y 7A6 no (Figura 2E).

EJEMPLO 3B

Especificidad de unión de anti IgE/M1' humanizado

El ejemplo 3B muestra la unión de anticuerpos anti IgE/M1' humanizados con una colección de líneas celulares que expresan IgE/M1' humano, de rhesus o de cyno.

Usando las mismas líneas de linfocitos B humanas Daudi o BJAB que sobreexpresan M1' humano, de rhesus y de cyno analizadas en el Ejemplo 3A, la especificidad de los clones de anticuerpo anti IgE/M1' humanizados se ensayó en la línea de linfocitos B humana Daudi infectada por retrovirus para expresar la forma larga de IgE con la secuencia M1' o la forma corta de IgE sin la secuencia M1'. Los anticuerpos anti IgE/M1' humanizados (47H4v5, 26A11v6, 7A6v1) son específicos para la forma larga y no la forma corta (sin M1') [Figura 2G]. Se usó MAb hulG1 anti Her2 HERCEPTIN® como un control de isotipo (Genentech, Inc.). Además, los anticuerpos anti IgE/M1' humanizados (47H4v5 y 26A11v6) se unen con las líneas celulares U266 (Figura 2H).

La Figura 2I muestra la capacidad de anticuerpos anti IgE/M1' humanizados para unirse con M1' tanto de rhesus como de cyno. Los anticuerpos 47H4v5 y 7A6v1 se unen con M1' tanto de rhesus como de cyno, mientras que 26A11v6 solamente se une con M1' de rhesus.

EJEMPLO 4

Afinidad de unión relativa de anticuerpos anti M1'

Los inventores observaron una amplia serie de intensidades de unión de anticuerpo anti IgE/M1' a 1 µg/ml. Para evaluar las afinidades relativas de estos anticuerpos para el receptor de IgE largo, los inventores tiñeron células BJAB-largo con una serie de diluciones de anticuerpo anti M1' (1, 0,1, 0,01, 0,001 µg/ml). Las células BJAB-Largo se bloquearon con suero humano y de ratón (10 µl) durante 20 minutos en hielo. Las células se tiñeron con la cantidad apropiada del anticuerpo anti M1' o controles de isotipo mlgG2a anti gp 120 o mlgG2a anti ambrosía durante otros 20 minutos. Las células se lavaron después en Tampón de Lavado de FACS (1 ml), se centrifugaron (rpm 1200 durante 5 minutos) y después se resuspendieron en 100 µl de tampón de Lavado de FACS con anticuerpo anti IgG de ratón-PE de cabra (5 µl) (CALTAG/Invitrogen, Carlsbad, CA N° M30004-4) para detección. Las células se lavaron de nuevo como anteriormente y después se analizaron en una máquina FACS Calibur (BD, Inc, Franklin Lakes, NJ). Los ajustes de tensión se basaron en el control de isotipo de 0,001 µg/ml. A partir de estos resultados los candidatos de anticuerpos anti IgE/M1' se clasificaron de acuerdo con su afinidad de unión relativa:

42H4 > 7A6, 47H4, 47G4 > 42A5, 26A11, 45C1 > 51D2, 26B11 > 1C11 > 28E9

Además de las determinaciones de afinidad relativa por titulación de anticuerpos y detección de FACS, los inventores también determinaron las afinidades de anticuerpos anti M1' seleccionados por líneas celulares BJAB que expresaban la forma larga de IgE usando análisis de Scatchard. Las células BJAB-Largo se prepararon para unión en tampón de unión frío compuesto de medio básico, con HEPES 10 mM pH 7,4 y FBS 2 % así como IgG humano 40 µg/ml. Las células se diluyeron a una concentración de $1,7 \times 10^6$ células/ml, y se mantuvieron en hielo hasta que se añadieron al ensayo. Los anticuerpos se yodaron con el método de Iodogen. Se prepararon diversas concentraciones de anticuerpo no marcado por triplicado, usando una dilución 1:2 comenzando con la concentración de saturación y terminando a una concentración de cero, con un total de 14 concentraciones. Se añadió anticuerpo yodado de una única concentración a todas las diluciones del anticuerpo no marcado competidor. Finalmente se añadieron 250.000 BJAB-Largo a cada mezcla de anticuerpo yodado y no marcado. Las muestras se incubaron a 4 °C durante 4 horas, con agitación. Cada muestra se recogió y se filtró en una membrana, se lavó al menos 3 veces con tampón de unión, se permitió que se secase y después se midió durante 1 minuto usando un Contador Gamma Auto Perkin Elmer Wizard 1470.

EJEMPLO 4AAfinidad de Scatchard de anticuerpos anti IgE/M1' murinos

Las células BJAB o Daudi que expresaban diversas formas de IgE con o sin M1' (Humano, de Rhesus, de Cyno) se prepararon para unión en tampón de unión frío compuesto de medio básico, con HEPES 10 mM pH 7,4 y FBS 2 % así como IgE humano 40 µg/ml. Las células se diluyeron a una concentración de $1,7 \times 10^6$ células/ml, y se mantuvieron en hielo hasta que se añadieron al ensayo. Las proteínas/anticuerpos se yodaron con el método de Iodogen. Se prepararon diversas concentraciones de proteína fría por triplicado, usando una dilución 1:2 comenzando con la concentración de saturación y terminando a una concentración de cero, con un total de 14 concentraciones. Se añadió proteína caliente de una única concentración a todas las diluciones compitiendo con la proteína fría. En último lugar se añadieron las células a la mezcla de proteína caliente y fría, se usaron 250.000 células por muestra. El ensayo se mantuvo a 4 °C durante 4 horas, con agitación. Cada muestra se recogió después y se filtró en membrana, se lavó al menos 3 veces con tampón de unión, se permitió que se secara y después se contó durante 1 minuto usando el Contador Gamma Auto Perkin Elmer Wizard 1470.

La Figura 3O resumen las afinidades de anticuerpos murinos anti M1' medidas por análisis de Scatchard. El anticuerpo murino mlgG1 47H4 se unió a M1' humano, de Rhesus, de Cyno con afinidades de 0,79, 0,77 y 0,97 nM, respectivamente. Los anticuerpos murinos mlgG1 26A11 y mlgG1 7A6 se unieron con M1' con afinidades de 2,3 y 0,64 nM, respectivamente.

La Figura 3P resumen las afinidades de unión de anticuerpos anti IgE/M1' humanizados con M1' humano, de rhesus y de cyno. El anticuerpo humanizado hulG1 47H4v5 se unió con M1' humano, de rhesus y de cyno con afinidades de 1,5, 1,3 y 2,5 nm, respectivamente. Los anticuerpos humanizados 47H4 v2, 47H4 v1, 26A11 v6, 26A11 v14 y 26A11 v1 se unieron con M1' humano con afinidades de 0,54, 0,37, 1,85, 1,5 y 1,06, respectivamente.

EJEMPLO 5Estudios de bloqueo/unión de epítipo de anti IgE/M1'

Se realizaron estudios de bloqueo entre candidatos a anticuerpo anti IgE/M1' para determinar epítipos de unión distintos o solapantes. Cuando los anticuerpos de bloqueo y detección fueron de isotipo diferente (es decir, IgG1 frente a IgG2a), estas diferencias de isotipo se aprovecharon para determinar el alcance del bloqueo detectando con un anticuerpo secundario específico de isotipo (CALTAG/Invitrogen, Carlsbad, CA, anti IgG1 de ratón-PE de cabra N° 32004 o anti IgG2a de ratón de cabra N° M32204). Cuando los anticuerpos del anticuerpo de bloqueo y unión fueron de los mismos isotipos, los anticuerpos se conjugaron con Biotina (Pierce, Rockford, IL, sulfo-NHS-LC-Biotina ligada a EZ N° CAS 127062-220) y se detectaron con Estreptavidina-PE (BD N° 554061), o se conjugaron con Alexa-647 (Molecular Probes/Invitrogen, Carlsbad, CA, N° A20173). Inicialmente se usaron anticuerpos de bloqueo y detección a una relación 1:1 (10 µg/ml) (Figuras 4A-4B). Las combinaciones de anticuerpos que inicialmente no proporcionaron bloqueo o solamente bloqueo parcial se ensayaron adicionalmente usando una relación 10:1 de anticuerpos de bloqueo y detección. Las células BJAB-Largo se bloquearon con suero de ratón y humano (como se ha descrito anteriormente), y después se tiñeron con el anticuerpo de bloqueo (10 µg/ml) en Tampón de Lavado de FACS (FBS 2%/PBS 1X) durante 20 minutos en hielo. Las células se lavaron en Tampón de Lavado de FACS y después se tiñeron con el anticuerpo de detección a la relación 1:1 (10 µg/ml) o 10:1 (1 µg/ml) durante 20 minutos en hielo. Las células se lavaron de nuevo como anteriormente y después se analizaron en una máquina FACS Calibur (BD, Inc, Franklin Lakes, NJ). Las células teñidas se compararon con un anticuerpo de control de isotipo bien mlgG1 anti gp120 (Genentech, Inc.) o bien mlgG2a anti ambrosia (Genentech, Inc.) (Figura 4C). Para comparación, se determinó el bloqueo completo tiñendo con el mismo anticuerpo no conjugado cuando fuera posible.

Los estudios de bloqueo revelaron tres grupos de unión principales A, B y C. El grupo A se dividió adicionalmente en dos grupos A1 (47H4, 47G4, 42H4, 42A5) y A2 (45C1, 51D2, 26A11) basándose en los epítipos solapantes parciales (Figura 4D). El grupo C (26B11) tuvo muy poco solapamiento con otros candidatos al anticuerpo. Tres candidatos solaparon más ampliamente que los otros. 1C11 parecía tener unión solapante con el grupo A1 y A2, y estaba solamente parcialmente bloqueado por el grupo B (28E9). 7A6 pertenece principalmente al grupo A1 pero tuvo interacción parcial con candidatos del grupo A2. 28E9 pertenece a un grupo solo para él. 28E9 tuvo solamente interacción parcial con candidatos del grupo A2.

EJEMPLO 5AMapeo de epítipos

Las Figuras 5A-E muestran estudios de unión de epítipos realizados usando anticuerpos anti IgE/M1'. Se muestran los anticuerpos murinos 47H4, 7A6 y 26A11 en las Figuras 5B y 5D, mientras que las variantes humanizadas 47H4v5, 7A6v1 y 26A11v6 se muestran en las Figuras 5C y 5E.

Estudios de mapeo de epítomos: candidatos murinos

Se generaron 15 péptidos que abarcaban la secuencia circundante e incluían M1' humano (Clifford Quan) (Figura 5A). Los péptidos se resuspendieron en dH2O o DMSO 50 %. Se recubrieron con los péptidos placas de 96 pocillos (placas de ELISA de alta capacidad de unión a proteínas NUNC Maxisorp N° 44-2404) a 1 µg/ml en Tampón de Recubrimiento (Carbonato/bicarbonato 0,05 M (pH 9,6) (100 µl por pocillo). La proteína de fusión M1'-Fc se usó como un control positivo para la unión. Los controles negativos incluían pocillos recubiertos con IgE humano (U266) y pocillos no recubiertos. Se permitió que los péptidos recubrieran durante una noche a 4 °C. A la mañana siguiente las placas se lavaron 3 veces con tampón de lavado (PBS/ Tween-20 0,05 % (pH 7,4)). Las placas se bloquearon después en tampón de Bloqueo (PBS, BSA 0,5 % (pH 7,4)) durante 1 hora con agitación suave. Se prepararon diluciones de los anticuerpos (40 ng/ml y 1 ng/ml) para ensayar (mIgG1 47H4, hulgG1 47H4v5, mIgG1 26A11, hulgG1 26A11v6, mIgG1 7A6, hulgG1 7A6v1) en Tampón Magic [PBS (pH 7,4), BSA 0,5 %, Tween-20 0,05 %, Proclin 10 ppm, BgG 0,2 %, Chaps 0,25%, EDTA 5 mM, NaCl 0,35M]. Se usaron anticuerpos mIgG1 anti gp120 y hulgG1 HERCEPTIN® como controles para anticuerpos anti IgE/M1' murinos y humanos respectivamente. Una vez que las placas se hubieron bloqueado suficientemente (BSA 0,5 %/PBS 1X), las placas se lavaron 3 veces, y después se añadieron anticuerpos a la placa por triplicado (100 µl por pocillo). Después se incubaron las placas durante 2 horas a temperatura ambiente. Las placas de anticuerpos murinos se lavaron 3 veces y después se añadió anti IgG1 de ratón-Biotina (BD Biosciences (A85-1) N° 553441) (1:10.000, 100 µl por pocillo) y se incubó durante 1 hora a TA. Después de 3 lavados, se añadió SA-HRP (BD Biosciences N° 554066) (1:20.000, 100 µl pocillo) y se incubó durante 1 hora. Las placas de anticuerpo IgG1 humano se lavaron como antes y se añadió anti hulgG.Fc-HRP (Jackson Immuno Research (N° 109-036-098)) (1:10.000, 100 µl por pocillo) y se incubó durante 1 hora a TA. Una vez que se hubieron completado las incubaciones secundarias, las placas se lavaron 6 veces y se añadió el sustrato TMB (BD OptEIA N° 555214) (100 µl por pocillo). La reacción de sustrato-HRP se detuvo con H3PO4 1M después de 4 minutos. Las placas se leyeron después a 450/650. Los datos se representaron como DO relativa (DO450 / DO650).

Las Figuras 5B y 5D ilustran la unión de candidatos anti IgE/M1' 47H4, 26A11 y 7A6 murinos con péptidos M1'. La unión de estos candidatos se correlaciona con estudios de bloqueo de anticuerpos definidos por agrupamientos de epítomos. El mIgG1 47H4 se unió con el péptido 4 (SAQSQRAPDRVLCHS) (SEC ID N°: 8). El mIgG1 7A6 se unió con los péptidos 4 (SAQSQRAPDRVLCHS) (SEC ID N°: 8) y 5 (RAPDRVLCHSGQQQG) (SEC ID N°: 9). El mIgG1 26A11 se unió con los péptidos 7 (GQQQGLPRAAGGSVP) (SEC ID N°: 11) y 8 (PRAAGGSVPHPRCH) (SEC ID N°: 12).

Las Figuras 5C y 5E ilustran la unión de anticuerpos anti IgE/M1' humanizados con péptidos M1'. El mapeo de epítomos se realizó como se ha descrito anteriormente para los anticuerpos murinos correspondientes, excepto que se usó un anticuerpo secundario diferente. Las placas con anticuerpo IgG1 se lavaron como antes y se añadió anticuerpo secundario anti IgG.Fc-HRP (Jackson ImmunoResearch (N° 109-036-098) (1:10.000, 100 µl por pocillo) y se incubó durante 1 hora a TA. La unión de epítomos se asemeja a la observada con los anticuerpos murinos parentales. El 47H4 v5 se une con el péptido 4 (SAQSQRAPDRVLCHS) (SEC ID N°: 8). El 7A6 v1 se une con los péptidos 4 (SAQSQRAPDRVLCHS) (SEC ID N°: 8) y 5 (RAPDRVLCHSGQQQG) (SEC ID N°: 9). El mIgG1 26A11 se une con los péptidos 7 (GQQQGLPRAAGGSVP) (SEC ID N°: 11) y 8 (PRAAGGSVPHPRCH) (SEC ID N°: 12).

EJEMPLO 6Inducción de apoptosis por anti IgE/M1' murino en células Daudi-IgE/Largo

Se usaron células Daudi-Largo (IgE/M1') para ensayar el efecto de entrecruzar IgE en superficie en la inducción de la apoptosis. Las células Daudi (ATCC, Manassas, VA, N° CCL-213) son una línea celular de Linfoma de Burkitt humana que se sabe que es susceptible a la apoptosis en respuesta a entrecruzamiento de BCR. Se generaron células Daudi que expresaban la forma larga de IgE por transducción retroviral de las cadenas pesada y ligera de IgE con M1' de U266, como se ha descrito anteriormente para la generación de células BJAB IgE largo. El análisis de citometría de flujo de células Daudi-IgE/Largo usando anticuerpos contra IgM endógeno y receptor de linfocitos B de IgE transfectado indica mayor expresión de IgM que IgE. Se estudió la apoptosis de células Daudi-IgE/Largo en células cultivadas hasta una densidad de $0,2 \times 10^6$ / 1,5 ml en medio de cultivo [RPMI, FBS 10% (Hyclone, Logun, UT, N° SH30071.03), Penicilina/Estreptomycin (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA N° 15140-122), Glutamina 2 mM (Genentech, Inc.), HEPES 10 mM (7,2) (Genentech, Inc.), NaPiruvato 1 mM (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA N° 11360), solución de bicarbonato sódico 1,59 g/l (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA N° 25080-094)]. Antes del comienzo del ensayo de apoptosis, se retiraron las células muertas sobre un gradiente de ficoll (GE Healthcare N° 17-1440-03) para reducir los niveles de fondo de muerte celular en el ensayo. Se cultivaron $0,2 \times 10^6$ células por triplicado con y sin anticuerpos anti M1' o anticuerpos de control en solución durante 72 horas. Las células se recogieron y analizaron después con respecto a niveles de Apoptosis usando el Kit de Detección de Apoptosis de Anexina V-FITC I (BD Biosciences, San Jose, CA N° 556547). Las células se lavaron dos veces en PBS frío (Genentech, Inc.) y después se resuspendieron en 100 µl de tampón de unión 1X (Hepes 0,1 M / NaOH (pH 7,4), NaCl 1,4 M, CaCl₂ 25 mM) (BD Biosciences, San Jose, CA, N° 51-66121E). Las células se tiñeron después con 2,5 µl de anticuerpo de Anexina V-FITC (BD Biosciences, San Jose, CA N° 51-65874X) y 5 µl de Yoduro de Propidio (PI) (BD Biosciences,

San Jose, CA N° 51-66211E) en oscuridad. Después de 15 minutos, se añadieron 400 µl de tampón de unión 1X a cada tubo y las células se analizaron en una máquina de citometría de flujo FACS Calibur (BD, Inc. Franklin Lakes, NJ). Se recogieron aproximadamente 10-20.000 acontecimientos para cada muestra. Las células moribundas se definen como positivas para Anexina V y negativas para PI. Las células muertas son positivas tanto para Anexina V como para PI. El porcentaje de cada población (muerta y moribunda) se calculó usando software de análisis de FACS FlowJo (Tree Star, Inc., Ashland, Oregón). Se promediaron datos por triplicado y se calcularon las desviaciones típicas. Se calculó el porcentaje de Apoptosis como la suma de células muertas y moribundas y se representó gráficamente usando Excel (Microsoft, Inc.).

Se usaron camptotecina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, N° C9911-100 mg) y anticuerpo anti IgM (JacksonImmuno Research, West Grove, PA, N° 109-006-120) como controles positivos para inducir apoptosis en la línea celular Daudi-IgE/Largo. Se usaron anticuerpos mIgG1 anti gp120 o mIgG1 anti ambrosía (Genentech, Inc.) como controles negativos para este ensayo. Se cultivaron células Daudi-IgE/Largo con una serie de concentraciones de anticuerpos de control de isotipo o anti IgE/M1' (25, 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001 µg/ml). Los anticuerpos anti IgE/M1' ensayados fueron 7A6, 47H4, 47G4, 42A5, 42H4, 1C11, 26A11, 51D2, 45C1, 26B11 y 28E9 (Genentech, Inc.). También se usó anticuerpo anti IgE humano (Mae11-mIgG1) para comparar.

Los anticuerpos de control de isotipo anti gp120 y anti ambrosía no indujeron apoptosis por encima de las células no tratadas. Los niveles de fondo de apoptosis estuvieron en el intervalo de 10-15 % para cada experimento. Los anticuerpos anti IgE/M1' 7A6 (>10 µg/ml), 47H4 (>10 µg/ml) y 47G4 (25 µg/ml) indujeron apoptosis de células Daudi IgE largo. 26A11 indujo magnitudes similares de apoptosis (~30-50 %) pero a concentraciones muchos menores (>0,1 µg/ml). 42A5, 51D2, 45C1, 26B11 y 28E9 no indujeron apoptosis por encima de los niveles de fondo. Mae11 tampoco indujo apoptosis por encima de los niveles de fondo.

Los inventores realizaron también el ensayo de apoptosis en presencia de un anticuerpo secundario F(ab')₂ de cabra anti IgG de ratón (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA N° 115-006-062) para sobreentrecruzar el receptor de linfocitos B de IgE en la línea celular Daudi. Se realizaron experimentos de entrecruzamiento en presencia de anticuerpo F(ab')₂ de cabra anti IgG de ratón (30 µg) (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, N° 115-006-062). Con la excepción de 26B11 (30 %), todos los anticuerpos indujeron niveles apoptóticos máximos del 70-80 % pero a diferentes concentraciones. Estos anticuerpos pueden clasificarse en dos grupos. 7A6, 1C11, 26A11, 51 D2, 45C1 y 28E9 indujeron apoptosis máxima a las mayores concentraciones. El otro grupo 47H4, 47G4, 42A5 y 42H4 y MAE11 mostró apoptosis decreciente a concentraciones mayores.

EJEMPLO 6A

Inducción de apoptosis en anticuerpos anti IgE/M1' humanizados en células Daudi/IgE-largo

Se usaron células Daudi-Largo (IgE/M1') para ensayar el efecto de entrecruzar IgE de superficie en la inducción de la apoptosis en esta línea celular. Las células Daudi (ATCC, Manassas, VA, N° CCL-213) son una línea celular de Linfoma de Burkitt humana que se sabe que es susceptible a la apoptosis en respuesta a entrecruzamiento de BCR. Se cultivaron células Daudi-IgE/Largo a una densidad de $0,2 \times 10^6$ / 1,5 ml en medio de cultivo [RPMI, FBS 10% (Hyclone, Logan, UT, N° SH30071.03), Penicilina/Estreptomina (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA N° 15140-122), Glutamina 2 mM (Genentech, Inc.), HEPES 10 mM (7,2) (Genentech, Inc.), NaPiruvato 1 mM (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA N° 11360), solución de bicarbonato sódico 1,59 g/l (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA N° 25080-094)] la noche antes y después se retiraron las células muertas sobre un gradiente de ficoll (GE Healthcare N° 17-1440-03) al día siguiente. Esto redujo los niveles de fondo de muerte celular en el ensayo. Se cultivaron $0,2 \times 10^6$ células por triplicado con y sin anticuerpos anti M1' o anticuerpos de control en solución durante 72 horas. Después se recogieron células y se analizaron con respecto a los niveles de Apoptosis usando el Kit de Detección de Apoptosis de Anexina V-FITC I (BD Biosciences, San Jose, CA N° 556547). Las células se lavaron dos veces en PBS frío (Genentech, Inc.) y después se resuspendieron en 100 µl de tampón de unión 1X (Hepes 0,1 M / NaOH (pH 7,4), NaCl 1,4 M, CaCl₂ 25 mM) (BD Biosciences, San Jose, CA, N° 51-66121E). Después se tiñeron las células con 2,5 µl de anticuerpo de Anexina V-FITC (BD Biosciences, San Jose, CA N° 51-65874X) y 5 µl de Yoduro de Propidio (PI) (BD Biosciences, San Jose, CA N° 51-66211E) en oscuridad. Después de 15 minutos, se añadieron 400 µl de tampón de unión 1X a cada tubo y las células se analizaron en una máquina de citometría de flujo FACS Calibur (BD, Inc. Franklin Lakes, NJ). Se recogieron aproximadamente 10-20.000 acontecimientos para cada muestra. Las células moribundas se definen como positivas para Anexina V y negativas para PI. Las células moribundas se definen como positivas para Anexina V y negativas para PI. Las células muertas son positivas tanto para Anexina V como para PI. El porcentaje de cada población (muertas y moribundas) se calculó usando software de análisis de FACS FlowJo (Tree Star, Inc., Ashland, Oregón). Se promediaron datos por triplicado y se calcularon las desviaciones típicas. Se calculó el porcentaje de Apoptosis como la suma de células muertas y moribundas y se representó gráficamente usando Excel (Microsoft, Inc.).

Se usó un anticuerpo anti IgR4 (JacksonImmuno Research, West Grove, PA, N° 109-006-120) como un control positivo para inducir apoptosis en la línea celular Daudi-IgE/Largo. Se usó hulgG1 HERCEPTIN® (Genentech, Inc.) como un control negativo para este ensayo. Las células Daudi-IgE/Largo se cultivaron con una serie de

concentraciones de anticuerpos IgE/M1' o de control de isotipo (25, 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001 µg/ml). Se realizaron experimentos de entrecruzamiento secundario en presencia de anticuerpo F(ab')₂ de cabra anti IgG humano (50 µg) (Biosource N° AHI1301). Los anticuerpos anti IgE/M1' ensayados fueron hulG1 47H4v5, 26A11 v6, 7A6v1.

5 hulG1 HERCEPTIN® de control de isotipo no indujo apoptosis por encima de células no tratadas. Los niveles de fondo de apoptosis estaban en el intervalo de 10-15 % para cada experimento. Los anticuerpos anti IgE/M1' 47H4 v5, 26A11v6 y 7A6v1 indujeron apoptosis en el intervalo de 30-40 % (Figura 8A).

10 Los inventores repitieron los mismos ensayos en presencia de un anticuerpo secundario F(ab')₂ de cabra anti IgG humano (Biosource N° AHI1301) para entrecruzar el receptor de IgE en la línea celular Daudi. Todos los anticuerpos indujeron niveles apoptóticos máximos de 70-90 %, con algo de reducción en actividad apoptótica a altas concentraciones de anticuerpo anti IgE/M1' primario (Figura 8B).

47H4v5 de tipo silvestre frente a afucosilado en la inducción de apoptosis sin entrecruzamiento secundario.

15 Se produjo la versión afucosilada (AF) de 47H4 v5 usando líneas celulares BLOWA (Genentech, Inc.). Las versiones tanto WT como AF de 47H4 v5 fueron capaces de inducir apoptosis a niveles similares (Figura 8C).

Tabla 1

Afinidades de unión de anti IgE/M1' humanizado

		Cambios de secuencia		Scatchard		Unión celular		BJAB-IgE		Biacore A100		Biacore 2000	
		L1-31/32	H1-34/35	KD (nM)		CI50 (nM)		CI50 (nM)		M1' inmovilizado		M1' inmovilizado	
		NS	MM	1,6 nM		12		25/26		KD(nM)		KD (nM)	
mu26A11		NS	MM			15		19		0,3		5,1	
26A11.v1		NS	MM			18				0,2		1,7	
26A11.v2		NA	MM			10		22		0,3			
26A11.v3		NY	MM			20		29		0,0		2,8	
26A11.v4		NS	IM			25		35		0,9			
26A11.v5		NA	IM			11		23					
26A11.v6		NY	IM					890		2,6		8,3	
26A11.v7		NS	IH			-3300					muy débil		
26A11.v10		NS	IN			-540				1064			
26A11.v11		NA	IN			-1200				21364			
26A11.v12		NY	IN					19					
26A11.v13		SS	MM					19				4,0	
26A11.v14		QS	MM					32				3,9	
26A11.v15		SS	IM					27				8,4	
26A11.v16		QS	IM									8,8	
		L1-27e/28	H1-34	H3-100k		62		57		5,6		12	
mu47H4		NG	M			12		18		7,8			1,5
47H4.v1		NG	M	0,4 nM		38				7,4			3,1
47H4.v2		NA	M			-7600				69			2,8
47H4.v3		NG	I			>1300				56			
47H4.v4		NA	I					60				23	
47H4.v5		NA	I					170				54	
47H4.v6		NA	M										
		H1-34	H3-100k			52				4,5			
mu7A6		M	M	0,6 nM		39				15			
7A6.v1		M	M			-370				571			
7A6.v2		I	L										

EJEMPLO 7Flujo de calcio inducido

Los inventores investigaron la capacidad de los anticuerpos anti M1' para inducir flujo de calcio en células Daudi-IgE/Largo como prueba de que estos anticuerpos pueden inducir la señalización celular corriente arriba del receptor de linfocitos B de IgE. Se cultivaron células Daudi (ATCC, Manassas, VA, N° CCL-213) que sobreexpresaban la forma larga de IgE/M1' durante una noche a una densidad ligera de $0,2 \times 10^6/\text{ml}$. A la mañana siguiente las células muertas se retiraron sobre un gradiente de ficoll (GE Healthcare N° 17-1440-03). Las células se cargaron con Indo 1 a granel para asegurar la carga homogénea entre todos los estímulos. Las células se resuspendieron a $5 \times 10^6/\text{ml}$ en medio de cultivo (RPMI-10% FBS (Hyclone), penicilina/estreptomicina, L-Glutamina 2 mM) y se combinaron con el colorante de detección de calcio Indo-1 ($5 \mu\text{M}$) (Molecular probes/Invitrogen, Carlsbad, CA, N° 11223). Las células se lavaron después en medio de cultivo y se resuspendieron a $10^6/\text{ml}$. Se usaron 10^6 células por estímulo. Las muestras se calentaron en un baño de agua a 37°C durante 5 minutos antes de procesar en una máquina FACS Vantage (BD, Inc, Franklin Lakes, NJ). Las muestras se procesaron inicialmente durante 1 minuto para generar una línea basal y después las muestras se estimularon con $20 \mu\text{g}$ de cada anticuerpo, excepto para anti IgM ($10 \mu\text{g}$). Los datos se recogieron durante 8-10 minutos. Se realizó análisis cinético en software de análisis de FACS FlowJo (Tree Star, Inc., Ashland, Oregón). Los datos se presentan como la relación de Indo 1 405 Unido / Indo 1 1530 Libre. Todos los anticuerpos anti M1' se compararon con el mIgG1 de control de isotipo anti gp120 ($20 \mu\text{g}$). Se usaron anti IgM humano (Jackson Immuno-Research, West Grove, PA, N° 109-005-129) y anti IgE (Mae11, Genentech, Inc.) como controles positivos. 7A6, 47H4, 47G4, 26A11 y 1C11 indujeron un flujo de calcio en células Daudi IgE largo. 28E9 y 42A5 indujeron niveles bajos de flujo de calcio. 45C1, 26B11 y 51D2 no indujeron flujo de calcio.

EJEMPLO 8Inducción de ADCC por anti IgE/M1' 47H4 v5 wt y afucosilado

La citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC) permite que las células citotóxicas se unan (mediante el anticuerpo) con la célula diana de unión a antígeno y posteriormente destruyan la célula diana con citotoxinas. Los anticuerpos anti IgE/M1' que poseen actividad ADCC o actividad ADCC potenciada pueden tener valor terapéutico potenciado en el tratamiento de trastornos mediados por IgE.

Se ha descubierto que los anticuerpos producidos en células de mamífero que están afucosilados tienen actividad ADCC potenciada. El siguiente experimento describe la producción de anticuerpo anti IgE/M1' afucosilado.

Se aislaron linfocitos NK a partir de 100 ml de sangre completa (RosetteSep N° 15065, Stem Cell Technologies). Se determinó la pureza de los linfocitos NK por tinción anti CD56 humano. Se usaron linfocitos NK CD56+ > 70 % puros en cada ensayo. Se valoraron en serie anticuerpos anti IgE/M1' y control de isotipo MAb huIgG1 anti Her2 HERCEPTIN®. Estos anticuerpos ($50 \mu\text{l}$) se incubaron con células BJAB que sobreexpresaban IgE/M1' humano en la superficie celular durante 30 minutos a temperatura ambiente en RPMI-1640 (sin rojo fenol) (BioWhittaker N° 12-918F) con FBS 1 % (la línea celular se generó como se ha descrito anteriormente). Después se añadieron linfocitos NK ($50 \mu\text{l}$) a la línea celular a una relación 15:1 (150.000 linfocitos NK a 10.000 dianas (BJAB-Largo)). Los ensayos se realizaron por triplicado. Después se incubaron BJAB-huLargo, anticuerpos y linfocitos NK durante 4 horas a 37°C . Después del cultivo, se centrifugaron placas de fondo en U de 96 pocillos y se recogieron los sobrenadantes ($100 \mu\text{l}$). Después se ensayaron los sobrenadantes con respecto a liberación de LDH usando el Ensayo de reacción de LDH (Roche N° 1644793). Se usaron Diana sola y Diana lisada para calcular el porcentaje de citotoxicidad. Los sobrenadantes se incubaron a un volumen igual con la mezcla de reacción de LDH como indica el fabricante durante 30-60 minutos. Las placas se leyeron después a 490 nm. Se calculó el % de citotoxicidad de la siguiente manera: = (valor Exp – Diana sola) / (diana lisada – Diana sola). Los datos se representaron usando Kaleidagraph y se usaron las curvas de mejor ajuste para generar valores DE50.

En la Figura 10, el anticuerpo de control de isotipo huIgG1 HERCEPTIN® indujo citotoxicidad de bajo nivel. Los anticuerpos anti IgE/M1' indujeron citotoxicidad específica. Las formas de tipo silvestre y afucosiladas de anti IgE/M1' 47H4v5 indujeron % de citotoxicidad máximo similar (~70-80 %). El 47H4v5 afucosilado fue más potente que la forma de tipo silvestre (la CE50 del 47H4v5 afucosilado fue de ~0,83 nM; la CE50 del 47H4v5 de tipo silvestre fue de ~6,6 nM).

EJEMPLO 9Efecto de los anticuerpos anti IgE/M1' murinos en ratones hu-SCID atópicos

Las Figuras 12A y 13A demuestran la capacidad de los anticuerpos anti IgE/M1' (tanto murinos como humanizados, respectivamente) para inhibir la producción de IgE en suero y células plasmáticas productoras de IgE en un modelo hu-SCID atópico. El experimento 1 (N° 07-0377) ensayó candidatos anti IgE/M1' murinos y el experimento 2 (N° 07-1232) ensayó un candidato anti IgE/M1' humanizado.

Los donantes se exploraron con respecto a los niveles de IgE en suero del programa de donantes de sangre Leukopack interno de los inventores. Dos donantes seleccionados para proporcionar células para el modelo de hu-SCID Atópico se identificaron a sí mismos como alérgicos y tuvieron niveles de IgE en suero de 1696 y 1152 ng/ml. Los donantes normales tienen normalmente IgE que varía de < 100 a 300 ng/ml.

Los experimentos de hu-SCID se representan en las Figuras 12A y 13A. Se aislaron PBMC por leucoforesis y gradiente de densidad de ficoll (GE Healthcare N° 17-1440-03) y se contaron. Se inyectaron 10^8 células PBMC (10^8 por 100 μ l) i.p. en ratones SCID-beige irradiados el día cero. Para sesgar la respuesta hacia la producción de IgE, los ratones se trataron con anticuerpos anti IFN γ (BD Biosciences, San Jose, CA, N° 554698) y anti IL12 (100 μ g/dosis) (BD Biosciences, San Jose, CA, N° 554659) los días 0 y 3; y rhIL-4 (100 ng/dosis) (R&D Systems, Minneapolis, MN, N° 204-IL-010) los días 2, 3, 4. Los ratones se trataron con anticuerpos experimentales (es decir anti IgE/M1') tres veces por semana (aproximadamente cada tres días) comenzando el día 0 hasta el final del estudio. Se permitió que las células humanas se expandieran entre 7 y 14 días tras lo cual se sacrificó a los ratones. Se tomaron muestras de sangre el día 7 y al final del estudio. El día final del experimento, los ratones se sacrificaron y se aislaron las células del bazo. Se usaron suspensiones de células individuales para ensayo Elispot de IgE y FACS para determinar el alcance de la reconstitución celular humana y agotamiento de células plasmáticas de IgE.

Los datos se expresan como la media $\pm$ Desviación Típica. Los P valores se calcularon usando el software de estadística JMP. El ensayo de Dunnett compara las medias de los grupos ensayándose todos los grupos de ensayo frente a un grupo de referencia. La t de Student de Cada Par compara cada par de grupos usando ensayo de t de Student. Se aplica después una Corrección de Bonferroni para ajustar los p valores de la t de Student de Cada Par para proteger contra comparaciones por pares. El umbral de todos los p valores es 0,05. El porcentaje de cambio en los datos indicados en las Figuras 12A-I y 13A-H se calculó entre el grupo de tratamiento y el grupo de control sin normalización a niveles de línea basal.

Se determinaron los niveles de IgE libre usando un procedimiento de ELISA humano en el que se recubrieron placas de ELISA de 384 pocillos Maxisorp (Nalge Nunc International, Rochester, NY) con anticuerpo monoclonal MAE11 1 μ g/ml en tampón de carbonato 50 mM, pH 9,6, a 4 °C durante una noche y se bloquearon con albúmina de suero bovino 0,5 %, en PBS a temperatura ambiente durante 1 hora. Se incubaron patrones (0,098-12,5 ng/ml) y diluciones seriadas triples de muestras (dilución mínima 1:10 para evitar cualquier efecto del suero) en PBS que contenía albúmina de suero bovino 0,5 %, polisorbato 20 0,05 %, 10 partes por millón de Proclin 300 (Supelco, Bellefonte, PA), CHAPS 0,25 % (Sigma, St. Louis, MO), g globulinas bovinas 0,2 % (Biocell, Rancho Dominguez, CA) y EDTA 5 mM en las placas a temperatura ambiente durante 1 hora. Se detectó el IgE unido incubando anticuerpo de cabra anti IgE humano marcado con peroxidasa (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) en los pocillos durante 1 hora. Se añadió el sustrato 3,3',5,5'-tetrametil bencidina (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) y se detuvo la reacción añadiendo ácido fosfórico 1 M. Las placas se lavaron entre etapas. La absorbancia se leyó a 450 nm en un lector apilador Titertek (ICN, Costa Mesa, CA). La curva patrón se ajustó usando un programa de ajuste de curvas de regresión no lineal de cuatro parámetros (desarrollado en Genentech). Se usaron puntos de datos que quedaban en el intervalo lineal de la curva convencional para calcular la concentración de IgE en muestras.

El panel de isotipos de inmunoglobulina humana se realizó tomando anticuerpo monoclonal de ratón (mAb) para IgG1 humano (clon 2C11. Abcam Inc., Cambridge, MA), se diluyó a 4 μ g/ml en tampón de carbonato sódico 0,05 M, pH 9,6, y se usó para recubrir placas de ELISA (placas de alta unión, 384 pocillos, Greiner Bio One, Monroe, NC) durante una incubación de una noche a 4 °C. Después de lavar 3 veces con tampón de lavado (PBS / Tween-20 0,05 %), las placas se bloquearon con PBS / albúmina de suero bovino 0,5 % (BSA) durante 1 a 2 horas. Esta y todas las demás incubaciones se realizaron a temperatura ambiente en un agitador orbital. Se diluyeron muestras de suero de ratón 1:100 seguido de diluciones 1:3 en serie usando tampón de ensayo (PBS / BSA 0,5 % / Tween 20 0,05 % / CHAPS 0,25 % / EDTA 5 mM / Proclin 15 PPM). Usando el mismo tampón, se prepararon diluciones en serie de IgG1 para la curva patrón (12,20-1560 ng/ml). Se descongelaron controles congelados prediluidos en las regiones alta, media y baja de la curva patrón. Después de la etapa de bloqueo, las placas se lavaron y las muestras, patrones y controles se añadieron a las placas de 384 pocillos y se incubaron durante 2 horas. Las placas se lavaron y se diluyó mAb de ratón biotinilado para IgG1 humano (Zymed Laboratories, South San Francisco, CA) 1:500 en tampón de ensayo y se añadió a las placas lavadas para incubación de 1 hora. Se diluyó peroxidasa de rábano rusticano-estreptavidina (SA-HRP) (GE Healthcare, Piscataway, NJ) 1:40.000 en tampón de ensayo y se añadió a las placas después de lavar. Después de una incubación de 30 minutos y una etapa de lavado final, se añadió tetrametil bencidina (TMB) (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) y se desarrolló el color durante 10 a 15 minutos. La reacción se detuvo añadiendo ácido fosfórico 1 M. La densidad óptica se obtuvo usando un lector de microplacas (longitudes de onda de referencia 450 nm, 650 nm) y las concentraciones de muestra se calcularon a partir de ajustes de 4 parámetros de las curvas patrón. La concentración cuantificable mínima de IgG1 humano en las muestras de suero de ratón fue de 1,22 μ g/ml.

Este método de ELISA general descrito anteriormente también se usó para el análisis de los otros isotipos de Ig.

IgG2

Se recubrieron placas de ELISA con mAb anti IgG2 humano de ratón (específico de cadena γ_2) (Southern Biotech, Birmingham, AL) a 4 $\mu\text{g/ml}$. El intervalo de curva patrón de IgG2 humano fue de 12,20-1560 ng/ml. Se diluyó mAb anti IgG2 humano de ratón biotinilado (específico de cadena γ_2) (Southern Biotech) a 0,5 $\mu\text{g/ml}$ y se usó como el anticuerpo de detección. Se añadió SA-HRP a las placas de 384 pocillos a una dilución 1:10.000. La concentración cuantificable mínima de IgG2 humano en las muestras de suero de ratón fue de 1,22 $\mu\text{g/ml}$.

IgG3

Se diluyó mAb anti IgG3 humano de ratón (Zymed Laboratories) a 1 $\mu\text{g/ml}$ y se usó para recubrir placas de ELISA. El intervalo de curva patrón de IgG3 humano fue de 0,78-100 ng/ml. Se diluyó mAb anti IgG3 humano de ratón biotinilado (específico de cadena γ_3) (Southern Biotech) a 0,1 $\mu\text{g/ml}$ y se usó como el anticuerpo de detección. Se añadió SA-HRP a las placas de 384 pocillos a una dilución 1:20.000. La concentración cuantificable mínima de IgG3 humano en las muestras de suero de ratón fue de 78,1 ng/ml.

IgG4

Se diluyó mAb anti IgG4 humano de ratón purificado (BD Pharmingen, San Jose, CA) a 0,25 $\mu\text{g/ml}$ y se usó para recubrir placas de ELISA. El intervalo de curva patrón de IgG4 humano fue de 0,20-25 ng/ml. Se diluyó mAb anti IgG4 humano de ratón conjugado con biotina (BD Pharmingen) a 0,25 $\mu\text{g/ml}$ y se usó como el anticuerpo de detección. Se añadió SA-HRP a las placas de 384 pocillos a una dilución 1:20.000. La concentración cuantificable mínima de IgG4 humano en las muestras de suero de ratón fue de 39,1 ng/ml.

IgA

Se diluyó mAb anti IgA₁/A₂ humano de ratón purificado (BD Pharmingen) a 2 $\mu\text{g/ml}$ y se usó para recubrir placas de ELISA. El intervalo de curva patrón de IgA humano fue de 0,20-25 ng/ml. Se diluyó mAb anti IgA₁/A₂ humano de ratón conjugado con biotina (BD Pharmingen) a 1 $\mu\text{g/ml}$ y se usó como el anticuerpo de detección. Se añadió SA-HRP a las placas de 384 pocillos a una dilución 1:80.000. La concentración cuantificable mínima de IgA humano en las muestras de suero de ratón fue de 39,1 ng/ml.

IgM

Se diluyó mAb anti IgM humano de ratón purificado (BD Pharmingen) a 0,5 $\mu\text{g/ml}$ y se usó para recubrir placas de ELISA. El intervalo de curva patrón de IgM humano fue de 0,78-100 ng/ml. Se diluyó mAb anti IgM humano de ratón conjugado con biotina (BD Pharmingen) a 0,5 $\mu\text{g/ml}$ y se usó como el anticuerpo de detección. Se añadió SA-HRP a las placas de 384 pocillos a una dilución 1:40.000. La concentración cuantificable mínima de IgM humano en las muestras de suero de ratón fue de 156 ng/ml.

Se contaron esplenocitos Hu-SCID, esplenocitos de ratón o células de ganglios linfáticos usando microesferas Fluoresbrite YG (Polysciences, Inc. N° 18862) en un Citómetro de Flujo FACS Calibur (BD (San Jose, CA)).

Se usaron ensayos de Elispot para determinar la frecuencia de células plasmáticas productoras de IgE en ratones hu-SCID después del tratamiento con rhIL-4, anticuerpos anti-IFN γ y anti IL-12 durante 15 días. Se recubrieron placas de Elispot (Millipore, Billerica, MA, N° MSIPS4510, transparentes) con una dilución 1:500 de anticuerpo anti IgE humano no conjugado primario (AXXORA, San Diego, CA, N° BET-A80-108A) en tampón de recubrimiento [Genentech, Inc. (A3323)] a 100 $\mu\text{l/pocillo}$ durante una noche a 4 °C. Después se decantó la solución de anticuerpo primario y las placas se lavaron dos veces con tampón de lavado (PBS 1X, Tween-20 0,05 %). Las membranas se bloquearon con 200 $\mu\text{l/pocillo}$ de BSA 0,5 % en PBS 1X durante 0,5-1 hora a 37 °C. Se retiró la solución de bloqueo y se añadieron células de control positivo o esplenocitos hu-SCID a la placa. La línea celular de mieloma humano U266 productora de IgE (ATCC, Manassas, VA, N° TIB196) se usó como un control positivo para el ensayo. Se añadieron células U266 a la placa comenzando a una concentración de 3000 células/0,1 ml (=0,032 x 10⁶/ml) de medio de hibridoma [RPMI 1640, suero bovino Fetal 15 %, L-glutamina 2 mM, HEPES 10 mM, glucosa 4,5 g/l, bicarbonato 1,5 g/l], después se realizaron siete diluciones en serie (1:2). Se resuspendieron suspensiones de células individuales de bazo completo en 1 ml. Se añadieron 100 μl al primer pocillo. Se realizaron después siete diluciones en serie (1:2). Se incubaron células U266 de hibridoma y de bazo durante una noche a 37 °C. Al día siguiente las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado (PBS 1X, Tween-20 0,05 %) y después se añadieron 100 $\mu\text{l/pocillo}$ del anticuerpo secundario, anti IgE humano conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma, St. Louis, MO, A-3525) a 1:2000 en BSA 0,5 %/PBS 1X a cada pocillo y se incubaron a 37 °C durante 2 horas. Las placas se lavaron tres veces y después se aclararon una vez con ddH₂O (Genentech, Inc.). Se añadieron 100 $\mu\text{l/pocillo}$ de solución BCIP/NBT (R&D Systems, Minneapolis, MN, Módulo de Color Azul de Elispot, N° SEL002) a cada pocillo y se incubó en oscuridad durante 30 minutos. Las placas se aclararon después con ddH₂O una vez y se permitió que la placa se secase a temperatura ambiente. Las placas se enviaron a BD Biosciences para su recuento (BD, Inc., Franklin Lakes, NJ). Se calculó el número de células plasmáticas usando el número de puntos detectados,

factor de dilución (aportación de célula), y el recuento de células del bazo total.

Se prepararon células plasmáticas humanas retirando los bazos el día 15 de ratones hu-SCID tratados con anticuerpo. Se prepararon suspensiones celulares individuales y se filtraron. Se bloquearon 5×10^6 células con suero humano (Sigma, St. Louis, MO, N° S-2257) y de ratón (VWR, N° RLD108-0100) y después se tiñeron con anticuerpos anti CD38 humano PE (BD Biosciences, San Jose, CA, N° 555460) y anti PC humano FITC (Dakocytomation, Glostrup, Dinamarca, N° K2311) en tampón de lavado de FACS (FBS 2 %, PBS 1X) en hielo durante 20 minutos. Las células se lavaron después y se analizaron en una máquina FACS Calibur (BD, Inc., Franklin Lakes, NJ). Se usó la expresión de CD38 humano como un control positivo para transferencia de PBMC humanas exitosa. Las células plasmáticas se definieron como CD38 alto, PC+.

En el experimento N° 07-0377 (Figura 12A), se ensayaron tres anticuerpos anti IgE/M1' (47H4, 26A11 y 7A6) frente a control de isotipo anti gp120-mulG1. Los ratones tratados con control de isotipo generaron altos niveles de IgE humano el día 9. El tratamiento con candidatos anti IgE/M1' redujo los niveles de IgE en 65-84 % (Figuras 12 B-C). El tratamiento con anti IgE/M1' también redujo las células productoras de IgE *in vivo* en 19-69 % (Figura 12D-E). Otros Ig en suero se vieron relativamente poco afectados por el tratamiento con anti IgE/M1' (se observaron reducciones de ~30 % con algunos anticuerpos anti M1' para hulG1, IgG3 e IgG4 (Figura 12F-G). No se observó reducción en el porcentaje de células plasmáticas totales del bazo con tratamiento anti IgE/M1' (Figura 12H-I).

En el experimento N° 07-1232 (Figura 13A), se ensayó un anti IgE/M1' humanizado (47H4v5) frente a anticuerpo de control de isotipo HERCEPTIN®-hulG1. Los ratones tratados con control de isotipo generaron altos niveles de IgE en suero el día 8. El tratamiento con hulG1 anti IgE/M1' redujo los niveles de IgE en 79 % (Figura 13B-D) y las células plasmáticas productoras de IgE en 75 % (Figura 13C-D). No se observó reducción en otros Ig en suero (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA) (Figura 13E-F) o el porcentaje de células plasmáticas totales en el bazo (Figura 13G-H). Estos estudios demuestran que los anticuerpos anti IgE/M1' reducen específicamente el IgE en suero y células productoras de IgE, pero no las inmunoglobulinas de otros isotipos.

EJEMPLO 10

Ratones transgénicos para M1' humano

Generación de ratones "knockin" transgénicos para huM1

Dado que los ratones normalmente no expresan un dominio M1' similar al de seres humanos, los inventores generaron ratones con el dominio M1' humano "introducido en" el locus de IgE de ratón (Figura 14A). La secuencia M1' humana usa el sitio aceptor de corte y empalme de M1 de ratón cadena arriba y después se fusiona con la secuencia M1 de ratón cadena abajo (Figura 14B). También se introdujo un casete IRES-EGFPpA - Neo en 3' de la secuencia M2 de ratón. Esta introducción permitirá la expresión de IgE de ratón con el dominio M1' humano en la superficie de linfocitos B IgE+. La secuencia M1' no se expresará en IgE secretado.

Exploración de líneas con introducción de M1' (PCR)

Se genotiparon ratones con introducción de M1' humano por PCR usando cebadores específicos para el locus de IgE de ratón y secuencia M1' humano. Los cebadores usados fueron los siguientes:

WT DIR 5'-GGCCAAAGACCCTAAGACAGTC (SEC ID N°: 106)
huM1' DIR 5'-GGGCTGGCTGGCGGCTCCGC (SEC ID N°: 107)
WT INV 5'-CTATGCCCTGGTCTGGAAGATG (SEC ID N°: 108)

Se analizó el ADN genómico purificado con los cebadores anteriores usando 32 ciclos del siguiente programa [94 °C 4 min; 94 °C 1 min; 60 °C 30 s; 72 °C 1 min (30 ciclos); 72 °C 10 min]. Los productos de PCR se procesaron después en un gel de agarosa 2 % TBE 0,5X. El genotipo de PCR de tipo silvestre dio un producto de 668 pb y la introducción de hu-M1' generó un producto de 457 pb (Figura 14C).

Exploración de líneas con introducción de M1' (Southern)

Se exploraron líneas de ratón final y células ES con introducción de huM1' y se verificaron por transferencia de Southern. Se digirieron 10 µg de ADN genómico de la cola o de células ES purificado con HindIII para la rama izquierda o BamHI para la rama derecha durante una noche. Después se procesó el ADN digerido en un gel de Agarosa 0,8 % TAE 1X. Después se transfirió el ADN a una membrana de nylon (Roche N° 1417240) usando tampón de desnaturalización (NaCl 1,5 M; NaOH 0,5 M) durante una noche. La membrana se aclaró, se entrecruzó con UV y después se empapó en solución DIG Easy Hyb (Roche N° 1585762) durante 4 horas con rotación a 46 °C. Se generaron sondas por PCR usando el Kit de Síntesis de sondas PCR DIG como se indica por el fabricante (Roche N° 11636090910).

Los cebadores para la rama izquierda fueron:

DIR 5'-TGTCTGGTGGTGGACCTGGAAAGCG (SEC ID N°: 109)
Inv 5'-TCCTCGCTCTCCTGCTCTGGTGGTG (SEC ID N°: 110)

Los cebadores para la rama derecha fueron:

DIR 5'-CCATGCAACCTAGTATCCTATTCTC (SEC ID N°: 111)
Inv 5'-CTTTATACAGGAGAACCTAGCCCAG (SEC ID N°: 112)

Las sondas se ensayaron frente a producto de PCR no marcado para asegurar el tamaño aumentado y buen marcaje de DIG. Después las transferencias se exploraron durante una noche con sonda hervida durante una noche a 46 °C con rotación. Al día siguiente las transferencias se lavaron y se desarrollaron con anticuerpo anti DIG de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las transferencias se expusieron a película durante 15-20 minutos. LA Figura 14D ilustra con resultados de southern. Los ratones de tipo silvestre generaron un fragmento de rama izquierda de HindIII de 7,4 kB que se convierte en un fragmento de 3 kB en el alelo con introducción de hu-M1'. Los ratones de tipo silvestre generaron un fragmento de rama derecha de BamHI de 14,1 kB que se convierte en un fragmento de 18,1 kB en el alelo con introducción de huM1'. Se muestran los ratones de tipo silvestre y heterocigotos (Figura 14D).

EJEMPLO 11

Modelo transgénico de Hu-M1': inmunización con TNP-OVA

Este ejemplo ilustra la capacidad de los candidatos anti IgE/M1' para prevenir la generación de IgE resultante estimulada por TNP-OVA en una respuesta primaria inmunitaria (Exp. N° 07-0234F; Figuras 15A-I) o respuesta inmunitaria de respuesta de memoria (Exp. N° 07-0234B; Figuras 16A-K) a TNP-OVA. La TNP-OVA o trinitrofenil-ovoalbúmina es un inmunógeno muy potente usado con frecuencia para generar respuestas inmunitarias de anticuerpo potentes.

Los datos se expresan como la media $\pm$ Desviación Típica. Los p valores se calcularon usando software de estadística JMP. El ensayo de Dunnett compara medias de grupos en las que todos los grupos se han ensayado frente a un grupo de referencia. La t de Student de Cada Par compara cada par de grupos usando ensayos de t de Student. Se aplica después una Corrección de Bonferroni para ajustar los p valores de la t de Student de Cada Par para proteger frente a comparaciones por pares. El umbral de todos los p valores es 0,05. El porcentaje de cambio en los datos presentados para respuesta primaria (Figuras 15A-I) y la respuesta inmunitaria de memoria (Figuras A-K) se calculó restando el valor medio del grupo no infectado o no inmunizado de cada uno de los valores de ratón, se recalcularon las medias de grupo y se calculó después el porcentaje de cambio frente al grupo de control para cada punto temporal.

La inmunización con TNP-OVA de ratones con introducción de IgE/M1' humano (C57BL/6) induce una respuesta a Th1/Th2 equilibrada *in vivo*. Los niveles de IgE específico de antígeno después de inmunización primaria y exposición alcanzan niveles de ~10-200 ng/ml. En el experimento N° 07-0234F, se inmunizaron ratones con introducción de huM1' (C57B1/6) con TNP-OVA (Biosearch Technologies, Novato, CA) (100 μ g en 2 mg de alumbre por ratón i.p.) el día 0 (Figura 15A). Después los ratones se trataron con anticuerpos 0,1 mg/kg tres veces por semana entre los días 0 y 28 (Figura 15A). En el experimento N° 07-0234B, se inmunizó a los ratones con introducción de huM1' (C57B1/6) con TNP-OVA/Alumbre el día 0 (como antes) y después se expusieron a TNP-OVA (100 μ g por ratón i.p.) el día 28 (Figura 16A). Los ratones se trataron con anticuerpos 10 mg/kg entre los días 28 y 49 (Figura 16A). Se tomaron muestras sanguíneas de los ratones durante el transcurso de la respuesta inmunitaria para controlar los niveles de IgG1 e IgE en suero específico de antígeno.

Se midió IgG1 de IgE específicos de TNP-OVA usando placas de ELISA (384 pocillos con superficie de MaxiSorp™, Nunc, Neptune, NJ) recubiertas durante 12-18 horas a 2 – 8 °C con TNP-OVA 25 μ l/pocillo (relación de TNP:OVA de 13:1) (Biosearch Technologies, Novato, CA) diluido a 0,5 μ g/ml en carbonato/bicarbonato sódico 50 mM, pH 9,6. Después se decantaron las placas y se secaron por transferencia. Se añadió tampón de bloqueo (PBS, BSA 0,5 %, pH 7,2, 50 μ l/pocillo) a las placas durante 1 - 2 horas. Esta y todas las incubaciones posteriores se realizaron a temperatura ambiente con agitación suave. Las muestras se diluyeron 1/50 en diluyente de ensayo (PBS, BSA 0.5 %, Tween-20 0,05 %, Proclin 300 0,01 %) seguido de diluciones en serie 1/3 sobre once puntos. Los patrones se diluyeron en serie dos veces en diluyente de ensayo sobre siete puntos, comenzando a 1 ng/ml para IgG1 anti TNP OVA y 3 ng/ml para IgE anti TNP OVA. Las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado (PBS, Tween-20 0,05 %, pH 7,2) y se añadieron patrones, muestras y controles (25 μ l/pocillo) para duplicar las placas para la detección separada de isotipos IgG1 e IgE. Después de una incubación de 1,5-2 horas, las placas se lavaron seis veces con tampón de lavado. Se diluyeron mAb anti IgG1 e IgE de ratón de rata biotinilados (BD Biosciences, San Diego, CA) a 0,5 μ g/ml para IgG1 o 1,0 μ g/ml para IgE en diluyente de ensayo y se añadieron a las placas apropiadas (25 μ l/pocillo). Las placas se incubaron durante 1-1,5 horas y se lavaron seis veces con tampón de

lavado. Se diluyó conjugado con peroxidasa de rábano rusticano-Estreptavidina (AMDEX, GE Healthcare, Piscataway, NJ) 1/80.000 para IgG1 o 1/5.000 para IgE y se añadió a las placas (25 µl/pocillo) durante 30 minutos. Después de lavar seis veces con tampón de lavado, las placas se desarrollaron añadiendo tetrametil bencidina 25 µl/pocillo (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) e incubando durante 15 minutos para IgG1 o 25 minutos para IgE. La reacción se detuvo mediante la adición de 25 µl/pocillo de H₃PO₄ 1 M, y la absorbancia se leyó a 450 nm con una referencia de 620 nm. Los resultados de muestras desconocidas se interpolaron de ajustes de 4 parámetros de las curvas patrón.

Se identificaron en primer lugar células plasmáticas de ratón del bazo o ganglios linfáticos separando células CD138+. Estas células plasmáticas productoras de IgE se cuantificaron mediante el método de Elispot. Para células productoras de IgE totales, se recubrieron placas MultiScreen HTS (Millipore N° MS1PS4W10) con anticuerpo anti IgE (del conjunto de mIgE BD OptEIA N° 555248) a una dilución de 1:2 usando tampón de recubrimiento de ELISA a 50 µl por pocillo. Se realizó recubrimiento a 4 °C durante una noche. A la mañana siguiente se lavaron las placas 5 veces con 200 µl de PBS-tween 20 estéril (0,05 %) usando una pipeta multicanal en la campana de cultivo tisular. Las placas se bloquearon después en 300 µl de PBS / BSA 5 % o medio de cultivo celular (RPMI-1640, FBS 10 %) durante dos horas a temperatura ambiente. Se prepararon suspensiones celulares sencillas a partir del bazo o el ganglio linfático y las células se contaron por FACS (como se ha indicado anteriormente). Las células se prepararon para sembrar en placa, comenzando con 10⁷ células seguido de diluciones 3-4 veces para modelos de inmunización de TNP-OVA, o 4 x 10⁶ células seguido de diluciones 2 veces para los modelos de infección por *Nippostrongylus*. Se usó la línea de linfocitos B A20 de ratón como un control negativo y se usó la línea celular TIB-141 como un control positivo. Se prepararon diluciones en serie en medio de cultivo celular (RPMI-1640 + FBS 10 %). Después de la etapa de bloqueo las placas se lavaron una vez con medio de cultivo celular y se aspiraron. Las células se sembraron en placas en 100 µl por pocillo. Las placas se incubaron después durante una noche a 37 °C, CO₂ 5 %. Al día siguiente las placas se lavaron 6 veces usando un SkanWasher 300 (Molecular Devices (Sunnyvale, CA)) con PBS-tween 20 (0,05 %). Después se usó un anticuerpo secundario biotinilado del conjunto de mIgE BD OptEIA (N° 555248) a la concentración indicada por el fabricante, habitualmente entre 1:250 y 1:500 en 100 µl/pocillo. El anticuerpo secundario se preparó en PBS / BSA 1%. Las placas se incubaron después durante 1 hora a temperatura ambiente y después se lavaron 6 veces usando un SkanWasher300 con PBS-tween 20 (0,05 %). Después se añadió Estreptavidina AP (R&D N° SEL002) a una dilución de 1:60 en 100 µl por pocillo, se preparó de nuevo en PBS / BSA 1 %, y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron después como antes 3 veces y después se aclararon dos veces con agua DI. Se retiró por transferencia cualquier líquido restante en una toalla de papel. Después se añadió el reactivo de desarrollo, BCIP/NBT (100 µl/pocillo), y las placas se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Después se decantó el sustrato y las placas se aclararon dos veces con agua DI. Las placas se invirtieron para retirar cualquier exceso de agua y se permitió que se secaran. Se cuantificaron los puntos usando un microscopio de disección.

El experimento N° 07-0234F ensayó la capacidad de anti IgE/M1' para prevenir una respuesta de IgE a inmunización primaria con TNP-OVA. Los ratones tratados con control de isotipo anti gp120 generaron IgE en suero, alcanzando niveles máximos entre el día 8 y el 14 (~25 ng/ml) (Figura 15B). El tratamiento con anti IgE/M1' evitó el aumento de IgE en suero el día 8 (98 %) y 14 (99 %) (Figura 15C-D). Esta reducción fue significativamente diferente de los animales tratados con isotipo, y no significativamente diferente de los ratones no inmunizados (Figuras 15C-E). Los niveles de IgG1 específico de antígeno se vieron afectados de forma solamente modesta por anti IgE/M1' durante los 28 días del experimento (Figuras 15F-I).

El experimento N° 07-0234B ensayó la capacidad de anti IgE/M1' para prevenir una respuesta de IgE de memoria/secundaria a TNP-OVA. La respuesta de IgE secundaria a refuerzo con TNP-OVA el día 28 es más rápida, alcanzando un máximo después de 4 días en lugar de 8-9 días en la respuesta primaria (Figura 16B). El tratamiento con candidatos anti IgE/M1' comenzando con el refuerzo el día 28 redujo el aumento de IgE entre los días 28 y 35 (Figura 16B). Los niveles de IgE tratados con anti IgE/M1' se redujeron significativamente en comparación con el control de isotipo, 59-75 % el día 32 y 90-93 % el día 35 (Figuras 16C-D). El día 35-42 los niveles de IgE no eran significativamente diferentes de los ratones no inmunizados (Figura 16E). El análisis del área bajo curva de estos grupos de tratamiento entre los días 28 y 49 demuestra adicionalmente que el anti IgE/M1' redujo los niveles de IgE en suero en 74-84 %, y el nivel diario medio de IgE específico de antígeno también se redujo en 74-83 % (Figuras 16F-H). No se observó reducción significativa en IgG1 específico de antígeno después de tratamiento con anti IgE/M1' (Figuras 16I-K).

EJEMPLO 12

Modelo transgénico de Hu-M1': modelo de infección de *Nippostrongylus brasiliensis*

Este ejemplo ilustra la capacidad de los anticuerpos anti IgE/M1' para prevenir la producción de IgE (Figuras 17A-D), así como reducir terapéuticamente la producción de IgE en una infección por *Nippostrongylus brasiliensis* inducida previamente. La reducción de la producción de IgE se evaluó mediante la administración de anticuerpos anti IgE/M1' tanto a niveles de IgE máximos de respuesta inmunitaria (Figuras 18A-I), como cuando se aplicó tarde en la respuesta inmunitaria (Figuras 19A-G).

Nippostrongylus brasiliensis es un nematodo gastrointestinal que infecta ratas y ratones. Sus huevos eclosionan en las heces y maduran a larvas de estado infeccioso L3. Las larvas L3 entran en el hospedador a través de la piel y migran a los vasos sanguíneos, y después viajan al pulmón después de uno a dos días. Después de desarrollarse a larvas de estadio L4 en el pulmón, viajan a lo largo de la tráquea del hospedador y el esófago y alcanzan el yeyuno el día 2 a 3. Las larvas maduran a gusanos adultos y se reproducen, y producen huevos en torno al día 5. Los huevos de *N. brasiliensis* se excretan de los hospedadores junto con las heces.

Los ratones infectados con *N. brasiliensis* demuestran una respuesta inmunitaria innata inicial, seguido de inmunidad de tipo 2 fuerte para eliminar la infección. Se encuentra deposición de complemento y fibronectina en el estadio temprano de la infección para facilitar reclutamiento y adherencia de leucocitos. Se reclutan células efectoras, tales como eosinófilos, basófilos y linfocitos Th2 CD4⁺ al pulmón para luchar contra la infección. Las citocinas de Th2, IL-4 e IL-13, desempeñan un papel esencial en el mantenimiento de la respuesta inmunitaria en el pulmón, y se requieren para eliminación de gusanos en el intestino. Las respuestas de tipo 2 se caracterizan por altos niveles de producción de anticuerpos, incluyendo IgE.

Los ratones con introducción de IgE/M1' humano (G57BL/6) generan una fuerte respuesta de IgE a infección por *N. brasiliensis* alcanzando un máximo el día 15-20 (Figuras 17B, 18B, 19B). Después los niveles de IgE en suero descienden hasta un nivel inferior, pero elevado mantenido. Los ratones se infectaron con *Nippostrongylus brasiliensis* el día 0. Los tres experimentos de infección por *N. brasiliensis* se trataron con anticuerpos mIgG1 anti IgE/M1' 10 mg/kg o control de isotipo mIgG1 anti gp120. En el estudio de prevención (Figura 17A), se trataron ratones con introducción de huM1' tres veces por semana comenzando el día 0 hasta el día 21. En el estudio de producción máxima (Figura 18A), los ratones con introducción de huM1' se trataron tres veces por semana entre los días 11 y 21. En el estudio de intervención tardía (Figura 19A), se trataron ratones con introducción de huM1' tres veces por semana entre los días 41 y 62.

Los datos se expresan como la media $\pm$ Desviación Típica. Los p valores se calcularon usando software de estadística JMP. El ensayo de Dunnett compara las medias de grupos en las que todos los grupos de ensayo se ensayan frente a un grupo de referencia. La t de Student de Cada Par compara cada par de grupos usando ensayo de t de Student. Después se aplica una Corrección de Bonferroni para ajustar los p valores de la t de Student de Cada Par para proteger contra comparaciones por pares. El umbral de todos los p valores es 0,05. El porcentaje de cambio en los datos indicados en los estudios de producción máxima y preventivos se calculó restando el valor medio de grupos no infectados o no inmunizados de cada uno de los valores de ratón, las medias de grupo se recalcularon y después se calculó el porcentaje de cambio frente al grupo de control para cada punto temporal. En el estudio de intervención tardía, se calculó el porcentaje de cambio dentro de cada grupo de tratamiento comparando los días 48 y 55 con el día 41.

Las células plasmáticas productoras de IgE se definieron y evaluaron por Elispot como se ha descrito previamente en el Ejemplo 12.

El estudio preventivo ensayó la capacidad de anti IgE/M1' para prevenir el aumento en IgE en respuesta a una infección por *Nippostrongylus* primaria. Los ratones del control (tratados con isotipo) alcanzaron altos niveles de producción de IgE el día 15 después de la infección (~3000 ng/ml). Los ratones tratados con anti IgE/M1' tuvieron producción de IgE reducida después de la infección (reducida 93-94 % en comparación con mIgG1 anti gp120) que no era significativamente diferente de los ratones no infectados (Figuras 17B-D).

El estudio de producción máxima ensayó la capacidad de anti IgE/M1' para reducir los niveles de IgE terapéuticamente en el máximo de la respuesta de IgE a infección por *N. brasiliensis*. Todos los grupos de tratamiento alcanzaron altos niveles de IgE (~2000 ng/ml) el día 11 después de infección por *Nippostrongylus* (Figura 18B). El tratamiento con anti IgE/M1' comenzó el día 11 al máximo de esta respuesta. Los candidatos mIgG1 anti IgE/M1' redujeron los niveles de IgE en suero en 82-89 % a los cuatro días del tratamiento (Figura 18C-D). Para el día 21, los niveles de IgE en ratones tratados con anti IgE/M1' se redujeron en 97- 98 %, alcanzando niveles que no son estadísticamente diferentes del grupo de control no infectado (Figura 18E). Se cuantificaron células plasmáticas productoras de IgE por Elispot anti IgE. La infección por *N. brasiliensis* indujo números significativos de células productoras de IgE tanto en el ganglio linfático mesentérico (~30 células por 4×10^6 ; Figura 18F) como en el bazo (~10 células por 4×10^6 ; Figura 18G). Para el día 21 el tratamiento con anti IgE/M1' redujo las células productoras de IgE en el ganglio linfático mesentérico en 88-94 % y en el bazo en 57-66 %. La frecuencia de células plasmáticas totales (células CD138+) en el ganglio linfático mesentérico y el bazo aumentó en todos los grupos de tratamiento en comparación con ratones no infectados, y no hubo cambios significativos en la frecuencia de células plasmáticas totales en ninguno de los órganos debido a tratamiento con anti IgE/M1' (Figura 18H-I). Estos resultados demuestran la capacidad de los anticuerpos anti IgE/M1' para reducir IgE en suero a niveles nominales agotando las células productoras de IgE *in vivo*, incluso cuando se aplicaron al nivel máximo de producción de IgE.

El estudio de intervención tardía ensayó la capacidad de anti IgE/M1' para reducir el IgE mantenido a bajo nivel que se consigue en una fase tardía del ciclo de infección. Todos los grupos de tratamiento alcanzaron el máximo de producción de IgE aproximadamente el día 15. Tras el inicio del tratamiento con anti IgE/M1' el día 41, hubo algunas

diferencias en los niveles de IgE en suero entre los grupos de tratamiento (Figuras 19B-C), que se normalizaron por referencia a los niveles del día 41 como 100 % (Figura 19D). El tratamiento con anti IgE/M1' redujo significativamente los niveles de IgE en suero en comparación con el control de isotipo mIgG1 anti gp120 entre los días 48 y 55 (Figura 19E-G). Para el día 48 y 55 los niveles de IgE se redujeron 64-75 % y 75-84 %, respectivamente, en comparación con el control de isotipo (mIgG1 anti gp120) que se redujo 20 % y 37 %, respectivamente (Figuras 19F-G). La diferencia en los niveles de IgE medios entre los grupos de tratamiento no fue significativamente diferente del grupo de control de isotipo (gp120) antes del comienzo de la terapia con anti IgE/M1' (Figura 19E). Sin embargo, el tratamiento con anticuerpos anti IgE/M1' mostró una reducción más drástica y significativa en los niveles de IgE en suero que la observada en el grupo de control el día 48 (Figura 19F) y Día 55 (Figura 19G). Se calculó el porcentaje de cambio y p valor (d41) comparando cada grupo de tratamiento los días 48 o 55 con el valor de partida del mismo grupo el día 41 antes del tratamiento.

EJEMPLO 13

Expresión de anticuerpo anti IgE/M1' en células de mamífero

Este ejemplo ilustra la preparación de formas potencialmente glucosiladas de la proteína o el anticuerpo deseado por expresión recombinante en células de mamífero.

El vector, pRK5 (véase documento EP 307.247, publicado el 15 de marzo de 1989), se emplea como el vector de expresión. Opcionalmente, el ADN que codifica la cadena ligera y/o pesada del anticuerpo anti IgE/M1' se liga en pRK5 con enzimas de restricción seleccionadas para permitir la inserción de dicho ADN usando métodos de ligamiento tal como se describe en Sambrook *et al.*, mencionado anteriormente.

En una realización, las células hospedadoras seleccionadas pueden ser células 293. Se cultivan células 293 humanas (ATCC CCL 1573) hasta la confluencia en placas de cultivo tisular en medio tal como DMEM complementado con suero de ternero fetal y opcionalmente componentes nutrientes y/o antibióticos. Se mezclan aproximadamente 10 µg de ADN que codifica el anticuerpo anti IgE/M1' ligado en pRK5 con aproximadamente 1 µg de ADN que codifica el gen de ARN de VA [Thimmappaya *et al.*, Cell, 31: 543 (1982)] y se disuelve en 500 µl de Tris-HCl 1 mM, EDTA 0,1 mM, CaCl₂ 0,227 M. A esta mezcla se añade, en gotas, 500 µl de HEPES 50 mM (pH 7,35), NaCl 280 mM, NaPO₄ 1,5 mM y se permite que se forme un precipitado durante 10 minutos a 25 °C. El precipitado se suspende y se añade a las células 293 y se permite que sedimente durante aproximadamente cuatro horas a 37 °C. El medio de cultivo se retira por aspirado y se añaden 2 ml de glicerol 20 % en PBS durante 30 segundos. Después se lavan las células 293 con medio sin suero, se añade medio nuevo y las células se incuban durante aproximadamente 5 días.

Aproximadamente 24 horas después de las transfecciones, se retira el medio de cultivo y se reemplaza con medio de cultivo (solo) o medio de cultivo que contiene ³⁵S-cisteína 200 µCi/ml y ³⁵S-metionina 200 µCi/ml. Después de una incubación de 12 horas, se recoge el medio acondicionado, se concentra en un filtro de agitación, y se carga en un gel de SDS al 15 %. El gel procesado puede secarse y exponerse a película durante un periodo de tiempo seleccionado para revelar la presencia del anticuerpo anti IgE/M1'. Los cultivos que contienen células transfectadas pueden someterse a incubación adicional (en medio sin suero) y el medio se ensaya en bioensayos seleccionados.

En una técnica alternativa, el anticuerpo anti IgE/M1' puede introducirse en células 293 de forma transitoria usando el método de dextrán sulfato descrito en Somparyrac *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., 12: 7575 (1981). Se cultivan células 293 hasta densidad máxima en un matraz de agitación y se añaden 700 µg de ADN que codifica el anticuerpo anti IgE/M1' ligado en pRK5. Las células se concentran en primer lugar del matraz de agitación por centrifugación y se lavan con PBS. El precipitado de dextrano-ADN se incuba en el sedimento celular durante cuatro horas. Las células se tratan con glicerol al 20 % durante 90 segundos, se lavan con medio de cultivo tisular y se vuelven a introducir en el matraz de agitación que contiene medio de cultivo tisular, insulina bovina 5 µg/ml y transferrina bovina 0,1 µg/ml. Después de aproximadamente cuatro días, el medio acondicionado se centrifuga y se filtra para retirar las células y los residuos. La muestra que contiene el anticuerpo anti IgE/M1' expresado puede después concentrarse y purificarse por cualquier método seleccionado, tal como diálisis y/o cromatografía en columna.

En otra realización, el anticuerpo anti IgE/M1' puede expresarse en células CHO. El ADN que codifica el anticuerpo anti IgE/M1' ligado en pRK5 puede transfectarse en células CHO usando reactivos conocidos tales como CaPO₄ o DEAE-dextrano. Como se ha descrito anteriormente, los cultivos celulares pueden incubarse, y el medio reemplazarse con medio de cultivo (solo) o medio que contiene un radiomarcador tal como ³⁵S-metionina. Después de determinar la presencia del anticuerpo anti IgE/M1', el medio de cultivo puede reemplazarse con medio sin suero. Preferentemente, los cultivos se incuban durante aproximadamente 6 días, y después se recoge el medio acondicionado. El medio que contiene el anticuerpo anti IgE/M1' expresado puede después concentrarse y purificarse por cualquier método seleccionado.

También pueden expresarse variantes marcadas con epítipo del anticuerpo anti IgE/M1' en células hospedadoras CHO. El ADN que codifica el anticuerpo anti IgE/M1' ligado en pRK5 puede subclonarse del vector pRK55. El inserto de subclón puede someterse a PCR para fusionar en fase con un marcador epitópico seleccionado tal como un marcador de poli his en un vector de expresión de Baculovirus. El ADN marcado con poli his que codifica el inserto del anticuerpo anti IgE/M1' puede después subclonarse en un vector conducido por SV40 que contiene un marcador de selección tal como DHFR para selección de clones estables. Finalmente, las células CHO pueden transfectarse (como se ha descrito anteriormente) con el vector conducido por SV40. Puede realizarse marcaje, como se ha descrito anteriormente, para verificar la expresión. El medio de cultivo que contiene el anticuerpo anti IgE/M1' marcado con poli his expresado puede después concentrarse y purificarse por cualquier método seleccionado, tal como por cromatografía de afinidad de quelado de Ni^{2+} .

El anticuerpo anti IgE/M1' también puede expresarse en células CHO y/o COS por un procedimiento de expresión transitoria o en células CHO por otro procedimiento de expresión estable.

Se realiza expresión estable en células CHO usando el siguiente procedimiento. Las proteínas se expresan como una construcción de IgG (inmunoadhesina), en la que las secuencias codificantes para las formas solubles (por ejemplo los dominios extracelulares) de las proteínas respectivas se fusionan con una secuencia de región constante de TgG1 que contiene los dominios bisagra, CH2 y CH2 y/o es una forma marcada con poli His.

Después de la amplificación por PCR, los ADN respectivos se subclonan en un vector de expresión de CHO usando técnicas convencionales como se describe en Ausubel *et al.*, Current Protocols of Molecular Biology, Unidad 3.16, John Wiley and Sons (1997). Se construyen vectores de expresión de CHO para tener sitios de restricción compatibles 5' y 3' del ADN de interés para permitir la redistribución conveniente de ADNc. El vector usado en la expresión en células CHO es como se describe en Lucas *et al.*, Nucl. Acids Res. 24: 9 (1774-1779 (1996)), y usa el potenciador/promotor temprano de SV40 para conducir la expresión del ADNc de interés y dihidrofolato reductasa (DHFR). La expresión de DHFR permite la selección para mantenimiento estable del plásmido después de transfección.

Se introducen 12 μg del ADN plasmídico deseado en aproximadamente 10 millones de células CHO usando reactivos de transfección disponibles en el mercado SUPERFECT[®] (Quiagen), DOSPER[®] o FUGENE[®] (Boehringer Mannheim). Las células se cultivan como se describe en Lucas *et al.*, mencionado anteriormente. Se congelan aproximadamente 3×10^7 células en una ampolla para cultivo adicional y producción como se describe posteriormente.

Las ampollas que contienen el ADN plasmídico se descongelan colocándolas en un baño de agua y se mezclan por agitación vorticial. Los contenidos se pipetea en un tubo de centrifuga que contiene 10 ml de medio y se centrifugan a 1000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se aspira y las células se resuspenden en 10 ml de medio selectivo (PS20 filtrado a 0,2 μm con suero bovino fetal diafiltrado a 0,2 μm 5 %). Las células se separan después en alícuotas en un centrifugador de 100 ml que contiene 90 ml de medio selectivo. Después de 1-2 días, las células se transfieren a un centrifugador de 250 ml cargado con 150 ml de medio de cultivo selectivo y se incuban a 37 °C. Después de otros 2-3 días, se siembran centrifugadores de 250 ml, 500 ml y 2000 ml con 3×10^5 células/ml. El medio celular se intercambia con medio nuevo por centrifugación y resuspensión en medio de producción. Aunque pueden emplearse medios de CHO adecuados, puede de hecho usarse un medio de producción descrito en la Patente de Estados Unidos N° 5.122.469, presentada el 16 de junio de 1992. Se siembra un centrifugador de producción de 3 l a $1,2 \times 10^6$ células/ml. El día 0, se determina el número de células y pH. El día 1, se toman muestras del centrifugador y se inicia el rociado con aire filtrado. El día 2, se toman muestras del centrifugador, la temperatura se desplaza a 33 °C, y se toman 30 ml de glucosa 500 g/l y 0,6 ml de antiespumante 10 % (por ejemplo, emulsión de polidimetilsiloxano 35 %, Emulsión de Uso Médico de Dow Coming 365). Durante la producción, el pH se ajusta según sea necesario para mantenerlo a aproximadamente 7,2. Después de 10 días, o hasta que la viabilidad descienda por debajo de 70 %, el cultivo celular se recoge por centrifugación y se filtra a través de un filtro de 0,22 μm . El filtrado se almacena a 4 °C o se carga inmediatamente en columnas para purificación.

Para las construcciones marcadas con poli His, las proteínas se purifican usando una columna Ni-NTA (Qiagen). Antes de la purificación, se añade imidazol al medio acondicionado a una concentración de 5 mM. El medio acondicionado se bombea en una columna de Ni-NTA de 6 ml equilibrada a 4 °C, en Hepes 20 mM, pH 7,4, tampón que contiene NaCl 0,3 M e imidazol 5 mM a un caudal de 4-5 ml/min. Después de cargar, la columna se lava con tampón de equilibrio adicional y la proteína se eluye con tampón de equilibrio que contiene imidazol 0,25 M. La proteína altamente purificada se desala posteriormente en un tampón de almacenamiento que contiene Hepes 10 mM, NaCl 0,14 M y manitol 4 %, pH 6,8, con una columna Superfina G25 de 25 ml (Pharmacia) y se almacena a -80 °C.

Se purifican construcciones de inmunoadhesina (que contienen Fc) del medio acondicionado de la siguiente manera. El medio acondicionado se bombea en una columna de Proteína A de 5 ml (Pharmacia) que se había equilibrado en tampón de fosfato sódico 20 mM, pH 6,8. Después de cargar, la columna se lava exhaustivamente con tampón de equilibrio antes de elución con ácido cítrico 100 mM, pH 3,5. La proteína eluida se neutraliza inmediatamente recogiendo fracciones de 1 ml en tubos que contienen 275 μl de tampón Tris 1 M, pH 9. La proteína altamente

purificada se desala posteriormente en tampón de almacenamiento como se ha descrito anteriormente para las proteínas marcadas con poli His. La homogeneidad se evalúa por geles de poliacrilamida de SDS y por secuenciación de aminoácidos N terminal por degradación de Edman.

5 Depósito de material

Los siguientes materiales se han depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, Estados Unidos (ATCC):

Material	Nº de Depósito de ATCC	Fecha del Depósito
7A6.18	PTA-8268	21 de marzo de 2007
1C11.10.20	PTA-8267	21 de marzo de 2007
47G4.6.2	PTA-8266	21 de marzo de 2007
47H4.12.10	PTA-8270	21 de marzo de 2007
42H4.6.9	PTA-8260	21 de marzo de 2007
42A5.20.11	PTA-8265	21 de marzo de 2007
26A11.6.5	PTA-8262	21 de marzo de 2007
51D2.22.15	PTA-8264	21 de marzo de 2007
45C1.6.14	PTA-8269	21 de marzo de 2007
26B11.3.12	PTA-8261	21 de marzo de 2007
28E9.12.9	PTA-8263	21 de marzo de 2007

Estos depósitos se realizaron según las provisiones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para el Fin del Procedimiento de Patente y las Regulaciones del mismo (Tratado de Budapest). Esto asegura el mantenimiento de un cultivo viable de los depósitos durante treinta (30) años desde la fecha de los depósitos, y al menos cinco (5) años después de la petición más reciente de una muestra. Los depósitos se pondrán a disposición por la ATCC según los términos del Tratado de Budapest, y sometido a un acuerdo entre Genentech, Inc. y ATCC, que asegure la disponibilidad permanente y sin restricciones de la descendencia del cultivo del depósito al público tras la emisión de la patente de Estados Unidos pertinente o tras la apertura al público de cualquier solicitud de patente de Estados Unidos o extranjera, lo que suceda en primer lugar, y asegura la disponibilidad de la descendencia a alguien que el comisario de Patentes y Marcas de Estados Unidos ha determinado que tiene derecho a ello de acuerdo con 35 USC § 122 y las normas del Comisario conforme a ello (incluyendo 37 CFR § 1.14 con particular referencia a 886 OG 638).

El cesionario de la presente solicitud ha acordado que si un cultivo de los materiales en depósito muriera o se perdiera o destruyera cuando se cultive en condiciones adecuadas, los materiales se reemplazarán inmediatamente tras la notificación con otro igual. La disponibilidad del material depositado no debe interpretarse como una licencia para practicar la invención en contravención de los derechos garantizados bajo la autoridad de cualquier gobierno de acuerdo con sus leyes de patente.

Se considera que la anterior descripción escrita es suficiente para permitir a un experto en la materia practicar la invención. La presente invención no se limita en alcance por el ejemplo presentado en el presente documento. De hecho, diversas modificaciones de la invención además de las mostradas y descritas en el presente documento resultarán evidentes para los expertos en la materia a partir de la descripción anterior.

Listado de Secuencias

<110> Genentech, Inc.
Wu, Lawren
Balazs, Mercedesz
Bright bill, Hans
Chan, Andrew C.
Chen, Yvonne Man-yee
Chunt har apai, Anan
Dennis, Mark
Wong, Terence

<120> Anticuerpos anti-IgE Apoptóticos

<130> P2474R1 WO

<141> 21-03-2008

<150> US 60/ 896.339

<151> 22-03-2007

<160> 112

<210> 1

<211> 431

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> Otro...

<223> IgE humano

<400> 1

```

I l e  L e u  G l n  S e r  S e r  O y s  A s p  G l y  G l y  G l y  H i s  P h e  P r o  P r o  T h r
  1      5      10
I l e  G l n  L e u  L e u  O y s  L e u  V a l  S e r  G l y  T y r  T h r  P r o  G l y  T h r  I l e
      20      25      30
A s n  I l e  T h r  T r p  L e u  G l u  A s p  G l y  G l n  V a l  M e t  A s p  V a l  A s p  L e u
      35      40      45
S e r  T h r  A l a  S e r  T h r  T h r  G l n  G l u  G l y  G l u  L e u  A l a  S e r  T h r  G l n
      50      55      60
S e r  G l u  L e u  T h r  L e u  S e r  G l n  L y s  H i s  T r p  L e u  S e r  A s p  A r g  T h r
      65      70      75
T y r  T h r  O y s  G l n  V a l  T h r  T y r  G l n  G l y  H i s  T h r  P h e  G l u  A s p  S e r
      80      85      90
T h r  L y s  L y s  O y s  A l a  A s p  S e r  A s n  P r o  A r g  G l y  V a l  S e r  A l a  T y r
      95     100     105
L e u  S e r  A r g  P r o  S e r  P r o  P h e  A s p  L e u  P h e  I l e  A r g  L y s  S e r  P r o
      110     115     120
T h r  I l e  T h r  O y s  L e u  V a l  V a l  A s p  L e u  A l a  P r o  S e r  L y s  G l y  T h r
      125     130     135
V a l  A s n  L e u  T h r  T r p  S e r  A r g  A l a  S e r  G l y  L y s  P r o  V a l  A s n  H i s
      140     145     150
S e r  T h r  A r g  L y s  G l u  G l u  L y s  G l n  A r g  A s n  G l y  T h r  L e u  T h r  V a l
      155     160     165
T h r  S e r  T h r  L e u  P r o  V a l  G l y  T h r  A r g  A s p  T r p  I l e  G l u  G l y  G l u
      170     175     180

```

Thr	Tyr	Gln	Oys	Arg 185	Val	Thr	His	Pro	His 190	Leu	Pro	Arg	Ala	Leu 195
Met	Arg	Ser	Thr	Thr 200	Lys	Thr	Ser	Gly	Pro 205	Arg	Ala	Ala	Pro	Glu 210
Val	Tyr	Ala	Phe	Ala 215	Thr	Pro	Glu	Trp	Pro 220	Gly	Ser	Arg	Asp	Lys 225
Arg	Thr	Leu	Ala	Oys 230	Leu	Ile	Gln	Asn	Phe 235	Met	Pro	Glu	Asp	Ile 240
Ser	Val	Gln	Trp	Leu 245	His	Asn	Glu	Val	Gln 250	Leu	Pro	Asp	Ala	Arg 255
His	Ser	Thr	Thr	Gln 260	Pro	Arg	Lys	Thr	Lys 265	Gly	Ser	Gly	Phe	Phe 270
Val	Phe	Ser	Arg	Leu 275	Glu	Val	Thr	Arg	Ala 280	Glu	Trp	Glu	Gln	Lys 285
Asp	Glu	Phe	Ile	Oys 290	Arg	Ala	Val	His	Glu 295	Ala	Ala	Ser	Pro	Ser 300
Gln	Thr	Val	Gln	Arg 305	Ala	Val	Ser	Val	Asn 310	Pro	Gly	Leu	Ala	Gly 315
Gly	Ser	Ala	Gln	Ser 320	Gln	Arg	Ala	Pro	Asp 325	Arg	Val	Leu	Oys	His 330
Ser	Gly	Gln	Gln	Gln 335	Gly	Leu	Pro	Arg	Ala 340	Ala	Gly	Gly	Ser	Val 345
Pro	His	Pro	Arg	Oys 350	His	Oys	Gly	Ala	Gly 355	Arg	Ala	Asp	Trp	Pro 360
Gly	Pro	Pro	Glu	Leu 365	Asp	Val	Oys	Val	Glu 370	Glu	Ala	Glu	Gly	Glu 375
Ala	Pro	Trp	Thr	Trp 380	Thr	Gly	Leu	Oys	Ile 385	Phe	Ala	Ala	Leu	Phe 390
Leu	Leu	Ser	Val	Ser 395	Tyr	Ser	Ala	Ala	Leu 400	Thr	Leu	Leu	Met	Val 405
Gln	Arg	Phe	Leu	Ser 410	Ala	Thr	Arg	Gln	Gly 415	Arg	Pro	Gln	Thr	Ser 420
Leu	Asp	Tyr	Thr	Asn 425	Val	Leu	Gln	Pro	His 430	Ala				

<210> 2

<211> 432

5

<212> PRT

<213> *Macaca mulatta*

<220>

10

<221> Otro...

<223> IgE de rhesus

<400> 2

ES 2 478 242 T3

Ile	Leu	Gln	Ser	Ser	Oys	Asp	Asp	Asp	Gly	His	Phe	Pro	Pro	Thr
1				5					10					15
Ile	Gln	Leu	Leu	Oys	Leu	Ile	Ser	Gly	Tyr	Thr	Pro	Gly	Ala	Ile
				20					25					30

Asn	Val	Thr	Trp	Leu 35	Glu	Asn	Gly	Gln	Val 40	Met	Lys	Val	Asn	Ser 45
Pro	Thr	Pro	Pro	Ala 50	Thr	Gln	Glu	Gly	Glu 55	Leu	Ala	Ser	Thr	Gln 60
Ser	Glu	Phe	Thr	Leu 65	Ala	Gln	Lys	His	Trp 70	Leu	Ser	Asp	Arg	Thr 75
Tyr	Thr	Oys	Gln	Val 80	Thr	Tyr	Gln	Gly	Thr 85	Thr	Tyr	Asn	Asp	Ser 90
Thr	Lys	Lys	Oys	Ala 95	Asp	Ser	Asn	Pro	Arg 100	Gly	Val	Ser	Ala	Tyr 105
Leu	Ser	Arg	Pro	Ser 110	Pro	Phe	Asp	Leu	Phe 115	Ile	Ser	Lys	Ser	Pro 120
Thr	Ile	Thr	Oys	Leu 125	Val	Val	Asp	Leu	Ala 130	Pro	Ser	Lys	Glu	Thr 135
Val	Asn	Leu	Thr	Trp 140	Ser	Arg	Ala	Ser	Gly 145	Lys	Pro	Val	Pro	His 150
Ile	Pro	Ala	Thr	Glu 155	Lys	Lys	Gln	Gln	Arg 160	Asn	Gly	Thr	Leu	Thr 165
Val	Thr	Ser	Ile	Leu 170	Pro	Val	Val	Thr	Gln 175	Asp	Trp	Ile	Glu	Gly 180
Glu	Thr	Tyr	Gln	Oys 185	Arg	Val	Thr	His	Pro 190	His	Leu	Pro	Arg	Ala 195
Leu	Val	Arg	Ser	Met 200	Thr	Lys	Thr	Ser	Gly 205	Pro	Arg	Ala	Ala	Pro 210
Glu	Val	Tyr	Val	Phe 215	Ala	Thr	Pro	Glu	Lys 220	Leu	Glu	Ser	Arg	Asp 225
Lys	Arg	Thr	Leu	Ala 230	Oys	Leu	Ile	Gln	Asn 235	Phe	Met	Pro	Glu	Asp 240
Ile	Ser	Val	Gln	Trp 245	Leu	His	Ser	Asp	Val 250	Gln	Leu	Pro	Asp	Ala 255
Arg	His	Ser	Val	Thr 260	Gln	Pro	Arg	Lys	Thr 265	Lys	Gly	Ser	Gly	Phe 270
Phe	Val	Phe	Ser	Arg 275	Leu	Glu	Val	Thr	Lys 280	Ala	Glu	Trp	Glu	Gln 285
Lys	Asp	Glu	Phe	Ile 290	Oys	Arg	Ala	Val	His 295	Glu	Ala	Ala	Ser	Pro 300
Ser	Trp	Ile	Val	Gln 305	Gln	Ala	Val	Ser	Val 310	Asn	Pro	Gly	Leu	Ala 315
Gly	Gly	Ser	Ala	Gln 320	Ser	Gln	Arg	Ala	Pro 325	Asp	Arg	Val	Leu	Oys 330
His	Ser	Glu	Gln	Gln 335	Gln	Gly	Leu	Pro	Arg 340	Ala	Ala	Arg	Gly	Ser 345
Val	Pro	Asp	His	His 350	Oys	His	Oys	Gly	Ala 355	Gly	Arg	Ala	Asp	Trp 360
Pro	Gly	Leu	Pro	Glu 365	Leu	Asp	Leu	Oys	Val 370	Glu	Glu	Ala	Glu	Ser 375

ES 2 478 242 T3

Glu	Val	Leu	Trp	Thr	Trp	Thr	Gly	Leu	Cys	Ile	Phe	Ala	Thr	Leu
				380					385					390
Phe	Leu	Leu	Ser	Val	Ser	Tyr	Ser	Ala	Ala	Ile	Thr	Leu	Leu	Met
				395					400					405
Val	Gln	Arg	Phe	Leu	Ser	Ala	Thr	Arg	Gln	Gly	Arg	Pro	Gln	Thr
				410					415					420
Ser	Leu	Asp	Tyr	Thr	Asn	Val	Leu	Gln	Pro	His	Ala			
				425					430					

<210> 3
 <211> 431
 <212> PRT
 <213> *Macaca fascicularis*

<220>
 <221> Otro...
 <223> IgE de cyno

<400> 3

Ile	Leu	Gln	Ser	Ser	Oys	Asp	Asp	Asp	Gly	His	Phe	Pro	Pro	Thr	1	5	10	15
Ile	Gln	Leu	Leu	Oys	Leu	Ile	Ser	Gly	Tyr	Thr	Pro	Gly	Ala	Ile	20	25	30	
Asn	Val	Thr	Trp	Leu	Glu	Asn	Gly	Gln	Val	Met	Lys	Val	Asn	Ser	35	40	45	
Pro	Thr	Pro	Pro	Ala	Thr	Gln	Glu	Gly	Glu	Leu	Ala	Ser	Thr	Gln	50	55	60	
Ser	Glu	Phe	Thr	Leu	Ala	Gln	Lys	His	Trp	Leu	Ser	Asp	Arg	Thr	65	70	75	
Tyr	Thr	Oys	Gln	Val	Thr	Tyr	Gln	Gly	Thr	Thr	Tyr	Asn	Asp	Ser	80	85	90	
Thr	Lys	Lys	Oys	Ala	Asn	Ser	Asn	Pro	Arg	Gly	Val	Ser	Ala	Tyr	95	100	105	
Leu	Ser	Arg	Pro	Ser	Pro	Phe	Asp	Leu	Phe	Ile	Ser	Lys	Ser	Pro	110	115	120	
Thr	Ile	Thr	Oys	Leu	Val	Val	Asp	Leu	Ala	Pro	Ser	Lys	Glu	Thr	125	130	135	
Val	Asn	Leu	Thr	Trp	Ser	Arg	Ala	Ser	Gly	Lys	Pro	Val	Pro	His	140	145	150	
Thr	Pro	Ala	Thr	Glu	Lys	Lys	Gln	Arg	Asn	Gly	Thr	Leu	Thr	Val	155	160	165	
Thr	Ser	Ile	Leu	Pro	Val	Val	Thr	Gln	Asp	Trp	Ile	Glu	Gly	Glu	170	175	180	
Thr	Tyr	Gln	Oys	Arg	Val	Thr	His	Pro	His	Leu	Pro	Arg	Ala	Leu	185	190	195	
Val	Arg	Ser	Met	Thr	Lys	Thr	Ser	Gly	Pro	Arg	Ala	Ala	Pro	Glu	200	205	210	
Val	Tyr	Val	Phe	Ala	Thr	Pro	Glu	Lys	Leu	Glu	Ser	Arg	Asp	Lys	215	220	225	
Arg	Thr	Leu	Ala	Oys	Leu	Ile	Gln	Asn	Phe	Met	Pro	Glu	Asp	Ile				

				230						235				240
Ser	Val	Gln	Trp	Leu 245	His	Ser	Asp	Val	Gln 250	Leu	Pro	Asp	Ala	Arg 255
His	Ser	Val	Thr	Gln 260	Pro	Arg	Lys	Thr	Lys 265	Gly	Ser	Gly	Phe	Phe 270
Val	Thr	Ser	Arg	Leu 275	Glu	Val	Thr	Lys	Ala 280	Glu	Trp	Glu	Gln	Lys 285
Asp	Glu	Phe	Ile	Gln 290	Arg	Ala	Val	His	Glu 295	Ala	Ala	Ser	Pro	Ser 300
Trp	Ile	Val	Gln	Gln 305	Ala	Val	Ser	Val	Asn 310	Pro	Gly	Leu	Ala	Gly 315
Gly	Ser	Ala	Gln	Ser 320	Gln	Arg	Ala	Pro	Asp 325	Arg	Val	Leu	Gln	His 330
Ser	Glu	Gln	Gln	Gln 335	Gly	Leu	Pro	Arg	Ala 340	Ala	Arg	Gly	Ser	Val 345
Pro	Asp	His	Arg	Gln 350	His	Gln	Gly	Ala	Gly 355	Arg	Ala	Asp	Trp	Pro 360
Gly	Leu	Pro	Glu	Leu 365	Asp	Leu	Gln	Val	Glu 370	Glu	Ala	Glu	Ser	Glu 375
Val	Leu	Trp	Thr	Trp 380	Thr	Gly	Leu	Gln	Ile 385	Phe	Ala	Thr	Leu	Phe 390
Leu	Leu	Ser	Val	Ser 395	Tyr	Ser	Ala	Ala	Ile 400	Thr	Leu	Leu	Met	Val 405
Gln	Arg	Phe	Leu	Ser 410	Val	Thr	Arg	Gln	Gly 415	Arg	Pro	Gln	Thr	Ser 420
Leu	Asp	Tyr	Thr	Asn 425	Ile	Leu	Gln	Pro	His 430	Ala				

<210> 4
 <211> 104
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> Otro...
 <223> fragmento de IgE humano

<400> 4

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

<210> 5
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> péptido M1' 1

<400> 5

Ala Ser Pro Ser Gln Thr Val Gln Arg Ala Val Ser Val Asn Pro
 1 5 10 15

<210> 6
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> péptido M1' 2

<400> 6

Thr Val Gln Arg Ala Val Ser Val Asn Pro Gly Leu Ala Gly Gly
 1 5 10 15

<210> 7
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> péptido M1' 3

<400> 7

Gly Leu Ala Gly Gly Ser Ala Gln Ser Gln Arg Ala Pro Asp Arg
 1 5 10 15

<210> 8
 <211> 15
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido M1' 4

5 <400> 8

Ser Ala Gln Ser Gln Arg Ala Pro Asp Arg Val Leu Cys His Ser
1 5 10 15

10 <210> 9
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> péptido M1' 5

<400> 9

Arg Ala Pro Asp Arg Val Leu Cys His Ser Gly Gln Gln Gln Gly
1 5 10 15

20 <210> 10
<211> 15
<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido M1' 6

30 <400> 10

Val Leu Cys His Ser Gly Gln Gln Gln Gly Leu Pro Arg Ala Ala
1 5 10 15

35 <210> 11
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> péptido M1' 7

<400> 11

Gly Gln Gln Gln Gly Leu Pro Arg Ala Ala Gly Gly Ser Val Pro
1 5 10 15

45 <210> 12
<211> 14
<212> PRT

50 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido M1' 8

<400> 12

55 Pro Arg Ala Ala Gly Gly Ser Val Pro His Pro Arg Cys His
5 10

5
 <210> 13
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> péptido M1' 9
 <400> 13
 Gly Gly Ser Val Pro His Pro Arg Cys His Cys Gly Ala Gly Arg
 1 5 10 15
 15
 <210> 14
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> péptido M1' 10
 <400> 14
 His Pro Arg Cys His Cys Gly Ala Gly Arg Ala Asp Trp Pro Gly
 1 5 10 15
 25
 <210> 15
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> péptido M1' 11
 <400> 15
 Cys Gly Ala Gly Arg Ala Asp Trp Pro Gly Pro Pro Glu Leu Asp
 1 5 10 15
 35
 <210> 16
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> péptido M1' 12
 <400> 16
 Ala Asp Trp Pro Gly Pro Pro Glu Leu Asp Val Cys Val Glu Glu
 1 5 10 15
 45
 <210> 17
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> péptido M1' 13
 <400> 17

	Pro	Pro	Glu	Leu	Asp	Val	Oys	Val	Glu	Glu	Ala	Glu	Gly	Glu	Ala
	1				5					10					15
5	<210> 18 <211> 15 <212> PRT <213> Secuencia artificial														
10	<220> <223> péptido M1' 14 <400> 18														
	Val	Oys	Val	Glu	Glu	Ala	Glu	Gly	Glu	Ala	Pro	Trp	Thr	Trp	Thr
	1				5					10					15
15	<210> 19 <211> 15 <212> PRT <213> Secuencia artificial														
20	<220> <223> péptido M1' 15 <400> 19														
25	Ala	Glu	Gly	Glu	Ala	Pro	Trp	Thr	Trp	Thr	Gly	Leu	Oys	Ile	Phe
	1				5					10					15
30	<210> 20 <211> 108 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i>														
35	<220> <221> Otro... <223> Cadena ligera de anticuerpo kappa I humano <400> 20														
	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val
	1				5					10					15
	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Oys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser
					20					25					30
	Asn	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys
					35					40					45
	Leu	Leu	Ile	Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Ser
					50					55					60
	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile
					65					70					75
	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Oys	Gln	Gln
					80					85					90
	Tyr	Asn	Ser	Leu	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu
					95					100					105
	Ile	Lys	Arg												

<210> 21
 <211> 108
 <212> PRT
 5 <213> *Mus musculus*
 <220>
 <221> Otro...
 10 <223> Cadena ligera de anticuerpo 26A11 murino
 <400> 21
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Asp Ile Ser
 20 25 30
 Asn Ser Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Pro Val Lys
 35 40 45
 Leu Leu Ile Tyr Ser Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile
 65 70 75
 Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Leu Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln
 80 85 90
 Gly His Thr Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu
 95 100 105
 Ile Lys Arg
 15 <210> 22
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Cadena ligera de anticuerpo 26A11 v1, 4 humanizado
 <400> 22

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

<210> 23
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cadena ligera de anticuerpo 26A11 v2, 5 humanizado

<400> 23

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

<210> 24
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cadena ligera de anticuerpo 26A11 V3, 6 humanizado

<400> 24

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

<210> 25
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cadena ligera de anticuerpo 26A11 V13, 15
 <400> 25

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

<210> 26
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cadena ligera de anticuerpo 26A11 V14, 16 humanizado

<400> 26

```

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

```

5 <210> 27
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

10 <220>
 <221> Otro...
 <223> Cadena ligera de anticuerpo 7A6 murino

15 <400> 27

```

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

```

20 <210> 28
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera de anticuerpo 7A6 V. 1 humanizado

<400> 28

5

```

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

      Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
                        110

```

<210> 29

<211> 113

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

10

<220>

<221> Otro...

<223> Cadena ligera de anticuerpo 47H4 humanizado

15

<400> 29

```

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

      Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
                        110

```

20

<210> 30

<211> 113

ES 2 478 242 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Cadena ligera de anticuerpo 47H4 V. 1, 3 humanizado

<400> 30

```

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

```

10

<210> 31

<211> 113

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera de anticuerpo 47H4 V. 24- 6 humanizado

<400> 31

20

```

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

```

<210> 32

<211> 113
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5 <220>
<221> Otro...
<223> Cadena pesada de anticuerpo humano III

10 <400> 32

```

G u Val G n Leu Val G u Ser G y G y G y Leu Val G n Pro G y
 1      5      10
G y Ser Leu Arg Leu Ser Oys Al a Al a Ser G y Phe Thr Phe Ser
      20      25
Ser Tyr Al a Met Ser Trp Val Arg G n Al a Pro G y Lys G y Leu
      35      40
G u Trp Val Ser Val Ile Ser G y Asp G y G y Ser Thr Tyr Tyr
      50      55
Al a Asp Ser Val Lys G y Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
      65      70
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu G n Met Asn Ser Leu Arg Al a Gl u Asp
      80      85
Thr Al a Val Tyr Tyr Oys Al a Arg G y Phe Asp Tyr Trp G y G n
      95     100     105
G y Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
  
```

110

15 <210> 33
<211> 112
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

20 <220>
<221> Otro...
<223> Cadena pesada de anticuerpo 26A11 murino

<400> 33

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

<210> 34
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cadena pesada de anticuerpo 26A11 V. 1-3, 13, 14 humanizado

<400> 34

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

<210> 35
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cadena pesada de anticuerpo 26A11 V. 4- 6, 15, 16 humanizado

<400> 35

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

5

<210> 36
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

10

<220>
 <221> Otro...
 <223> Cadena pesada de anticuerpo 7A6 murino
 <400> 36

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

15

Ser Ser

<210> 37
 <211> 122
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada de anticuerpo 7A6 V. humanizado

5

<400> 37

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

10

<210> 38

<211> 117

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

15

<220>

<221> Otro...

<223> Cadena pesada de anticuerpo 47H4 murino

20

<400> 38

G u Val Lys Leu Val G u Ser G y G y G y Leu Val G n Pro G y
 1 5 10 15
 G y Ser Arg Lys Leu Ser Oys Al a Al a Ser G y Phe Thr Phe Ser
 20 25 30
 Asp Tyr G y Met Al a Trp Val Arg G n Al a Pro G y Lys G y Pro
 35 40 45
 G u Trp Val Al a Phe Ile Ser Asp Leu Al a Tyr Thr Ile Tyr Tyr
 50 55 60
 Al a Asp Thr Val Thr G y Arg Phe Thr Ile Ser Arg G u Asn Al a
 65 70 75
 Lys Asn Thr Leu Tyr Leu G u Met Ser Ser Leu Arg Ser G u Asp
 80 85 90
 Thr Al a Leu Tyr Tyr Oys Al a Arg Asp Asn Trp Asp Al a Met Asp

95

100

105

Tyr Trp G y G n G y Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 110 115

<210> 39

<211> 117

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada de anticuerpo 47H4 V. 1,2 humanizado

<400> 39

G u Val G n Leu Val G u Ser G y G y G y Leu Val G n Pro G y
 1 5 10 15
 G y Ser Leu Arg Leu Ser Oys Al a Al a Ser G y Phe Thr Phe Ser
 20 25 30
 Asp Tyr G y Met Al a Trp Val Arg G n Al a Pro G y Lys G y Leu
 35 40 45
 G u Trp Val Al a Phe Ile Ser Asp Leu Al a Tyr Thr Ile Tyr Tyr
 50 55 60
 Al a Asp Thr Val Thr G y Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
 65 70 75
 Lys Asn Thr Leu Tyr Leu G n Met Asn Ser Leu Arg Al a G u Asp
 80 85 90
 Thr Al a Val Tyr Tyr Oys Al a Arg Asp Asn Trp Asp Al a Met Asp
 95 100 105
 Tyr Trp G y G n G y Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 110 115

<210> 40

<211> 117

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada de anticuerpo 47H4 V. 3,4 humanizado

<400> 40

```

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

```

5

110

115

<210> 41

<211> 117

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada de anticuerpo 47H4 V. 5 humanizado

15

<400> 41

```

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

```

<210> 42

20 <211> 117

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Cadena pesada de anticuerpo 47H4 V.6 humanizado

<400> 42

```

      G u Val  G n Leu Val  G u Ser  G y G y G y Leu Val  G n Pro G y
      1      5      10
      G y Ser  Leu Arg Leu Ser  Oys Al a Al a Ser  G y Phe Thr  Phe Ser
      20      25      30
      Asp Tyr  G y Met  Al a Trp Val  Arg G n Al a Pro  G y Lys G y Leu
      35      40      45
      G u Trp Val  Al a Phe Ile Ser  Asp Leu Al a Tyr  Thr  Ile Tyr  Tyr
      50      55      60
      Al a Asp Thr  Val  Thr  G y Arg Phe Thr  Ile Ser  Arg Asp Asn Ser
      65      70      75
      Lys Asn Thr  Leu Tyr  Leu G n Met  Asn Ser  Leu Arg Al a G u Asp
      80      85      90
      Thr Al a Val  Tyr Tyr  Oys Al a Arg Asp  Asn Trp Asp Al a Leu Asp
      95      100      105
      Tyr Trp G y G n G y Thr  Leu Val  Thr Val  Ser  Ser
      110      115
  
```

10 <211> 446

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<220>

15 <221> Otro...

<223> Longitud completa de cadena pesada de anticuerpo 7A6 murino

<400> 43

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Arg	Pro	Gly	15
1				5					10						
Ala	Ser	Val	Thr	Leu	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Ile	30
				20					25						
Asp	Tyr	Glu	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Thr	Pro	Val	His	Gly	Leu	45
				35					40						
Glu	Trp	Ile	Gly	Ala	Ile	Asp	Pro	Glu	Thr	Gly	Thr	Thr	Ala	Tyr	60
				50					55						
Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Ala	Lys	Ser	75
				65					70						
Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	90
				80					85						
Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Thr	Arg	Leu	Arg	Pro	His	Tyr	Asp	Tyr	105
				95					100						
Asp	Asn	Ala	Met	Asp	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	120
				110					115						
Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Tyr	Pro	Leu	Ala	Pro	135
				125					130						
Gly	Ser	Ala	Ala	Gln	Thr	Asn	Ser	Met	Val	Thr	Leu	Gly	Cys	Leu	150
				140					145						
Val	Lys	Gly	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Thr	Trp	Asn	Ser	165
				155					160						
Gly	Ser	Leu	Ser	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	180
				170					175						
Ser	Asp	Leu	Tyr	Thr	Leu	Ser	Ser	Ser	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	195
				185					190						
Thr	Trp	Pro	Ser	Glu	Thr	Val	Thr	Cys	Asn	Val	Ala	His	Pro	Ala	210
				200					205						
Ser	Ser	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Ile	Val	Pro	Arg	Asp	Cys	Gly	225
				215					220						
Cys	Lys	Pro	Cys	Ile	Cys	Thr	Val	Pro	Glu	Val	Ser	Ser	Val	Phe	240
				230					235						
Ile	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Val	Leu	Thr	Ile	Thr	Leu	Thr	255
				245					250						
Pro	Lys	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Ile	Ser	Lys	Asp	Asp	Pro	270
				260					265						
Glu	Val	Gln	Phe	Ser	Trp	Phe	Val	Asp	Asp	Val	Glu	Val	His	Thr	285
				275					280						
Ala	Gln	Thr	Gln	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	300
				290					295						

Ser	Val	Ser	Glu	Leu	Pro	Ile	Met	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly
				305					310					315
Lys	Glu	Phe	Lys	Cys	Arg	Val	Asn	Ser	Ala	Ala	Phe	Pro	Ala	Pro
				320					325					330
Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Arg	Pro	Lys	Ala	Pro
				335					340					345
Gln	Val	Tyr	Thr	Ile	Pro	Pro	Pro	Lys	Glu	Gln	Met	Ala	Lys	Asp
				350					355					360
Lys	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Met	Ile	Thr	Asp	Phe	Phe	Pro	Glu	Asp
				365					370					375
Ile	Thr	Val	Glu	Trp	Gln	Trp	Asn	Gly	Gln	Pro	Ala	Glu	Asn	Tyr
				380					385					390
Lys	Asn	Thr	Gln	Pro	Ile	Met	Asp	Thr	Asp	Gly	Ser	Tyr	Phe	Val
				395					400					405
Tyr	Ser	Lys	Leu	Asn	Val	Gln	Lys	Ser	Asn	Trp	Glu	Ala	Gly	Asn
				410					415					420
Thr	Phe	Thr	Cys	Ser	Val	Leu	His	Glu	Gly	Leu	His	Asn	His	His
				425					430					435
Thr	Glu	Lys	Ser	Leu	Ser	His	Ser	Pro	Gly	Lys				
				440					445					

<210> 44

<211> 220

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<220>

<221> Otro...

<223> Longitud completa de cadena pesada de anticuerpo 7A6 murino

<400> 44

ES 2 478 242 T3

Asp 1 Ile Val Met Ser 5 Gln Ser Pro Ser Ser 10 Leu Thr Val Ser Val 15
 Gly Glu Lys Val Thr 20 Leu Ser Oys Lys Ser 25 Ser Gln Thr Leu Leu 30
 Tyr Ser Thr Asn Gln 35 Lys Asn Tyr Leu Ala 40 Trp Tyr Gln Gln Lys 45
 Pro Gly Gln Ser Pro 50 Lys Leu Leu Ile Tyr 55 Trp Ala Ser Thr Arg 60
 Glu Ser Gly Val Pro 65 Asp Arg Phe Thr Gly 70 Ser Gly Ser Gly Thr 75
 Asp Phe Thr Leu Thr 80 Ile Ser Ser Val Lys 85 Ala Glu Asp Leu Ala 90
 Val Tyr Tyr Oys Gln 95 Gln Tyr Tyr Ser Tyr 100 Pro Tyr Thr Phe Gly 105
 Gly Gly Thr Lys Val 110 Glu Ile Lys Arg Ala 115 Asp Ala Ala Pro Thr 120
 Val Ser Ile Phe Pro 125 Pro Ser Ser Glu Gln 130 Leu Thr Ser Gly Gly 135
 Ala Ser Val Val Oys 140 Phe Leu Asn Asn Phe 145 Tyr Pro Lys Asp Ile 150
 Asn Val Lys Trp Lys 155 Ile Asp Gly Ser Glu 160 Arg Gln Asn Gly Val 165
 Leu Asn Ser Trp Thr 170 Asp Gln Asp Ser Lys 175 Asp Ser Thr Tyr Ser 180
 Met Ser Ser Thr Leu 185 Thr Leu Thr Lys Asp 190 Glu Tyr Glu Arg His 195
 Asn Ser Tyr Thr Oys 200 Glu Ala Thr His Lys 205 Thr Ser Thr Ser Pro 210
 Ile Val Lys Ser Phe 215 Asn Arg Asn Glu Oys 220

<210> 45

<211> 442

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<220>

<221> Otro...

<223> Longitud completa de cadena pesada de anticuerpo 47H4 murino

<400> 45

Glu	Val	Lys	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly
1				5					10					15
Gly	Ser	Arg	Lys	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser
				20					25					30
Asp	Tyr	Gly	Met	Ala	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Pro
				35					40					45
Glu	Trp	Val	Ala	Phe	Ile	Ser	Asp	Leu	Ala	Tyr	Thr	Ile	Tyr	Tyr
				50					55					60
Ala	Asp	Thr	Val	Thr	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Glu	Asn	Ala
				65					70					75
Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Glu	Met	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp
				80					85					90
Thr	Ala	Leu	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asp	Asn	Trp	Asp	Ala	Met	Asp
				95					100					105
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Lys	Thr
				110					115					120
Thr	Pro	Pro	Ser	Ser	Val	Tyr	Pro	Leu	Ala	Pro	Gly	Ser	Ala	Ala
				125					130					135
Gln	Thr	Asn	Ser	Met	Val	Thr	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Tyr
				140					145					150
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Thr	Trp	Asn	Ser	Gly	Ser	Leu	Ser
				155					160					165
Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Asp	Leu	Tyr
				170					175					180
Thr	Leu	Ser	Ser	Ser	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Thr	Trp	Pro	Ser
				185					190					195
Glu	Thr	Val	Thr	Cys	Asn	Val	Ala	His	Pro	Ala	Ser	Ser	Thr	Lys

	200	205	210
Val Asp Lys Lys	Ile Val Pro Arg Asp 215	Oys Gly Oys Lys Pro 220	Oys 225
Ile Oys Thr Val	Pro Glu Val Ser Ser 230	Val Phe Ile Phe Pro 235	Pro 240
Lys Pro Lys Asp	Val Leu Thr Ile Thr 245	Leu Thr Pro Lys Val 250	Thr 255
Oys Val Val Val	Asp Ile Ser Lys Asp 260	Asp Pro Glu Val Gln 265	Phe 270
Ser Trp Phe Val	Asp Asp Val Glu Val 275	His Thr Ala Gln Thr 280	Gln 285
Pro Arg Glu Glu	Gln Phe Asn Ser Thr 290	Phe Arg Ser Val Ser 295	Glu 300
Leu Pro Ile Met	His Gln Asp Trp Leu 305	Asn Gly Lys Glu Phe 310	Lys 315
Oys Arg Val Asn	Ser Ala Ala Phe Pro 320	Ala Pro Ile Glu Lys 325	Thr 330
Ile Ser Lys Thr	Lys Gly Arg Pro Lys 335	Ala Pro Gln Val Tyr 340	Thr 345
Ile Pro Pro Pro	Lys Glu Gln Met Ala 350	Lys Asp Lys Val Ser 355	Leu 360
Thr Oys Met Ile	Thr Asp Phe Phe Pro 365	Glu Asp Ile Thr Val 370	Glu 375
Trp Gln Trp Asn	Gly Gln Pro Ala Glu 380	Asn Tyr Lys Asn Thr 385	Gln 390
Pro Ile Met Asp	Thr Asp Gly Ser Tyr 395	Phe Val Tyr Ser Lys 400	Leu 405
Asn Val Gln Lys	Ser Asn Trp Glu Ala 410	Gly Asn Thr Phe Thr 415	Oys 420
Ser Val Leu His	Glu Gly Leu His Asn 425	His His Thr Glu Lys 430	Ser 435
Leu Ser His Ser	Pro Gly Lys 440		

<210> 46

<211> 219

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<220>

<221> Otro...

<223> Longitud completa de cadena ligera 47H4 murina

<400> 46

Asp Ile Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu
 1 5 10 15
 Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Oys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val
 20 25 30
 His Asn Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
 35 40 45
 Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 65 70 75
 Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Leu Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val
 80 85 90
 Tyr Phe Oys Ser Gln Asn Thr Leu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly
 95 100 105
 Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val
 110 115 120
 Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala
 125 130 135
 Ser Val Val Oys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn
 140 145 150
 Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu
 155 160 165
 Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met
 170 175 180
 Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn
 185 190 195
 Ser Tyr Thr Oys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile
 200 205 210
 Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Oys
 215

<210> 47

<211> 436

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<220>

<221> Otro...

<223> Longitud completa de cadena pesada de anticuerpo 26A11 murino

<400> 47

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

Thr	Leu	Val	Thr	Val 110	Ser	Ala	Ala	Ser	Thr 115	Thr	Pro	Pro	Ser	Val 120
Tyr	Pro	Leu	Ala	Pro 125	Gly	Ser	Ala	Ala	Gln 130	Thr	Asn	Ser	Met	Val 135
Thr	Leu	Gly	Oys	Leu 140	Val	Lys	Gly	Tyr	Phe 145	Pro	Glu	Pro	Val	Thr 150
Val	Thr	Trp	Asn	Ser 155	Gly	Ser	Leu	Ser	Ser 160	Gly	Val	His	Thr	Phe 165
Pro	Ala	Val	Leu	Gln 170	Ser	Asp	Leu	Tyr	Thr 175	Leu	Ser	Ser	Ser	Val 180
Thr	Val	Pro	Ser	Ser 185	Thr	Trp	Pro	Ser	Glu 190	Thr	Val	Thr	Oys	Asn 195
Val	Ala	His	Pro	Ala 200	Ser	Ser	Thr	Lys	Val 205	Asp	Lys	Lys	Ile	Val 210
Pro	Arg	Asp	Oys	Gly 215	Oys	Lys	Pro	Oys	Ile 220	Oys	Thr	Val	Pro	Glu 225
Val	Ser	Ser	Val	Phe 230	Ile	Phe	Pro	Pro	Lys 235	Pro	Lys	Asp	Val	Leu 240
Thr	Ile	Thr	Leu	Thr 245	Pro	Lys	Val	Thr	Oys 250	Val	Val	Val	Asp	Ile 255
Ser	Lys	Asp	Asp	Pro 260	Glu	Val	Gln	Phe	Ser 265	Trp	Phe	Val	Asp	Asp 270
Val	Glu	Val	His	Thr 275	Ala	Gln	Thr	Gln	Pro 280	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe 285
Asn	Ser	Thr	Phe	Arg 290	Ser	Val	Ser	Glu	Leu 295	Pro	Ile	Met	His	Gln 300
Asp	Trp	Leu	Asn	Gly 305	Lys	Glu	Phe	Lys	Oys 310	Arg	Val	Asn	Ser	Ala 315
Ala	Phe	Pro	Ala	Pro 320	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile 325	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly 330
Arg	Pro	Lys	Ala	Pro 335	Gln	Val	Tyr	Thr	Ile 340	Pro	Pro	Pro	Lys	Glu 345
Gln	Met	Ala	Lys	Asp 350	Lys	Val	Ser	Leu	Thr 355	Oys	Met	Ile	Thr	Asp 360
Phe	Phe	Pro	Glu	Asp 365	Ile	Thr	Val	Glu	Trp 370	Gln	Trp	Asn	Gly	Gln 375
Pro	Ala	Glu	Asn	Tyr 380	Lys	Asn	Thr	Gln	Pro 385	Ile	Met	Asp	Thr	Asp 390
Gly	Ser	Tyr	Phe	Val 395	Tyr	Ser	Lys	Leu	Asn 400	Val	Gln	Lys	Ser	Asn 405
Trp	Glu	Ala	Gly	Asn 410	Thr	Phe	Thr	Oys	Ser 415	Val	Leu	His	Glu	Gly 420
Leu	His	Asn	His	His 425	Thr	Glu	Lys	Ser	Leu 430	Ser	His	Ser	Pro	Gly 435

Lys

<210> 48
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5

<220>
 <221> Otro...
 <223> Longitud completa de cadena ligera de anticuerpo 26A11 murino

10

<400> 48

```

Asp Ile Gl n Met Thr Gl n Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu
 1          5          10
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Oys Arg Ser Ser Gl n Asp Ile Ser
 20          25          30
Asn Ser Leu Asn Trp Tyr Gl n Gl n Lys Pro Asp Gly Pro Val Lys
 35          40          45
Leu Leu Ile Tyr Ser Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser
 50          55          60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile
 65          70          75
Ser Asn Leu Gl u Gl n Gl u Asp Leu Ala Thr Tyr Phe Oys Gl n Gl n
 80          85          90
Gly His Thr Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Gl u
 95          100         105
Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro
 110         115         120
Ser Ser Gl u Gl n Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Oys Phe
 125         130         135
Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile
 140         145         150
Asp Gly Ser Gl u Arg Gl n Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp
 155         160         165
Gl n Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr
 170         175         180
Leu Thr Lys Asp Gl u Tyr Gl u Arg His Asn Ser Tyr Thr Oys Gl u
 185         190         195
Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn
 200         205         210
Arg Asn Gl u Oys

```

<210> 49
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

15

<220>
 <221> Otro...
 <223> Longitud completa de cadena pesada de anticuerpo 45C1 murino

20

<400> 49

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly
 1 5 10 15

Glu	Thr	Val	Lys	Ile	Ser	Gly	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	20	25	30
Asn	Tyr	Gly	Met	Asn	Trp	Val	Lys	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	35	40	45
Lys	Trp	Met	Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Tyr	Thr	Gly	Glu	Pro	Thr	Tyr	50	55	60
Val	Asp	Asp	Phe	Lys	Gly	Arg	Phe	Ala	Phe	Ser	Leu	Glu	Thr	Ser	65	70	75
Ala	Ser	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Ile	Asn	Asn	Leu	Lys	Asn	Glu	Asp	80	85	90
Met	Ala	Thr	Tyr	Phe	Gly	Ala	Arg	Gly	Ile	Tyr	Tyr	Asp	Asn	Asp	95	100	105
Asp	Ile	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ile	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	110	115	120
Lys	Thr	Thr	Ala	Pro	Ser	Val	Tyr	Pro	Leu	Ala	Pro	Val	Gly	Gly	125	130	135
Asp	Thr	Thr	Gly	Ser	Ser	Val	Thr	Leu	Gly	Gly	Leu	Val	Lys	Gly	140	145	150
Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Leu	Thr	Trp	Asn	Ser	Gly	Ser	Leu	155	160	165
Ser	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Asp	Leu	170	175	180
Tyr	Thr	Leu	Ser	Ser	Ser	Val	Thr	Val	Thr	Ser	Ser	Thr	Trp	Pro	185	190	195
Ser	Gln	Ser	Ile	Thr	Gly	Asn	Val	Ala	His	Pro	Ala	Ser	Ser	Thr	200	205	210
Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Ile	Glu	Pro	Arg	Gly	Pro	Thr	Ile	Lys	Pro	215	220	225
Gly	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Pro	Ala	Pro	Asn	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	230	235	240
Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Lys	Ile	Lys	Asp	Val	Leu	Met	Ile	245	250	255
Ser	Leu	Ser	Pro	Ile	Val	Thr	Gly	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Glu	260	265	270
Asp	Asp	Pro	Asp	Val	Gln	Ile	Ser	Trp	Phe	Val	Asn	Asn	Val	Glu	275	280	285
Val	His	Thr	Ala	Gln	Thr	Gln	Thr	His	Arg	Glu	Asp	Tyr	Asn	Ser	290	295	300
Thr	Leu	Arg	Val	Val	Ser	Ala	Leu	Pro	Ile	Gln	His	Gln	Asp	Trp	305	310	315
Met	Ser	Gly	Lys	Glu	Phe	Lys	Gly	Lys	Val	Asn	Asn	Lys	Asp	Leu	320	325	330
Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Arg	Thr	Ile	Ser	Lys	Pro	Lys	Gly	Ser	Val	335	340	345
Arg	Ala	Pro	Gln	Val	Tyr	Val	Leu	Pro	Pro	Pro	Glu	Glu	Glu	Met	350	355	360

Thr	Lys	Lys	Gln	Val	Thr	Leu	Thr	Oys	Met	Val	Thr	Asp	Phe	Met
				365					370					375
Pro	Glu	Asp	Ile	Tyr	Val	Glu	Trp	Thr	Asn	Asn	Gly	Lys	Thr	Glu
				380					385					390
Leu	Asn	Tyr	Lys	Asn	Thr	Glu	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser
				395					400					405
Tyr	Phe	Met	Tyr	Ser	Lys	Leu	Arg	Val	Glu	Lys	Lys	Asn	Trp	Val
				410					415					420
Glu	Arg	Asn	Ser	Tyr	Ser	Oys	Ser	Val	Val	His	Glu	Gly	Leu	His
				425					430					435
Asn	His	His	Thr	Thr	Lys	Ser	Phe	Ser	Arg	Thr	Pro	Gly	Lys	
				440					445					

<210> 50

<211> 219

5 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

<220>

<221> Otro...

10 <223> Longitud completa de cadena ligera de anticuerpo 45C1 murino

<400> 50

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile
 1 5 10 15
 Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Oys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu
 20 25 30
 Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro
 35 40 45
 Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp
 50 55 60
 Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 65 70 75
 Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val
 80 85 90
 Tyr Tyr Oys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro His Thr Phe Gly Gly
 95 100 105
 Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val
 110 115 120
 Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala
 125 130 135
 Ser Val Val Oys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn
 140 145 150
 Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu
 155 160 165
 Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met
 170 175 180
 Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn
 185 190 195
 Ser Tyr Thr Oys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile
 200 205 210
 Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Oys
 215

<210> 51
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<220>
 <221> Otro...

<223> Longitud completa de cadena pesada de anticuerpo 28E9 murino

<400> 51

Glu	Val	Lys	Leu	Val	Glu	Ser	Glu	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	1	5	10	15
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Gly	Ala	Thr	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Thr	20	25	30	
Asp	Tyr	Tyr	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Pro	Leu	35	40	45	
Glu	Trp	Leu	Gly	Phe	Ile	Ser	Asn	Lys	Leu	Asn	Gly	Tyr	Thr	Thr	50	55	60	
Glu	Tyr	Ser	Ser	Ser	Val	Gln	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	65	70	75	
Asp	Ser	Gln	Ser	Ile	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Thr	Leu	Arg	Pro	80	85	90	
Glu	Asp	Ser	Ala	Ala	Tyr	Tyr	Gly	Ala	Arg	Asp	Met	Val	Pro	Tyr	95	100	105	
Tyr	Tyr	Ala	Leu	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Ala	Val	110	115	120	
Ser	Ser	Ala	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Ser	Val	Tyr	Pro	Leu	Ala	Pro	125	130	135	
Gly	Ser	Ala	Ala	Gln	Thr	Asn	Ser	Met	Val	Thr	Leu	Gly	Gly	Leu	140	145	150	
Val	Lys	Gly	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Thr	Trp	Asn	Ser	155	160	165	
Gly	Ser	Leu	Ser	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	170	175	180	
Ser	Asp	Leu	Tyr	Thr	Leu	Ser	Ser	Ser	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	185	190	195	
Thr	Trp	Pro	Ser	Glu	Thr	Val	Thr	Gly	Asn	Val	Ala	His	Pro	Ala	200	205	210	
Ser	Ser	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Ile	Val	Pro	Arg	Asp	Gly	Gly	215	220	225	
Gly	Lys	Pro	Gly	Ile	Gly	Thr	Val	Pro	Glu	Val	Ser	Ser	Val	Phe	230	235	240	
Ile	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Val	Leu	Thr	Ile	Thr	Leu	Thr	245	250	255	
Pro	Lys	Val	Thr	Gly	Val	Val	Val	Asp	Ile	Ser	Lys	Asp	Asp	Pro				

				260					265				270
G u	Val	G l n	P h e	S e r 275	T r p	P h e	V a l	A s p	A s p 280	V a l	G u	V a l	H i s T h r 285
A l a	G l n	T h r	G l n	P r o 290	A r g	G l u	G l u	G l n	P h e 295	A s n	S e r	T h r	P h e A r g 300
S e r	V a l	S e r	G l u	L e u 305	P r o	I l e	M e t	H i s	G l n 310	A s p	T r p	L e u	A s n G l y 315
L y s	G l u	P h e	L y s	C y s 320	A r g	V a l	A s n	S e r	A l a 325	A l a	P h e	P r o	A l a P r o 330
I l e	G l u	L y s	T h r	I l e 335	S e r	L y s	T h r	L y s	G l y 340	A r g	P r o	L y s	A l a P r o 345
G l n	V a l	T y r	T h r	I l e 350	P r o	P r o	P r o	L y s	G l u 355	G l n	M e t	A l a	L y s A s p 360
L y s	V a l	S e r	L e u	T h r 365	C y s	M e t	I l e	T h r	A s p 370	P h e	P h e	P r o	G l u A s p 375
I l e	T h r	V a l	G l u	T r p 380	G l n	T r p	A s n	G l y	G l n 385	P r o	A l a	G l u	A s n T y r 390
L y s	A s n	T h r	G l n	P r o 395	I l e	M e t	A s p	T h r	A s p 400	G l y	S e r	T y r	P h e V a l 405
T y r	S e r	L y s	L e u	A s n 410	V a l	G l n	L y s	S e r	A s n 415	T r p	G l u	A l a	G l y A s n 420
T h r	P h e	T h r	C y s	S e r 425	V a l	L e u	H i s	G l u	G l y 430	L e u	H i s	A s n	H i s H i s 435
T h r	G l u	L y s	S e r	L e u 440	S e r	H i s	S e r	P r o	G l y 445	L y s			

<210> 52

<211> 214

5 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

<220>

<221> Otro...

10 <223> Longitud completa de cadena ligera de anticuerpo 28E9 murino

<400> 52

Asp 1 Ile Gln Met Thr 5 Gln Ser Pro Ala Ser 10 Leu Ser Val Ser Val 15
 Gly Gu Thr Val Thr 20 Phe Thr Oys Arg Thr 25 Ser Gu Asn Ile Tyr 30
 Thr Tyr Leu Ala Trp 35 Ile Gln Gln Lys Gln 40 Gly Lys Ser Pro Gln 45
 Leu Leu Val Tyr Asn 50 Ala Gln Ile Leu Ala 55 Gu Gly Val Pro Ser 60
 Arg Phe Ser Gly Ser 65 Gly Ser Gly Ser Gln 70 Phe Ser Leu Gln Ile 75
 Asn Ser Leu Gln Pro 80 Gu Asp Phe Gly Tyr 85 Tyr Tyr Oys Gln His 90
 His Tyr Gly Thr Pro 95 Phe Thr Phe Gly Ser 100 Gly Thr Lys Val Gu 105
 Ile Lys Arg Ala Asp 110 Ala Ala Pro Thr Val 115 Ser Ile Phe Pro Pro 120
 Ser Ser Gu Gln Leu 125 Thr Ser Gly Gly Ala 130 Ser Val Val Oys Phe 135
 Leu Asn Asn Phe Tyr 140 Pro Lys Asp Ile Asn 145 Val Lys Trp Lys Ile 150
 Asp Gly Ser Gu Arg 155 Gln Asn Gly Val Leu 160 Asn Ser Trp Thr Asp 165
 Gln Asp Ser Lys Asp 170 Ser Thr Tyr Ser Met 175 Ser Ser Thr Leu Thr 180
 Leu Thr Lys Asp Gu 185 Tyr Gu Arg His Asn 190 Ser Tyr Thr Oys Gu 195
 Ala Thr His Lys Thr 200 Ser Thr Ser Pro Ile 205 Val Lys Ser Phe Asn 210
 Arg Asn Gu Oys

<210> 53

<211> 442

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<220>

<221> Otro...

<223> Longitud completa de cadena pesada de anticuerpo 1C11 murino

<400> 53

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Arg	Pro	Gly
1				5					10					15
Ala	Ser	Val	Thr	Leu	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr
				20					25					30
Asp	Phe	Glu	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Thr	Pro	Val	His	Gly	Leu
				35					40					45
Glu	Trp	Ile	Gly	Ala	Ile	Ala	Pro	Glu	Thr	Gly	Thr	Ser	Ala	Tyr
				50					55					60
Asn	Gln	Lys	Phe	Arg	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Ile	Ser
				65					70					75
Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Asp	Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp
				80					85					90
Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Thr	Ile	Tyr	Tyr	Ala	Ala	Pro	Trp	Phe
				95					100					105
Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser
				110					115					120
Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Tyr	Pro	Leu	Ala	Pro	Gly	Ser	Ala	Ala
				125					130					135
Gln	Thr	Asn	Ser	Met	Val	Thr	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Tyr
				140					145					150
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Thr	Trp	Asn	Ser	Gly	Ser	Leu	Ser
				155					160					165

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr
 170 175 180
 Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser
 185 190 195
 Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys
 200 205 210
 Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys
 215 220 225
 Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 230 235 240
 Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr
 245 250 255
 Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe
 260 265 270
 Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln
 275 280 285
 Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu
 290 295 300
 Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys
 305 310 315
 Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 320 325 330
 Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr
 335 340 345
 Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu
 350 355 360
 Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu
 365 370 375
 Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln
 380 385 390
 Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu
 395 400 405
 Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys
 410 415 420
 Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser
 425 430 435
 Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
 440

<210> 54

<211> 220

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<220>

<221> Otro...

<223> Longitud completa de cadena ligera de anticuerpo 1C11 murino

<400> 54

Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Val

1		5		10		15								
Gly	Glu	Lys	Val	Thr ₂₀	Met	Ser	Oys	Lys	Ser ₂₅	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu ₃₀
Tyr	Ser	Ser	Asn	Gln ₃₅	Lys	Asn	Tyr	Leu	Ala ₄₀	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys ₄₅
Pro	Gly	Gln	Ser	Pro ₅₀	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr ₅₅	Trp	Ala	Ser	Thr	Arg ₆₀
Glu	Ser	Gly	Val	Pro ₆₅	Asp	Arg	Phe	Thr	Gly ₇₀	Ser	Gly	Ser	Val	Thr ₇₅
Asp	Phe	Pro	Leu	Thr ₈₀	Ile	Ser	Ser	Val	Lys ₈₅	Ala	Glu	Asp	Leu	Ala ₉₀
Val	Tyr	Tyr	Oys	Gln ₉₅	Gln	Tyr	Tyr	Ser	Tyr ₁₀₀	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly ₁₀₅
Gly	Gly	Thr	Lys	Val ₁₁₀	Glu	Ile	Lys	Arg	Ala ₁₁₅	Asp	Ala	Ala	Pro	Thr ₁₂₀
Val	Ser	Ile	Phe	Pro ₁₂₅	Pro	Ser	Ser	Glu	Gln ₁₃₀	Leu	Thr	Ser	Gly	Gly ₁₃₅
Ala	Ser	Val	Val	Oys ₁₄₀	Phe	Leu	Asn	Asn	Phe ₁₄₅	Tyr	Pro	Lys	Asp	Ile ₁₅₀
Asn	Val	Lys	Trp	Lys ₁₅₅	Ile	Asp	Gly	Ser	Glu ₁₆₀	Arg	Gln	Asn	Gly	Val ₁₆₅
Leu	Asn	Ser	Trp	Thr ₁₇₀	Asp	Gln	Asp	Ser	Lys ₁₇₅	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser ₁₈₀
Met	Ser	Ser	Thr	Leu ₁₈₅	Thr	Leu	Thr	Lys	Asp ₁₉₀	Glu	Tyr	Glu	Arg	His ₁₉₅
Asn	Ser	Tyr	Thr	Oys ₂₀₀	Glu	Ala	Thr	His	Lys ₂₀₅	Thr	Ser	Thr	Ser	Pro ₂₁₀
Ile	Val	Lys	Ser	Phe ₂₁₅	Asn	Arg	Asn	Glu	Oys ₂₂₀					

<210> 55
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> Otro...
 <223> Marco conservado consenso humano VH1-H1

<400> 55

Glu	Val	Gln	Leu	Val ₅	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly ₁₀	Leu	Val	Gln	Pro	Gly ₁₅
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu ₂₀	Ser	Oys	Ala	Ala	Ser ₂₅					

<210> 56
 <211> 14

<212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <220>
 5 <221> Otro...
 <223> Marco conservado consenso humano VH - H2

 <400> 56

 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
 10 5 10

 <210> 57
 <211> 32
 <212> PRT
 15 <213> *Homo sapiens*

 <220>
 <221> Otro...
 <223> Marco conservado consenso humano VH - H3
 20
 <400> 57

 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 1 5 10 15
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Oys
 20 25 30
 Ala Arg
 25
 <210> 58
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 30
 <220>
 <221> Otro...
 <223> Marco conservado consenso humano VH - H4
 35
 <400> 58

 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 5 10

 <210> 59
 <211> 23
 40 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <220>
 <221> Otro...
 45 <223> Marco conservado consenso humano VL - L1
 <400> 59

 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Oys
 20
 50
 <210> 60
 <211> 15

<212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <220>
 5 <221> Otro...
 <223> Marco conservado consenso humano VL - L2

 <400> 60

 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr

 10 1 5 10 15

 <210> 61
 <211> 32
 <212> PRT
 15 <213> *Homo sapiens*

 <220>
 <221> Otro...
 <223> Marco conservado consenso humano VL - L3
 20
 <400> 61

 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
 20 25 30
 Tyr Cys

 25 <210> 62
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 30 <220>
 <221> Otro...
 <223> Marco conservado consenso humano VL - L4

 <400> 62
 35
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 5 10

 <210> 63
 <211> 26
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador de clonación directo usado en el ejemplo 1
 45
 <400> 63
 ccgccaccg tgaagatcttacgtc 26

 50 <210> 64
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador de clonación inverso usado en el ejemplo 1

<400> 64

5 cggct cgaga ct aggcgt gg ggctggagga cgt t g 35

<210> 65

<211> 542

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fusión de IgE Ch3-Ch4-M-Fc

15 <400> 65

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr
1 5 10 15

Gly	Val	His	Ser	Thr	Lys	Lys	Cys	Ala	Asp	Ser	Asn	Pro	Arg	Gly	20	25	30
Val	Ser	Ala	Tyr	Leu	Ser	Arg	Pro	Ser	Pro	Phe	Asp	Leu	Phe	Ile	35	40	45
Arg	Lys	Ser	Pro	Thr	Ile	Thr	Cys	Leu	Val	Val	Asp	Leu	Ala	Pro	50	55	60
Ser	Lys	Gly	Thr	Val	Asn	Leu	Thr	Trp	Ser	Arg	Ala	Ser	Gly	Lys	65	70	75
Pro	Val	Asn	His	Ser	Thr	Arg	Lys	Glu	Glu	Lys	Gln	Arg	Asn	Gly	80	85	90
Thr	Leu	Thr	Val	Thr	Ser	Thr	Leu	Pro	Val	Gly	Thr	Arg	Asp	Trp	95	100	105
Ile	Glu	Gly	Glu	Thr	Tyr	Gln	Cys	Arg	Val	Thr	His	Pro	His	Leu	110	115	120
Pro	Arg	Ala	Leu	Met	Arg	Ser	Thr	Thr	Lys	Thr	Ser	Gly	Pro	Arg	125	130	135
Ala	Ala	Pro	Glu	Val	Tyr	Ala	Phe	Ala	Thr	Pro	Glu	Trp	Pro	Gly	140	145	150
Ser	Arg	Asp	Lys	Arg	Thr	Leu	Ala	Cys	Leu	Ile	Gln	Asn	Phe	Met	155	160	165
Pro	Glu	Asp	Ile	Ser	Val	Gln	Trp	Leu	His	Asn	Glu	Val	Gln	Leu	170	175	180
Pro	Asp	Ala	Arg	His	Ser	Thr	Thr	Gln	Pro	Arg	Lys	Thr	Lys	Gly	185	190	195
Ser	Gly	Phe	Phe	Val	Phe	Ser	Arg	Leu	Glu	Val	Thr	Arg	Ala	Glu	200	205	210
Trp	Glu	Gln	Lys	Asp	Glu	Phe	Ile	Cys	Arg	Ala	Val	His	Glu	Ala	215	220	225
Ala	Ser	Pro	Ser	Gln	Thr	Val	Gln	Arg	Ala	Val	Ser	Val	Asn	Pro	230	235	240
Gly	Leu	Ala	Gly	Gly	Ser	Ala	Gln	Ser	Gln	Arg	Ala	Pro	Asp	Arg	245	250	255
Val	Leu	Cys	His	Ser	Gly	Gln	Gln	Gln	Gly	Leu	Pro	Arg	Ala	Ala	260	265	270
Gly	Gly	Ser	Val	Pro	His	Pro	Arg	Cys	His	Cys	Gly	Ala	Gly	Arg	275	280	285
Ala	Asp	Trp	Pro	Gly	Pro	Pro	Glu	Leu	Asp	Val	Cys	Val	Glu	Glu	290	295	300
Ala	Glu	Gly	Glu	Ala	Pro	Trp	Arg	Ala	Gln	Val	Thr	Asp	Lys	Ala	305	310	315
Ala	His	Tyr	Thr	Leu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	320	325	330
Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	335	340	345
Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	350	355	360

Val Ser His Glu Asp 365 Pro Glu Val Lys Phe 370 Asn Trp Tyr Val Asp 375
 Gly Val Glu Val His 380 Asn Ala Lys Thr Lys 385 Pro Arg Glu Glu Gln 390
 Tyr Asn Ser Thr Tyr 395 Arg Val Val Ser Val 400 Leu Thr Val Leu His 405
 Gln Asp Trp Leu Asn 410 Gly Lys Glu Tyr Lys 415 Oys Lys Val Ser Asn 420
 Lys Ala Leu Pro Ala 425 Pro Ile Glu Lys Thr 430 Ile Ser Lys Ala Lys 435
 Gly Gln Pro Arg Glu 440 Pro Gln Val Tyr Thr 445 Leu Pro Pro Ser Arg 450
 Glu Glu Met Thr Lys 455 Asn Gln Val Ser Leu 460 Thr Oys Leu Val Lys 465
 Gly Phe Tyr Pro Ser 470 Asp Ile Ala Val Glu 475 Trp Glu Ser Asn Gly 480
 Gln Pro Glu Asn Asn 485 Tyr Lys Thr Thr Pro 490 Pro Val Leu Asp Ser 495
 Asp Gly Ser Phe Phe 500 Leu Tyr Ser Lys Leu 505 Thr Val Asp Lys Ser 510
 Arg Trp Gln Gln Gly 515 Asn Val Phe Ser Oys 520 Ser Val Met His Glu 525
 Ala Leu His Asn His 530 Tyr Thr Gln Lys Ser 535 Leu Ser Leu Ser Pro 540
 Gly Lys

<210> 66
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<220>
 <221> Otro...
 <223> Secuencia N-terminal, cadena pesada 7AG
 <400> 66

Gln Val Gln Leu Gln 5 Gln Ser Gly Ala Glu 10 Leu Val Arg Pro Gly 15
 1
 Ala Ser Val Thr Leu 20 Ser Oys Lys Ala Ser 25
 20

<210> 67
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<220>
 <221> Otro...
 <223> Secuencia N-terminal, cadena ligera 7AG

<400> 67

Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Ser Val
1 5 10 15
Gly Glu Lys Val Thr Leu Ser Cys Lys Ser
20 25

5
<210> 68
<211> 25
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

10
<220>
<221> Otro...
<223> Secuencia N-terminal, cadena pesada 1C11
<400> 68

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly
1 5 10 15
Ala Ser Val Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser
20 25

15
<210> 69
<211> 25
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

20
<220>
<221> Otro...
<223> Secuencia N-terminal, cadena ligera 1C11

25
<400> 69

Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Val
1 5 10 15
Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser
20 25

30
<210> 70
<211> 25
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

35
<220>
<221> Otro...
<223> Secuencia N-terminal, cadena pesada 47H4
<400> 70

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

40
<210> 71
<211> 21
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

45

ES 2 478 242 T3

<220>
 <221> Otro...
 <223> Secuencia N-terminal, cadena ligera 47H4

5 <400> 71

Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu
 1 5 10 15
 Gly Asp Gln Ala Ser Ile
 20

10 <210> 72
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

15 <220>
 <221> Otro...
 <223> Secuencia N-terminal, cadena pesada 26A11

<400> 72

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly
 1 5 10 15
 Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser
 20 25

20 <210> 73
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

25 <220>
 <221> Otro...
 <223> Secuencia N-terminal, cadena ligera 26A11

30 <400> 73

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser
 20 25

35 <210> 74
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

40 <220>
 <221> Otro...
 <223> Secuencia N-terminal, cadena pesada 45C1

<400> 74

45 Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Thr Val Lys

<210> 75

ES 2 478 242 T3

<211> 24
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 5 <220>
 <221> Otro...
 <223> Secuencia N-terminal, cadena ligera 45C1
 10 <400> 75
 Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile
 1 5 10 15
 Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Oys Lys
 20
 15 <210> 76
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <220>
 <221> Otro...
 20 <223> Secuencia N-terminal, cadena pesada 28E9
 <400> 76
 Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Oys Ala Thr Ser
 20 25
 25 <210> 77
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 30 <220>
 <221> Otro...
 <223> Secuencia N-terminal, cadena ligera 28E9
 35 <400> 77
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Glu Thr Val Thr Phe Thr Oys Arg
 20
 40 <210> 78
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 45 <223> Cebador directo DIR. Bsi W 7AG HC
 <400> 78
 tcgacgtacg ct caggt t ca gct gcagcaa t ct ggggct g agctgg 46
 50 <210> 79
 <211> 39
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador directo DIR. EcoRV 7A6 LC
 5
 <400> 79
 gatcgatat cgatgatgcc agt ct ccct c ct ccct aac 39
 <210> 80
 10 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Cebador directo DIR. Bsi W 1C11 HC
 <400> 80
 t cgacgt acg ct caggt t ca at t gcagcag t ct ggggct g agctgg 46
 20 <210> 81
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Cebador directo DIR. EcoRV 1C11 LC
 <400> 81
 30 gat cgat at c gtaatgtctc agtctccttc ctccctagc 39
 <210> 82
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Cebador directo 9. 1 HCF. Bsi W 47H4 HC
 <400> 82
 40 t cgacgt acg ctgaggtgaa gt t ggt ggag t ct gggggag gcttag 46
 <210> 83
 <211> 39
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador directo 47H4LCF. EcoRV 47H4 LC
 50 <400> 83
 gat cgat at c gt gct gact c agactccact ctccctgcc 39
 <210> 84
 <211> 43
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador directo C7F7HCF. Bsi W 26A11 HC
 60 <400> 84
 t cgacgt acg ct gaggt cca gct ccagcag t ct ggacct g agc 43
 <210> 85
 65 <211> 37
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador directo 2B4LCF. EcoRV 26A11 LC
 5
 <400> 85
 gat cgat at c cagat gaccc aaact acat c ct ccct g 37
 <210> 86
 10 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Cebador directo 2G6HCF. Bsi W 45C1 HC
 <400> 86
 t cgacgt acg ct cagat cca gttggtgcag t ct ggacct g agct g 45
 20 <210> 87
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Cebador directo 9C10LCF. EcoRV 45C1 LC
 <400> 87
 gatcgatc gtgatgacgc agact ccact cacttgcgg 41
 30 <210> 88
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Cebador directo 9.1HCF BsiW 28E9 HC
 <400> 88
 40 t cgacgt acg ct gaggt gaa gct ggt ggag t ct gaaggag gct t gg 46
 <210> 89
 <211> 39
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador directo 5E10. LCF. EcoRV 28E9 LC
 50 <400> 89
 gat cgat at cagatgaccc agt ct ccagc ct ccct at c 39
 <210> 90
 55 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 60 <223> Cebador de cadena pesada (HCR)
 <400> 90
 ct ggacaggg atccagagtt t ccaggt cact gt cact ggct caggg 45
 <210> 91
 65 <211> 39
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de cadena ligera (LCR)
 5
 <400> 91
 ct gt aggt gc t gt ct t t gct gt cct gat ca gtccaactg39
 <210> 92
 10 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Cebador inverso INV. Apal 7A6 HC
 <400> 92
 accgatgggc ccttggtgga ggctgaagag act gt gag 38
 20 <210> 93
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Cebador inverso INV. Kpnl 7A6 LC
 <400> 93
 30 ccttggtacc ccct ccgaac gtgtacggat agctataata ttgg 43
 <210> 94
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Cebador inverso INV. Apal 1C11 HC
 <400> 94
 40 gaccgatggg cccttggtgg aggctgagga gactgtg 37
 <210> 95
 <211> 38
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso INV. Kpnl 1C11 LC
 50 <400> 95
 ccttggtacc ccct ccgaac gt gt acggat agct at aa 38
 <210> 96
 <211> 37
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso 47H4HCR. Apal 47H4 HC
 60 <400> 96
 t gggccct t g gtggaggctgg aggagacggt gactgag 37
 <210> 97
 65 <211> 21
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso 47H4LCR. Kpnl 47H4 LC
 5
 <400> 97
 ttccaacttg gtacctccac c 21
 <210> 98
 10 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Cebador inverso 7G8HCR. Apal 26A11 HC
 <400> 98
 gaccgatggg cccttggtgg argctgcaga gacagtgacc agag 44
 20 <210> 99
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Cebador inverso 47H4LCR. Kpnl 26A11 LC
 <400> 99
 30 ttccaacttg gt acct ccac c 21
 <210> 100
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Cebador inverso 45C1.HCR. Apal 45C1 HC
 <400> 100
 40 cgatgggccc ttggtggarg ckgaggagac ggtgagaatg 40
 <210> 101
 <211> 18
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso 5C2LCR. Kpnl 45C1 LC
 50 <400> 101
 agcttggtag cccctccg 18
 <210> 102
 <211> 40
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso 28E9. HC. REV. Apal 28E9 HC
 60 <400> 102
 cgatgggccc ttggtggagg ctgaggagac ggcgactgag 40
 <210> 103
 65 <211> 22
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso 1D5. 2LCR, KpnI 28E9 LC
 5
 <400> 103
 ttccaacttg gtacccgagc cg 22
 <210> 104
 10 <211> 33
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*
 <400> 104
 15 cctattaca ttggtatctg cagaagccag gcc 33
 <210> 105
 <211> 33
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso de mutagénesis
 25 <400> 105
 ggcttggtct ctgcagatac caat gt aaat agg 33
 <210> 106
 <211> 22
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador director WT de exploración de M1'
 35 <400> 106
 ggccaaagac cctaagacag t c 22
 <210> 107
 40 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 45 <223> Cebador directo de huM1' de exploración de M1'
 <400> 107
 gggctggctg gcggctccgc 20
 <210> 108
 50 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> Cebador inverso WT de exploración de M1'
 <400> 108
 60 ctatgccctg gtctggaaga tg 22
 <210> 109
 <211> 25
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial
 <220>

<223> Cebador directo de la rama izquierda
 <400> 109
 tgtctggtgg tggacctgga aagcg 25
 5
 <210> 110
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Cebador inverso de la rama izquierda
 <400> 110
 15 t cct cgct ct cct cct ct gg tggcg g 25
 <210> 111
 <211> 25
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador directo de la derecha
 25 <400> 111
 ccat gcaacc t agt at cct a ttctc c 25
 <210> 112
 <211> 25
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso de la rama derecha
 35 <400> 112
 ctttatacag gagaacctag cccag 25
 40

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti IgE/M1' que se une específicamente con un epítipo en el segmento M1' de IgE definido por los restos 317 a 351 de SEC ID N°: 1 y que induce apoptosis en linfocitos B que expresan IgE.

2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es capaz de unirse con IgE que es de origen humano, de mono rhesus o de mono cynomolgus.

3. El anticuerpo de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, en donde el anticuerpo agota específicamente linfocitos B productores de IgE cuando se administra *in vivo* una cantidad terapéuticamente eficaz a un mamífero y opcionalmente reduce IgE en suero total o reduce IgE en suero libre; en donde opcionalmente el IgE es específico de alérgeno.

4. El anticuerpo de la reivindicación 3 que es quimérico, humanizado o humano.

5. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que se une específicamente con el mismo epítipo que uno que se une con un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en: 47H4 (ATTC Dep. N° PTA-8270), 7A6 (ATTC Dep. N° PTA-8268), 26A11 (ATTC Dep. N° PTA-8262), 47H4v5 que comprende una cadena ligera variable que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID N°: 31 (Figura 6C) y una cadena pesada variable que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID N°: 41 (Figura 6F), 7A6v1 que comprende una cadena ligera variable que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID N°: 28 (Figura 6B) y una cadena pesada variable que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID N°: 37 (Figura 6E) y 26A11 v6 que comprende una cadena ligera variable que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID N°: 24 (Figura 6A) y una cadena pesada variable que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID N°: 35 (Figura 6D).

6. El anticuerpo de la reivindicación 5 en el que el epítipo corresponde a un péptido seleccionado del grupo que consiste en: péptido 4 (SEC ID N°: 8), péptido 5 (SEC ID N°: 9), péptido 7 (SEC ID N°: 11) o péptido 8 (SEC ID N°: 12) y preferentemente en el que el epítipo corresponde al péptido 4 (SEC ID N°: 8).

7. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que se une con una afinidad de unión de Scatchard que es equivalente a la del anticuerpo murino anti IgE/M1' 47H4 (ATTC Dep. N° PTA-8270), y opcionalmente en el que la afinidad es entre 0,30 y 0,83 nm.

8. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que se une específicamente con un segmento M1' de IgE con una afinidad de unión de Scatchard que es equivalente a la del anticuerpo humanizado anti IgE/M1' 47H4v5 que comprende una cadena ligera variable que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID N°: 31 (Figura 6C) y una cadena pesada variable que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID N°: 41 (Figura 6F), y opcionalmente en el que la afinidad es aproximadamente 1,5 nm.

9. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende las HVR de cadena pesada y de cadena ligera de un anticuerpo o de un fragmento de unión a antígeno del mismo seleccionadas del grupo que consiste en: 26A11 como se muestra en SEC ID N°: 21 (Figura 6A) y SEC ID N°: 33 (Figura 6D), 26A11v.1-16 como se muestra SEC ID N°: 22-26 (Figura 6A) and SEC ID N°: 34 y 35 (Figura 6D), 7A6 como se muestra en SEC ID N°: 27 (Figura 6B) and SEC ID N°: 36 (Figura 6E), 7A6v1 como se muestra en SEC ID N°: 28 (Figura 6B) y SEC ID N°: 37 (Figura 6E), 47H4 como se muestra en SEC ID N°: 29 (Figura 6C) y SEC ID N°: 38 (Figura 6F), y 47H4v1-6 como se muestra en SEC ID N°: 30 y 31 (Figura 6C) y SEC ID N°: 39-42 (Figura 6F), y que comprende preferentemente las HVR de cadena pesada y de cadena ligera o un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo de 47H4v1-6 como se muestra en SEC ID N°: 30 y 31 (Figura 6C) y SEC ID N°: 39-42 (Figura 6F).

10. El anticuerpo de la reivindicación 9 que comprende regiones variables de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo o del fragmento de unión a antígeno del mismo seleccionado del grupo que consiste en: 26A11 como se muestra en SEC ID N°: 21 (Figura 6A) y SEC ID N°: 33 (Figura 6D), 26A11v.1-16 como se muestra en SEC ID N°: 22-26 (Figura 6A) y SEC ID N°: 34 y 35 (Figura 6D), 7A6 como se muestra en SEC ID N°: 27 (Figura 6B) y SEC ID N°: 36 (Figura 6E), 7A6v1 como se muestra en SEC ID N°: 28 (Figura 6B) y SEC ID N°: 37 (Figura 6E), 47H4 como se muestra en SEC ID N°: 29 (Figura 6C) y SEC ID N°: 38 (Figura 6F), y 47H4v1-6 como se muestra en SEC ID N°: 30 y 31 (Figura 6C) y SEC ID N°: 39-42 (Figura 6F).

11. El anticuerpo de la reivindicación 10 que está afucosilado.

12. Un péptido seleccionado del grupo que consiste en: péptido 4 (SEC ID N°: 8), péptido 5 (SEC ID N°: 9), péptido 7 (SEC ID N°: 11) o péptido 8 (SEC ID N°: 12).

13. Una composición que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 en combinación con al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

14. La composición de la reivindicación 13 que comprende además uno o más fármacos seleccionados del grupo que consiste en: anticuerpo anti IgE, antihistamínico, broncodilatador, glucocorticoide, AINE, antagonista de TNF, antagonista de integrina, agente inmunosupresor, antagonista de IL-4, antagonista de IL-13, antagonista doble de IL-4/IL-13, DMARD, anticuerpo que se une con un marcador de superficie de linfocitos B y antagonista de BAFF.

15. Un ácido nucleico que codifica un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende las HVR de cadenas pesada y ligera de un anticuerpo anti IgE/M1' apoptótico o de un fragmento de unión a antígeno del mismo seleccionado del grupo que consiste en: 26A11 como se muestra en SEC ID N°: 21 (Figura 6A) y SEC ID N°: 33 (Figura 6D), 26A11 v1-16 como se muestra en SEC ID N°: 22-26 (Figura 6A) y SEC ID N°: 34 y 35 (Figura 6D), 7A6 como se muestra en SEC ID N°: 27 (Figura 6B) y SEC ID N°: 36 (Figura 6E), 7A6v1 como se muestra en SEC ID N°: 28 (Figura 6B) y SEC ID N°: 37 (Figura 6E), 47H4 como se muestra en SEC ID N°: 29 (Figura 6C) y SEC ID N°: 38 (Figura 6F), y 47H4v1-6 como se muestra en SEC ID N°: 30 y 31 (Figura 6C) y SEC ID N°: 39-42 (Figura 6F).

16. El ácido nucleico de la reivindicación 15, que comprende además ácido nucleico que codifica las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de la secuencia de anticuerpo seleccionada del grupo que consiste en: 26A11 como se muestra en SEC ID N°: 21 (Figura 6A) y SEC ID N°: 33 (Figura 6D), 26A11v1-16 como se muestra en SEC ID N°: 22-26 (Figura 6A) y SEC ID N°: 34 y 35 (Figura 6D), 7A6 como se muestra en SEC ID N°: 27 (Figura 6B) y SEC ID N°: 36 (Figura 6E), 7A6v1 como se muestra en SEC ID N°: 28 (Figura 6B) y SEC ID N°: 37 (Figura 6E), 47H4 como se muestra en SEC ID N°: 29 (Figura 6C) y SEC ID N°: 38 (Figura 6F), y 47H4v1-6 como se muestra en SEC ID N°: 30 y 31 (Figura 6C) y SEC ID N°: 39-42 (Figura 6F).

17. El ácido nucleico de la reivindicación 16, en el que el anticuerpo codificado está afucosilado.

18. Un vector en el que el ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17 está unido operativamente.

19. Una célula hospedadora que comprende el vector de la reivindicación 18.

20. La célula hospedadora de la reivindicación 19 que es de mamífero, y preferentemente que es Ovario de Hámster Chino.

21. Un proceso para producir un anticuerpo anti IgE/M1' apoptótico o fragmento funcional que comprende cultivar la célula hospedadora de la reivindicación 19 o de la reivindicación 20 en condiciones adecuadas para expresión del anticuerpo o del fragmento, y recuperar el anticuerpo o el fragmento.

22. Un artículo de fabricación que incluye la composición de la reivindicación 13 o de la reivindicación 14 y un prospecto que indica el uso para el tratamiento de un trastorno mediado por IgE.

23. El artículo de la reivindicación 22 que es (i) un vial o (ii) una jeringa precargada, que comprende opcionalmente además un dispositivo de inyección, tal como un autoinyector.

24. Un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para uso en un método para agotar específicamente linfocitos B productores de IgE, comprendiendo el método administrar a un mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho anticuerpo anti IgE/M1', y opcionalmente en donde el anticuerpo tiene actividad ADCC.

25. Un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para uso en un método para tratar un trastorno mediado por IgE, comprendiendo el método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho anticuerpo anti IgE/M1'.

26. El anticuerpo para uso en un método de tratamiento de la reivindicación 25 en el que:

(i) el trastorno mediado por IgE se selecciona del grupo que consiste en: rinitis alérgica, asma alérgica, asma no alérgica, dermatitis atópica, gastroenteropatía alérgica, anafilaxis, urticaria, alergias alimentarias, aspergilosis broncopulmonar alérgica, enfermedades parasitarias, cistitis intersticial, síndrome de hiper IgE, ataxia telangiectasia, síndrome de Wiskott-Aldrich, linfoplasia atímica, mieloma de IgE, reacción de injerto contra hospedador y púrpura alérgica; y/o

(ii) el anticuerpo es para administración en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un fármaco seleccionado del grupo que consiste en: anticuerpo anti IgE, antihistamínico, broncodilatador, glucocorticoide, AINE, descongestionador, supresor de la tos, analgésico, antagonista de TNF, antagonista de integrina, agente inmunosupresor, antagonista de IL-4, antagonista de IL-13, antagonista doble de IL-4/IL-13, DMARD, anticuerpo que se une con un marcador de superficie de linfocitos B y antagonista de BAFF; y/o

(iii) el anticuerpo es para administración en un régimen de tratamiento combinado que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho anticuerpo anti IgE/M1' antes de, simultáneamente con o después de la administración de un método conocido del tratamiento para trastornos alérgicos.

27. El anticuerpo para uso en un método de tratamiento de la reivindicación 26 (iii), en el que:

- (a) el tratamiento conocido para trastorno alérgico comprende la administración de un anticuerpo anti IgE, antihistamínico, un broncodilatador, un glucocorticoide, un fármaco antiinflamatorio no esteroideo, un inmunosupresor, un antagonista de IL-4, un antagonista de IL-13, un antagonista doble de IL-4/IL-13, un descongestionador, un supresor de la tos o un analgésico; o
- (b) el tratamiento conocido para trastorno alérgico comprende un régimen de tratamiento de desensibilización de alérgenos.

28. El anticuerpo para uso en un método de tratamiento de una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 27, en el que el método es para prevenir o reducir la producción de IgE inducida por alérgenos.

29. Uso de un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno mediado por IgE.

30. El uso de la reivindicación 29, en el que:

- (i) el trastorno mediado por IgE se selecciona del grupo que consiste en: rinitis alérgica, asma alérgica, asma no alérgica, dermatitis atópica, gastroenteropatía alérgica, anafilaxis, urticaria, alergias alimentarias, aspergilosis broncopulmonar alérgica, enfermedades parasitarias, cistitis intersticial, síndrome de hiper IgE, ataxia telangiectasia, síndrome de Wiskott-Aldrich, linfoplasia atímica, mieloma de IgE, reacción de injerto contra hospedador y púrpura alérgica; y/o
- (ii) el anticuerpo es para administración en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un fármaco seleccionado del grupo que consiste en: anticuerpo anti IgE, antihistamínico, broncodilatador, glucocorticoide, AINE, descongestionador, supresor de la tos, analgésico, antagonista de TNF, antagonista de integrina, agente inmunosupresor, antagonista de IL-4, antagonista de IL-13, antagonista doble de IL-4/IL-13, DMARD, anticuerpo que se une con un marcador de superficie de linfocitos B y antagonista de BAFF.

31. Un hibridoma murino depositado en la ATCC el 21 de marzo de 2007 seleccionado del grupo que consiste en: PTA-8260, PTA-8261, PTA-8262, PTA-8263, PTA-8264, PTA-8265, PTA-8266, PTA-8267, PTA-8268, PTA-8269, PTA-8270.

32. Un anticuerpo que es secretado por el hibridoma de la reivindicación 31.

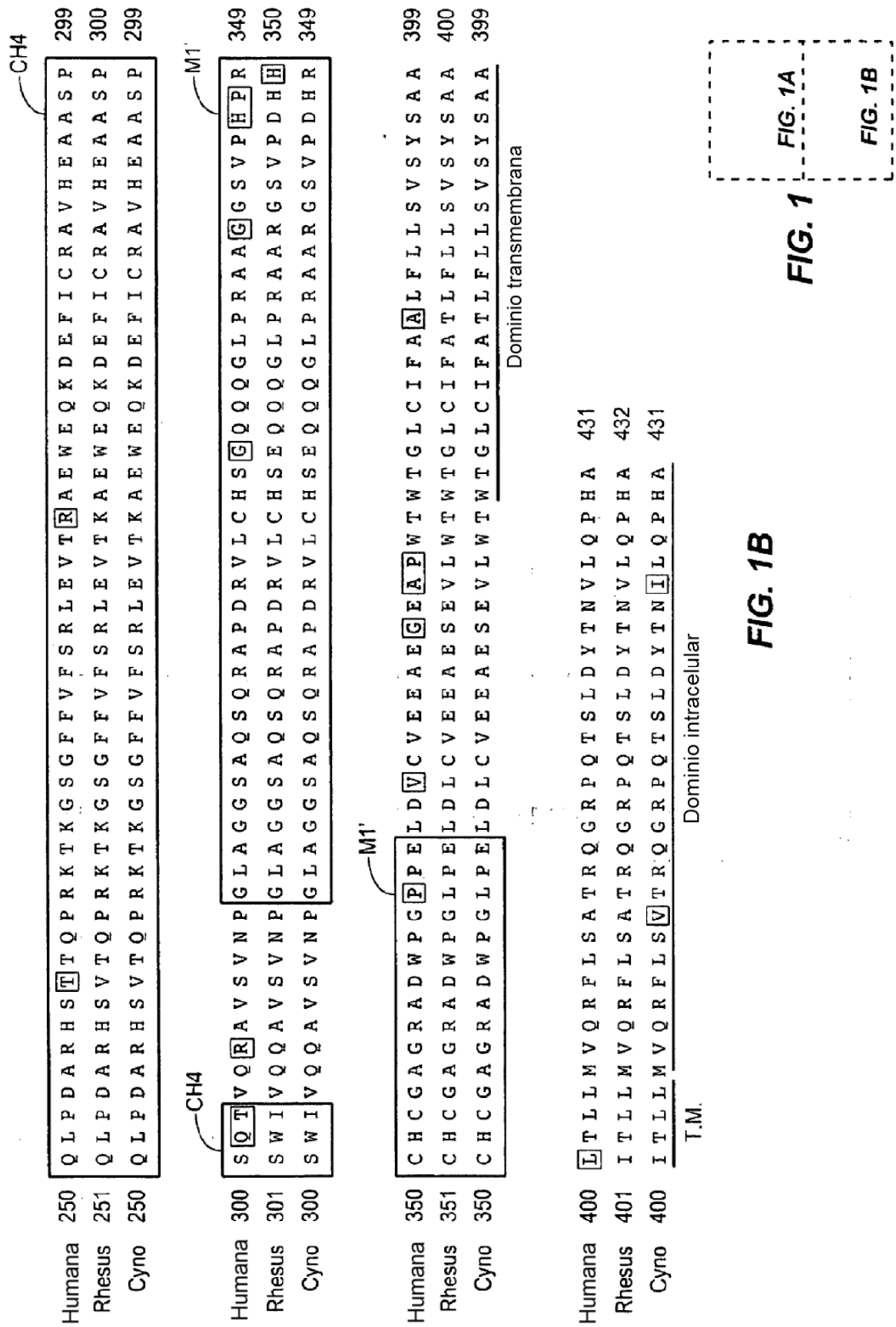
33. Un animal transgénico que expresa el segmento M1' humano de IgE que comprende los restos 317 a 351 de SEC ID N°: 1.

Secuencias de IgE/M1'

Secuencias de IgE/IM1'

Humana	1	I L Q	S S C D	G G	G H F F P P T	I Q L L C L	V	S G Y T P G	T	I N	I	T W L E	D	G Q V M	D	V D L S	T A S T	50	CH2
Rhesus	1	I L Q	S S C D	D D G H F F P P T	I Q L L C L	I S G Y T P G A I N	V	T W L E N G Q V M K V N S P T P P A	50										
Cyno	1	I L Q	S S C D	D D G H F F P P T	I Q L L C L	I S G Y T P G A I N	V	T W L E N G Q V M K V N S P T P P A	50										
Humana	51	T Q E G E L A S T Q S E F	T L	S	Q K H W L S D R T Y T C Q V T Y Q G	H	T F E	D S T	K K C A D S N P R	100									
Rhesus	51	T Q E G E L A S T Q S E F	T L A Q K H W L S D R T Y T C Q V T Y Q G	T T Y N D S T	K K C A D S N P R	100													
Cyno	51	T Q E G E L A S T Q S E F	T L A Q K H W L S D R T Y T C Q V T Y Q G	T T Y N D S T	K K C A N S N P R	100													
																			CH2
Humana	101	G V S A Y L S R P S P F D L F	I R	K S P T I T C L V V D L A P S K	G	T V N L T W S R A S G K P V	N	H	150										
Rhesus	101	G V S A Y L S R P S P F D L F	I S K S P T I T C L V V D L A P S K E T V N L T W S R A S G K P V P H	150															
Cyno	101	G V S A Y L S R P S P F D L F	I S K S P T I T C L V V D L A P S K E T V N L T W S R A S G K P V P H	150															
																			CH3
Humana	151	S T R K	E E	K - Q R N G T L T V T S	T	L P V	G	T R	D W I E G E T Y Q C R V T H P H L P R A L	M	R R S	T	199						
Rhesus	151	I P A T E K K	Q	Q R N G T L T V T S	I L P V V T Q D W I E G E T Y Q C R V T H P H L P R A L V	R R S M	200												
Cyno	151	T P A T E K K	- Q R N G T L T V T S	I L P V V T Q D W I E G E T Y Q C R V T H P H L P R A L V	R R S M	199													
Humana	200	T K T S G P R A A P E V Y	A	F	A T P E	W P G	S R D K R T L A C L I Q N F M P E D I S V Q W L H	N	E	V	249								
Rhesus	201	T K T S G P R A A P E V Y	V F	A T P E K L E S R D K R T L A C L I Q N F M P E D I S V Q W L H S D V	250														
Cyno	200	T K T S G P R A A P E V Y	V F	A T P E K L E S R D K R T L A C L I Q N F M P E D I S V Q W L H S D V	249														
																			CH4

FIG. 1A



<i>FIG. 2A-1</i>	<i>FIG. 2A-2</i>	<i>FIG. 2A-3</i>	<i>FIG. 2A-4</i>	<i>FIG. 2A-5</i>	<i>FIG. 2A-6</i>
<i>FIG. 2B-1</i>	<i>FIG. 2B-2</i>	<i>FIG. 2B-3</i>	<i>FIG. 2B-4</i>	<i>FIG. 2B-5</i>	<i>FIG. 2B-6</i>
<i>FIG. 2C-1</i>	<i>FIG. 2C-2</i>	<i>FIG. 2C-3</i>	<i>FIG. 2C-4</i>	<i>FIG. 2C-5</i>	<i>FIG. 2C-6</i>

FIG. 2

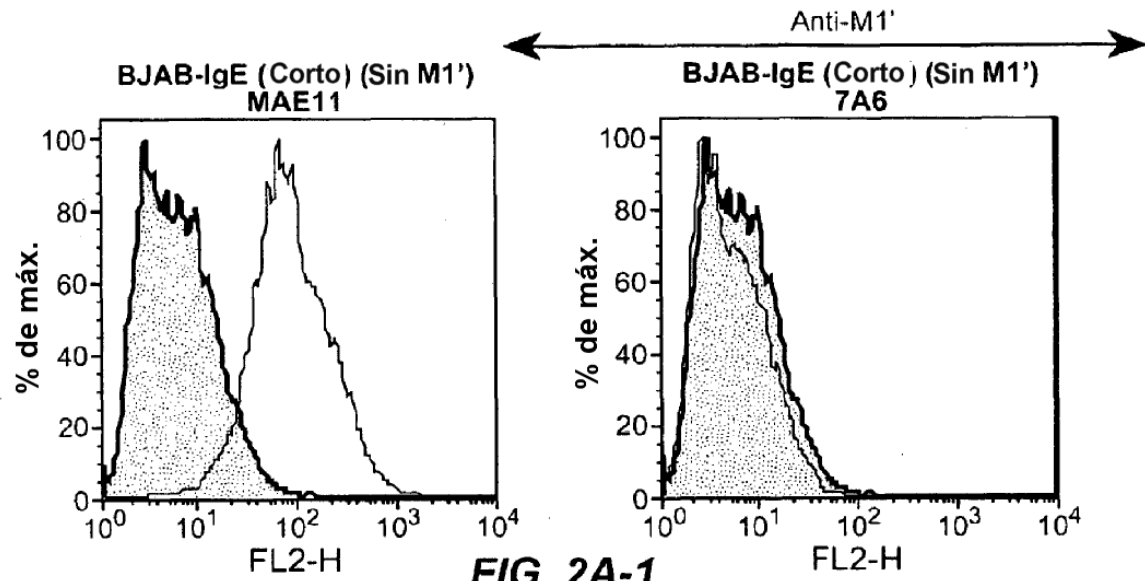


FIG. 2A-1

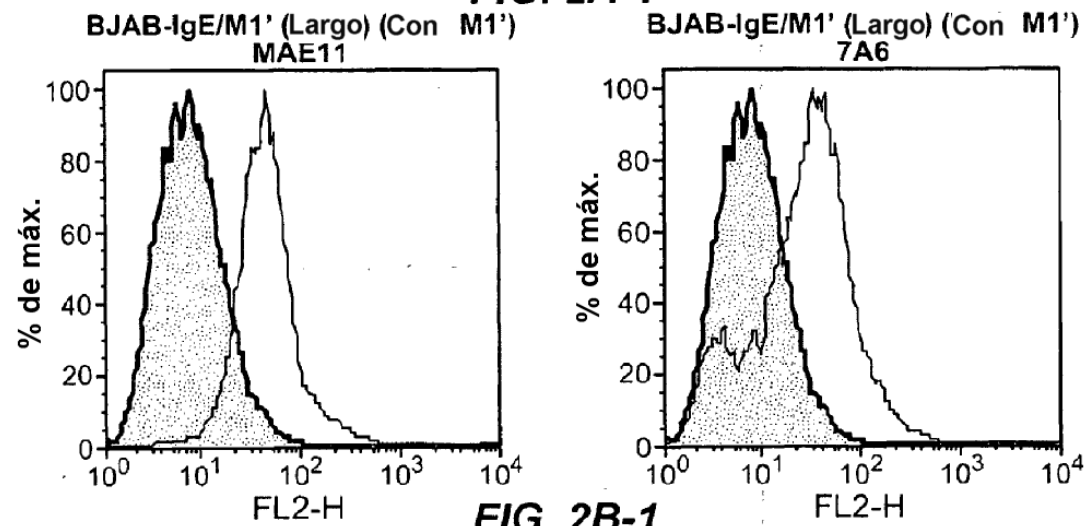


FIG. 2B-1

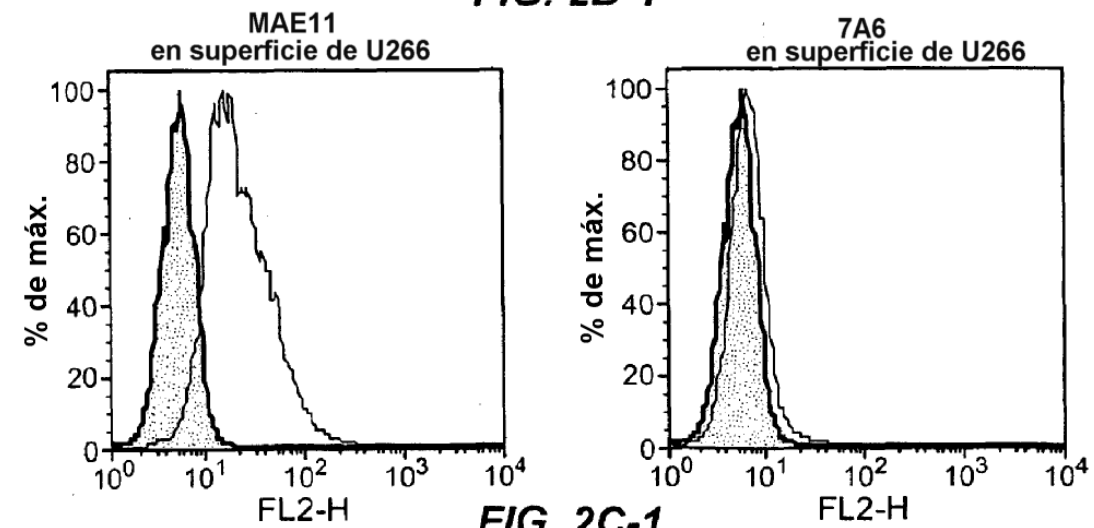
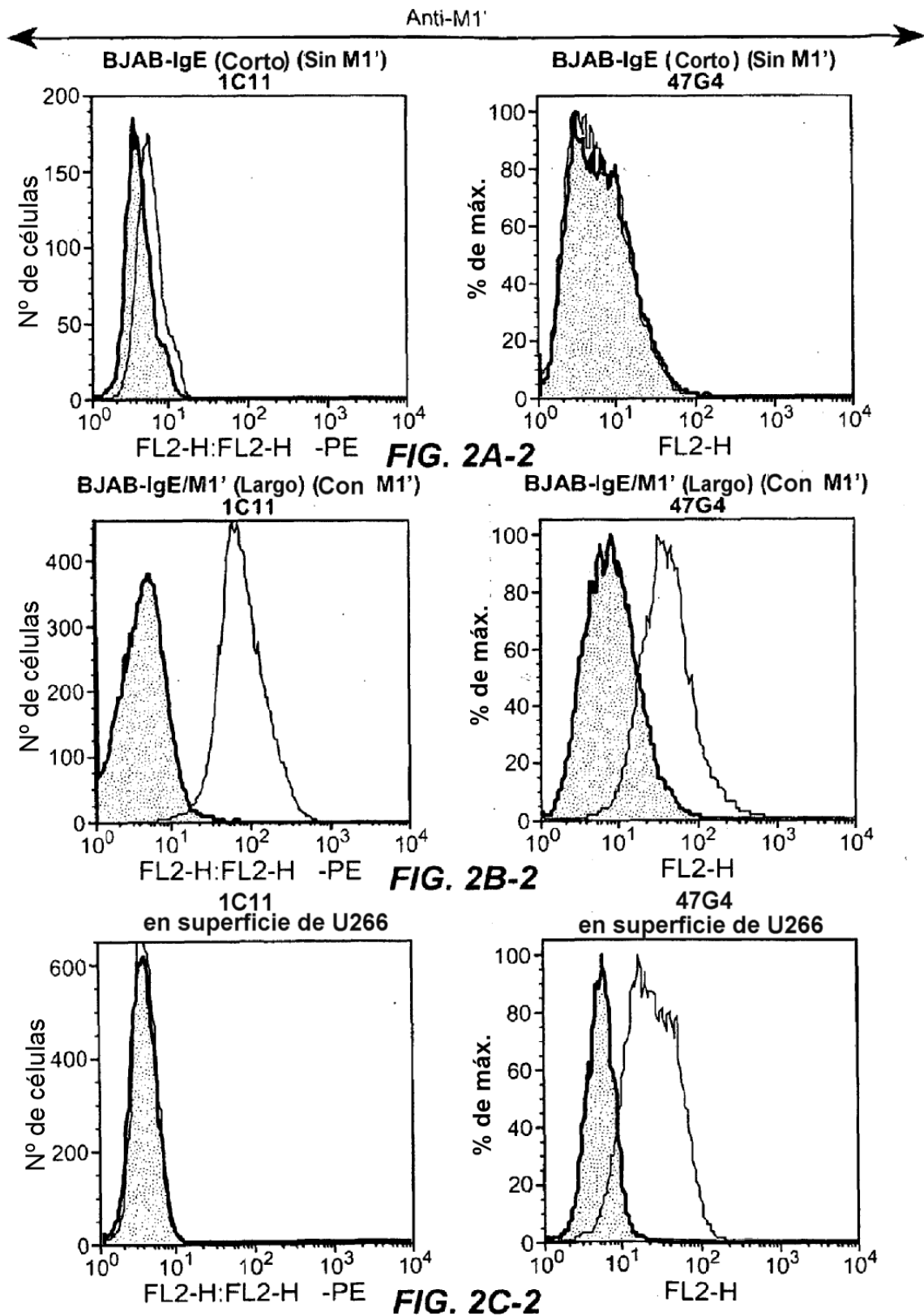


FIG. 2C-1



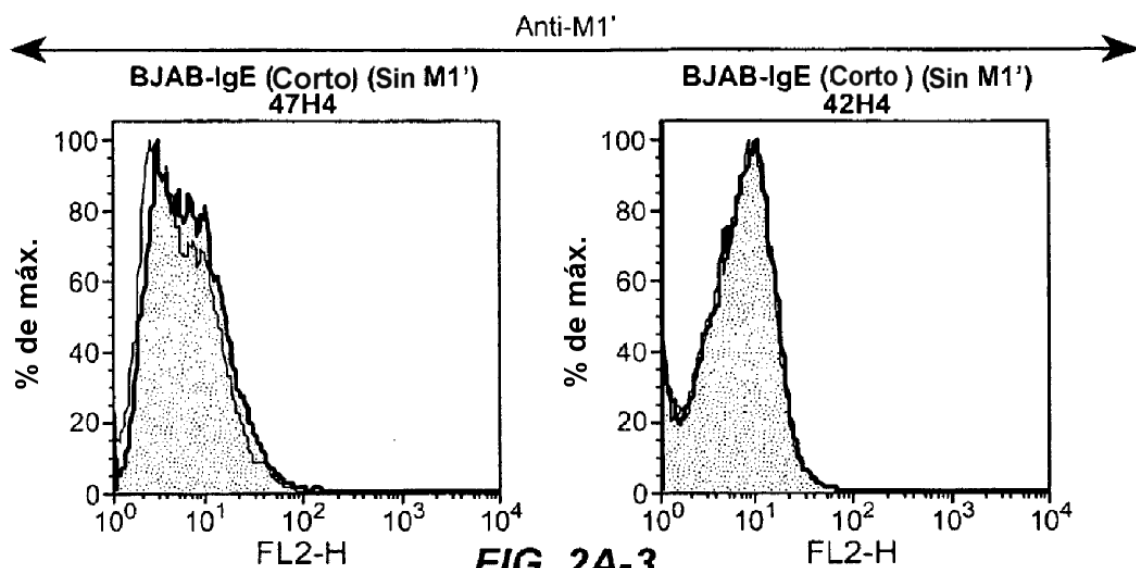


FIG. 2A-3

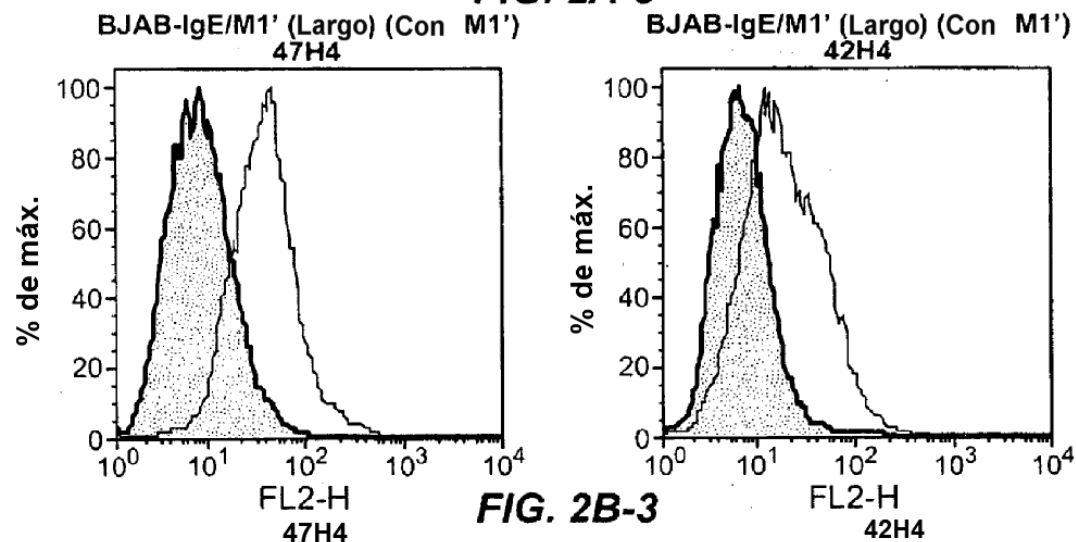


FIG. 2B-3

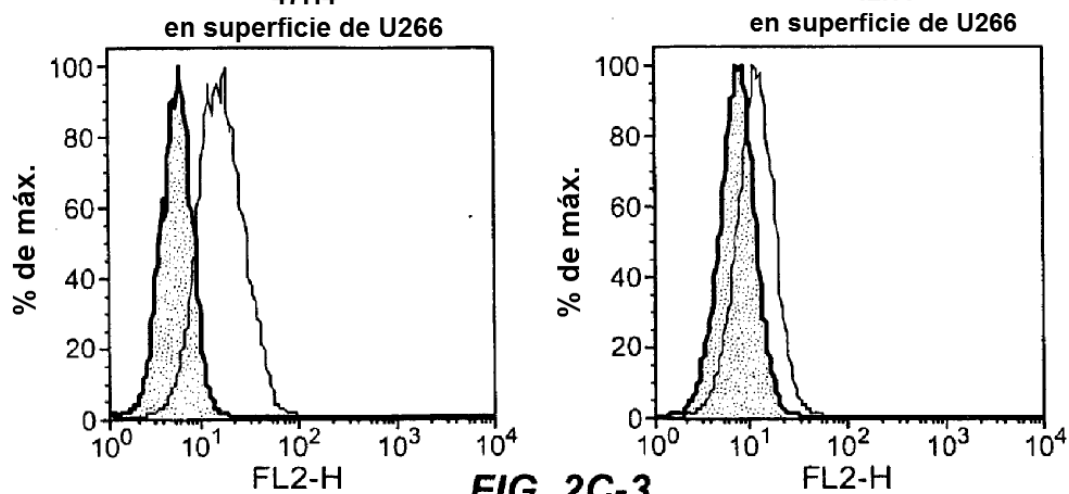
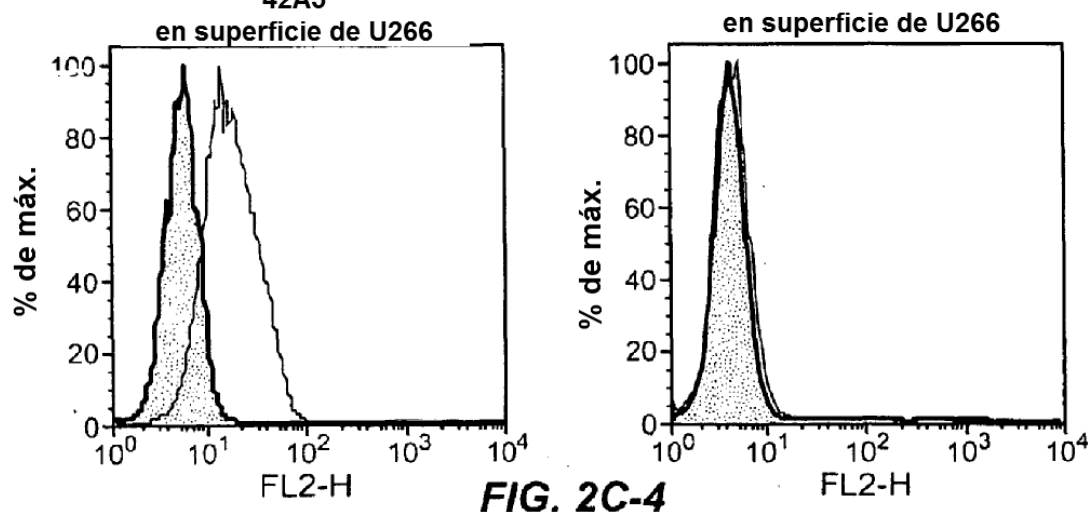
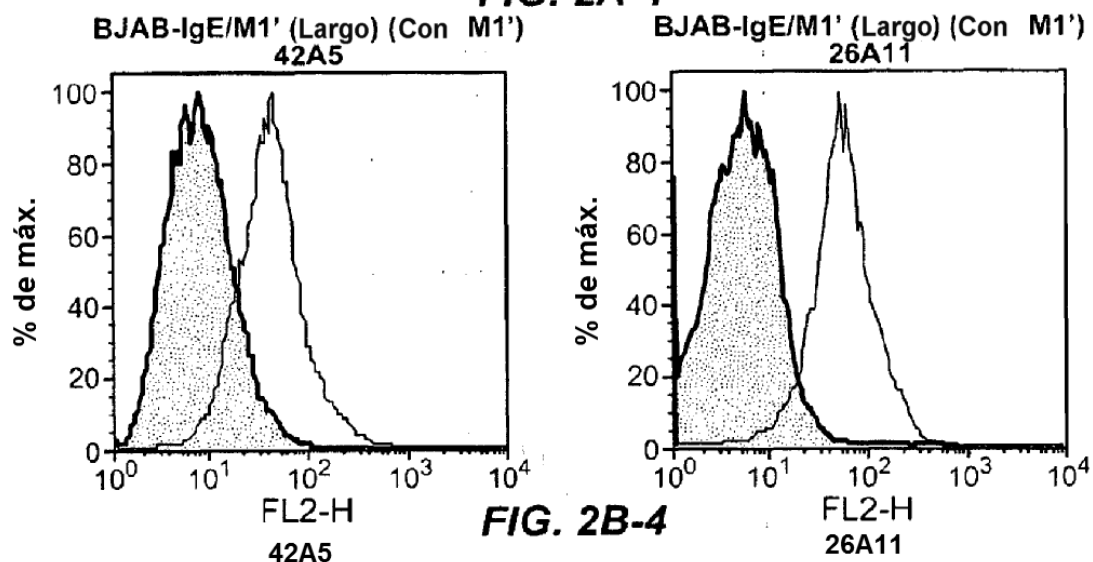
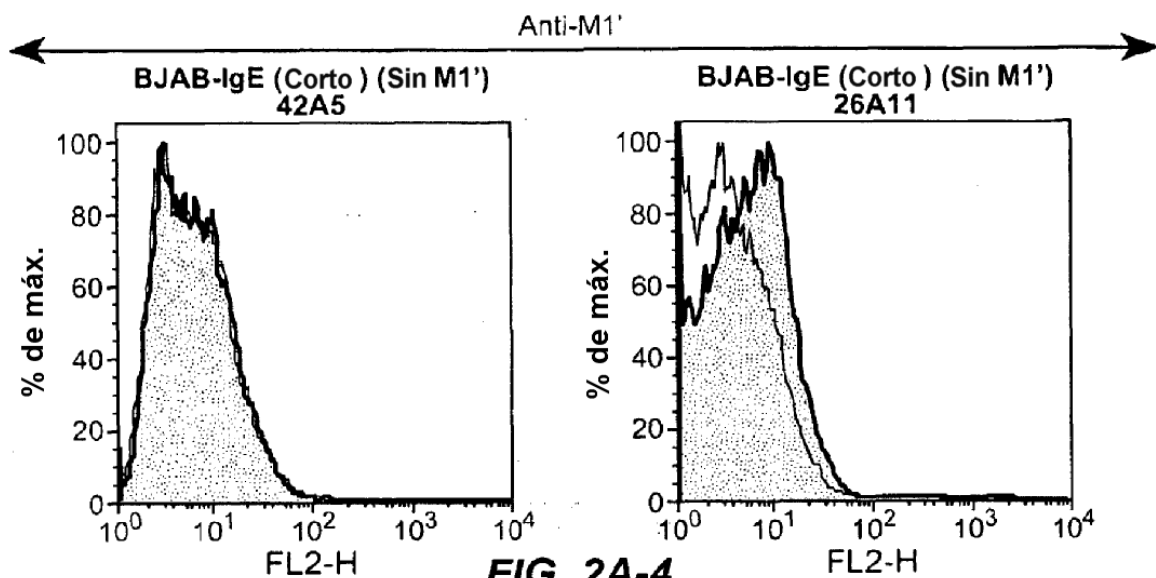
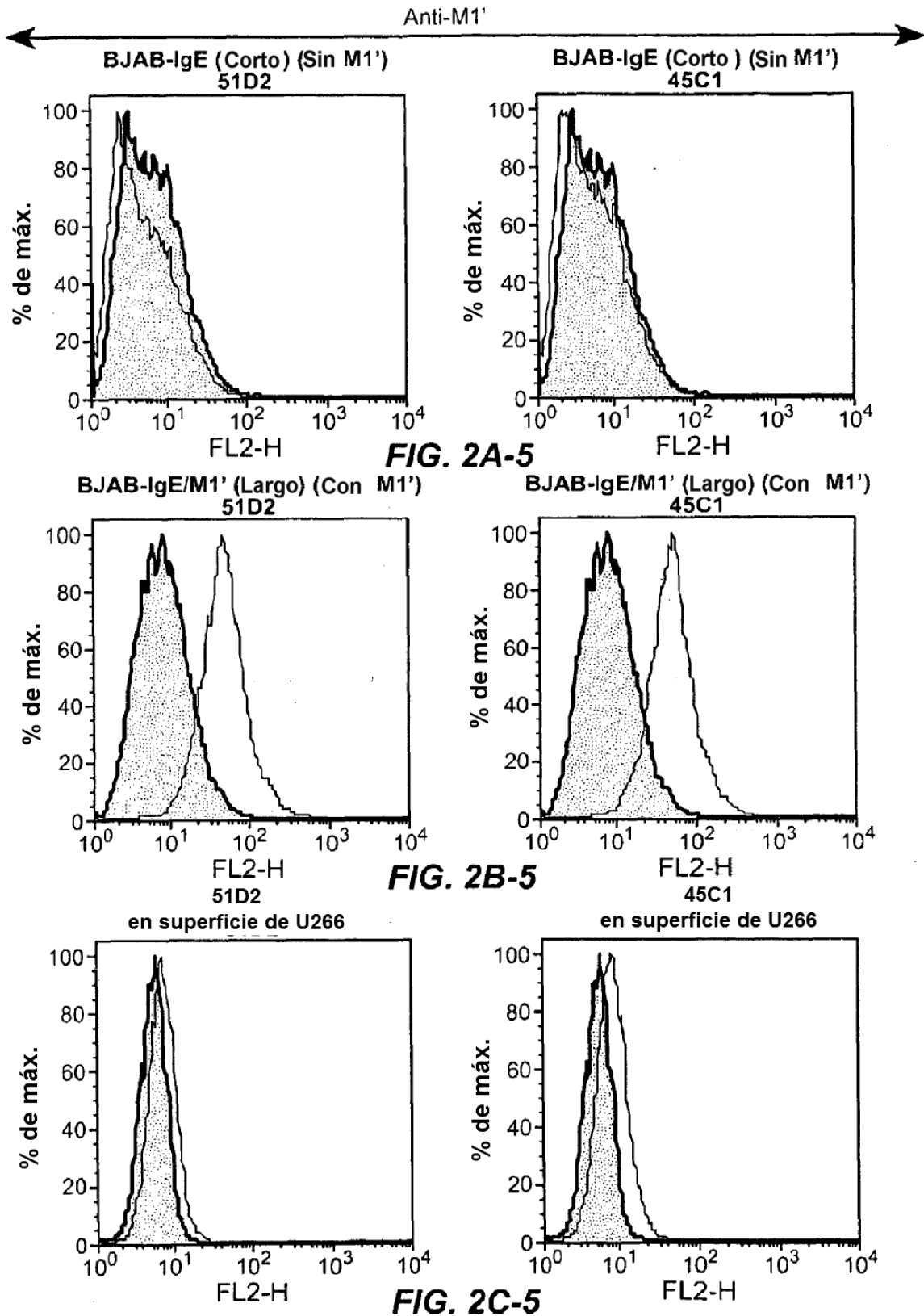


FIG. 2C-3





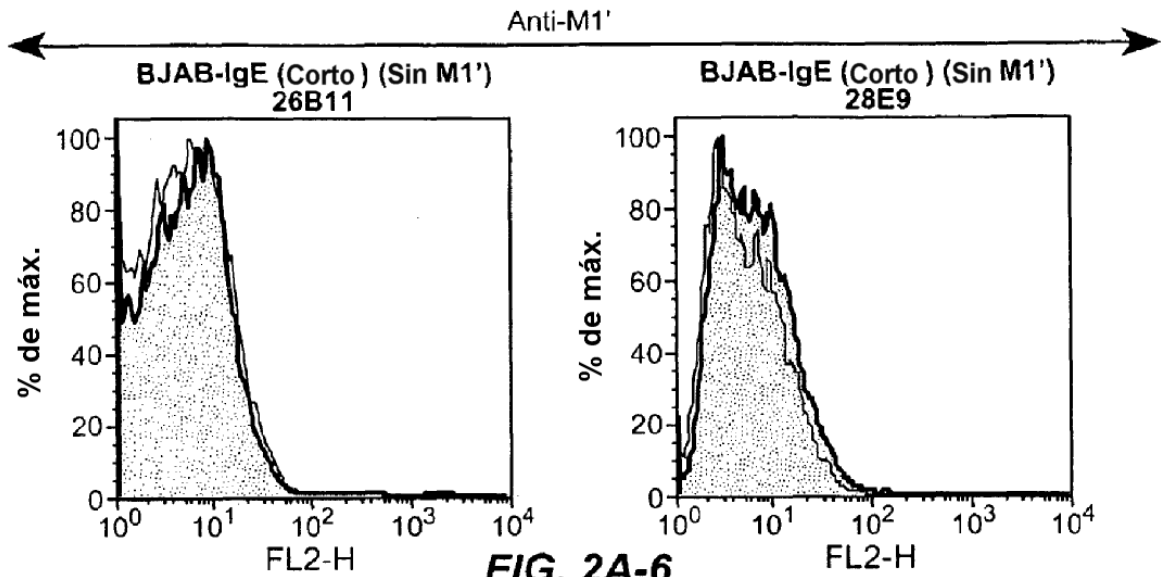


FIG. 2A-6

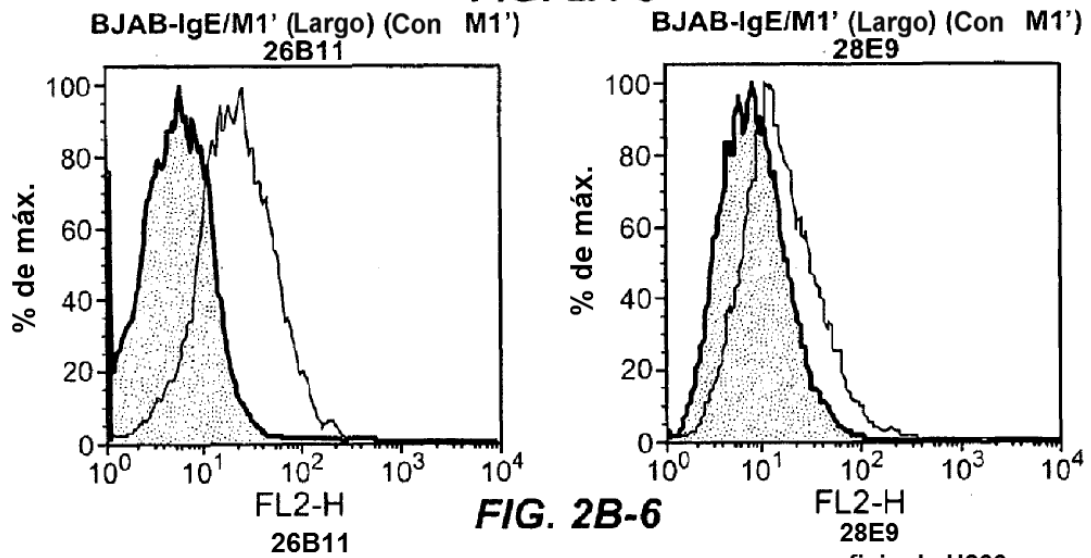


FIG. 2B-6

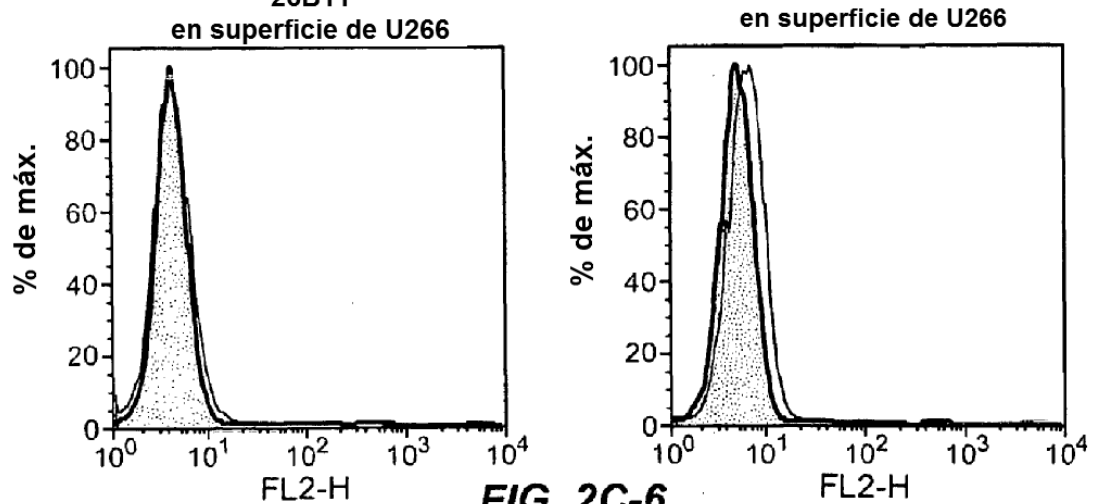


FIG. 2C-6

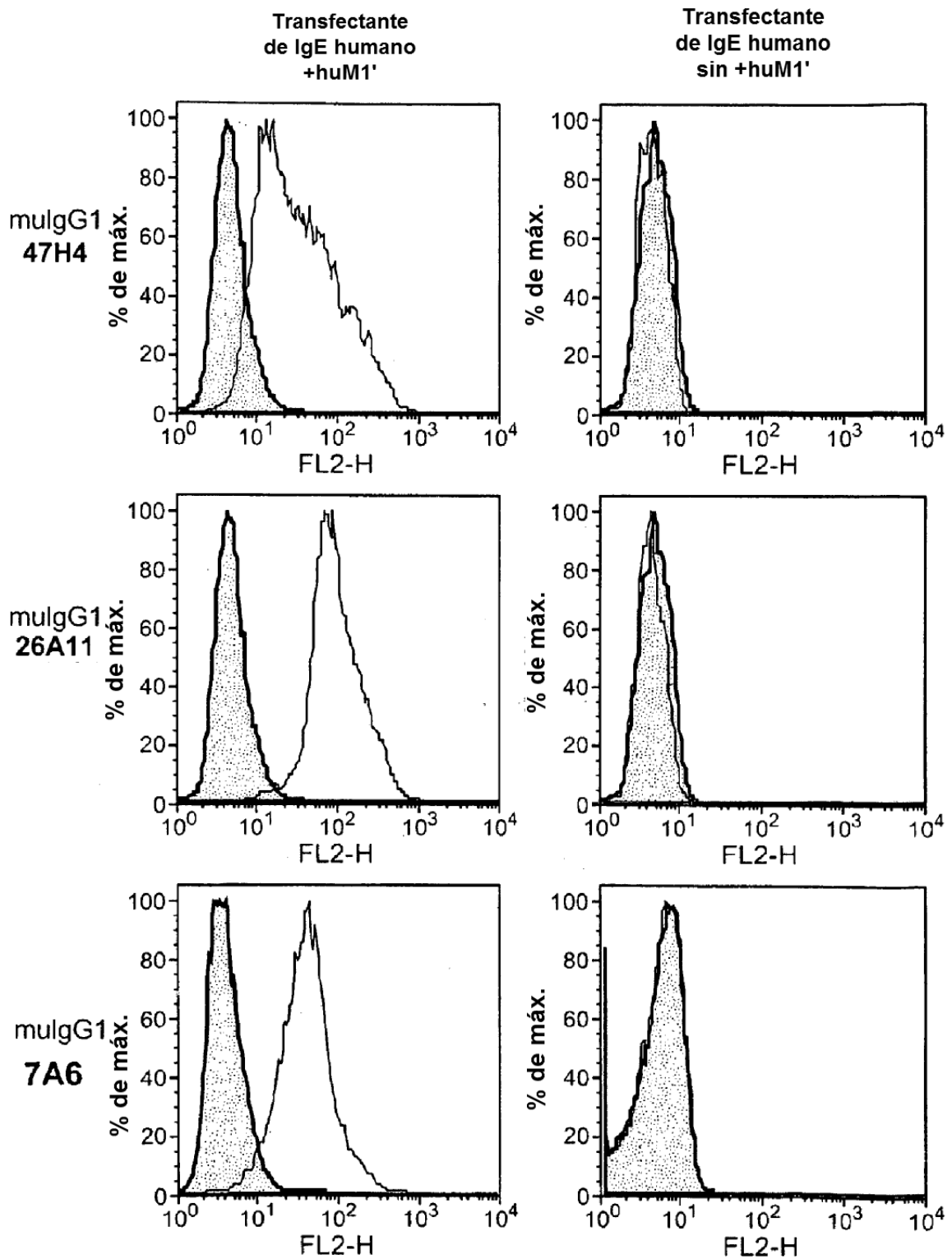


FIG. 2D

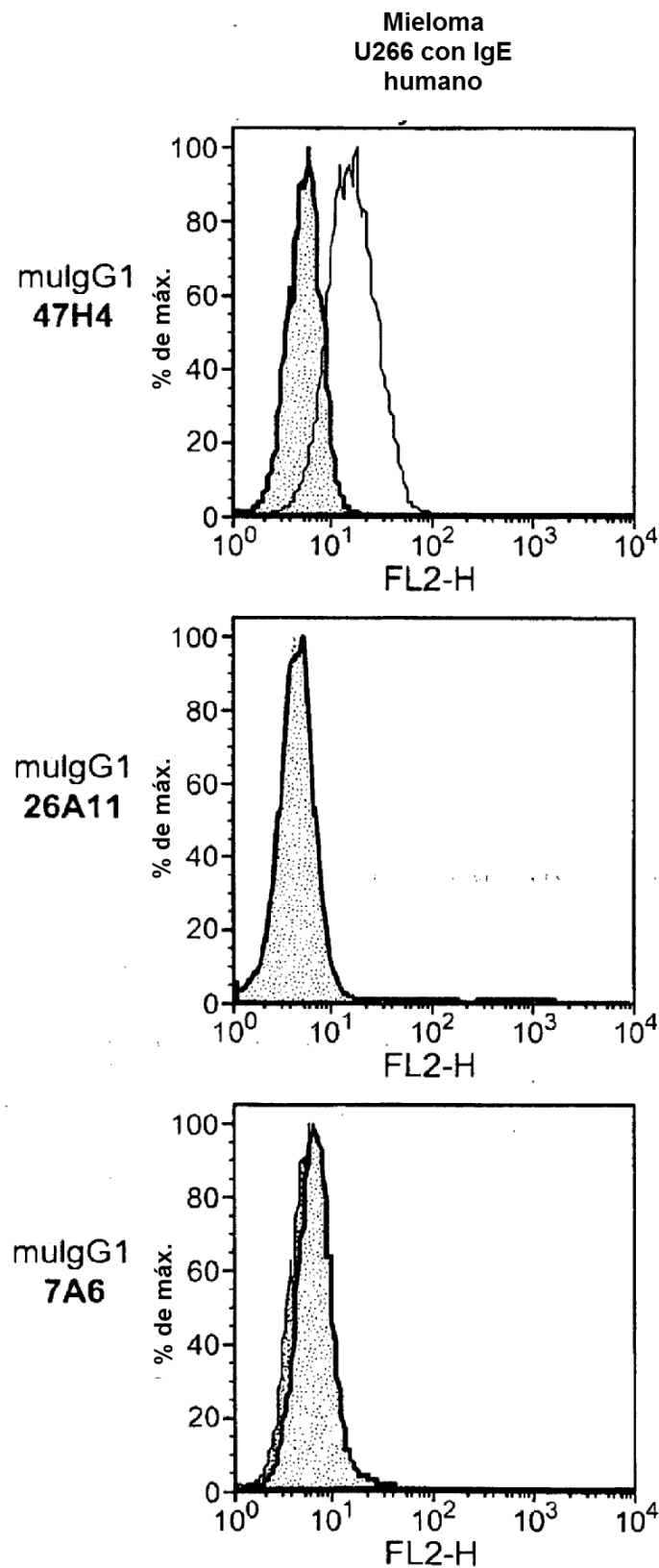


FIG. 2E

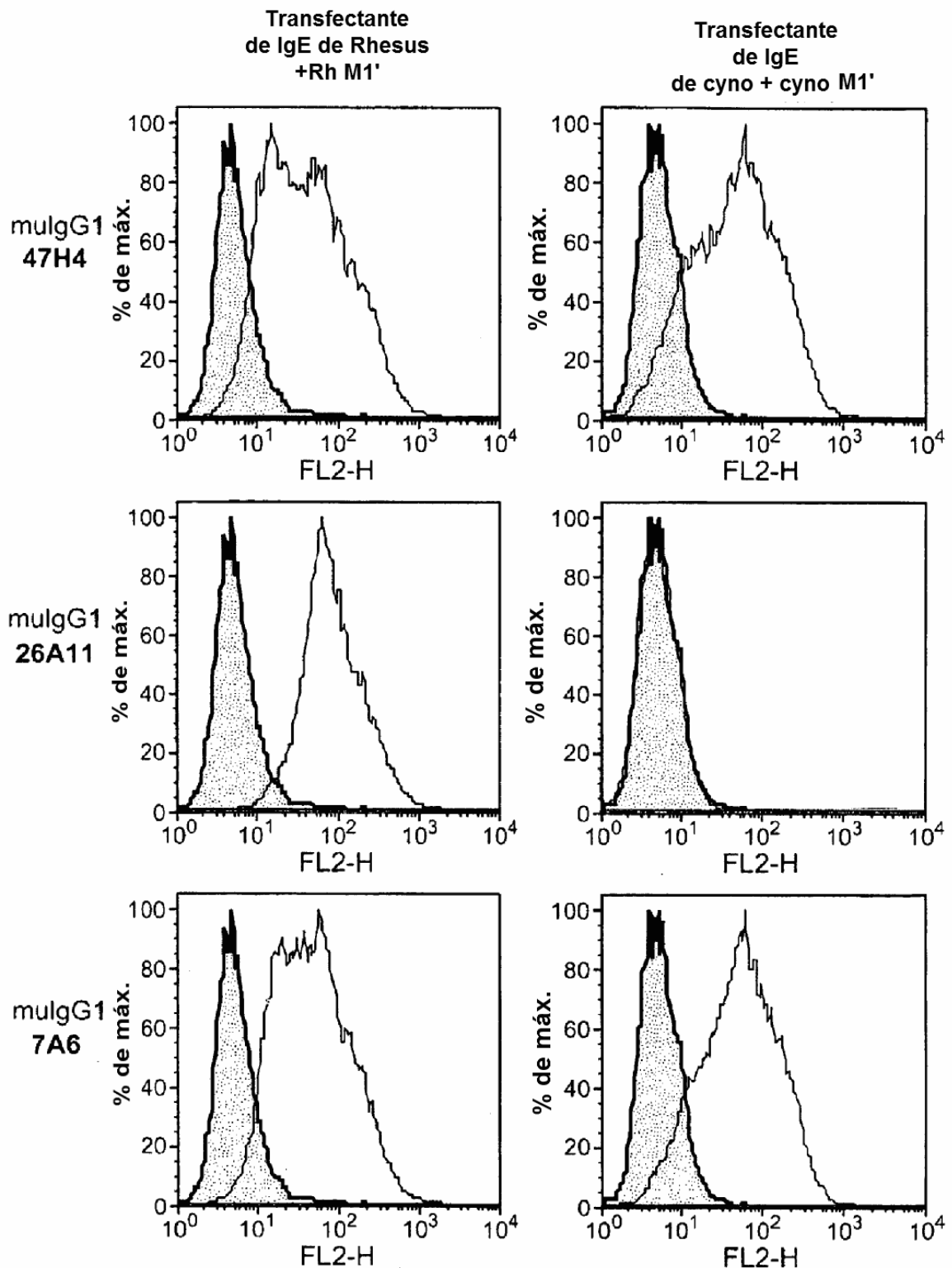


FIG. 2F

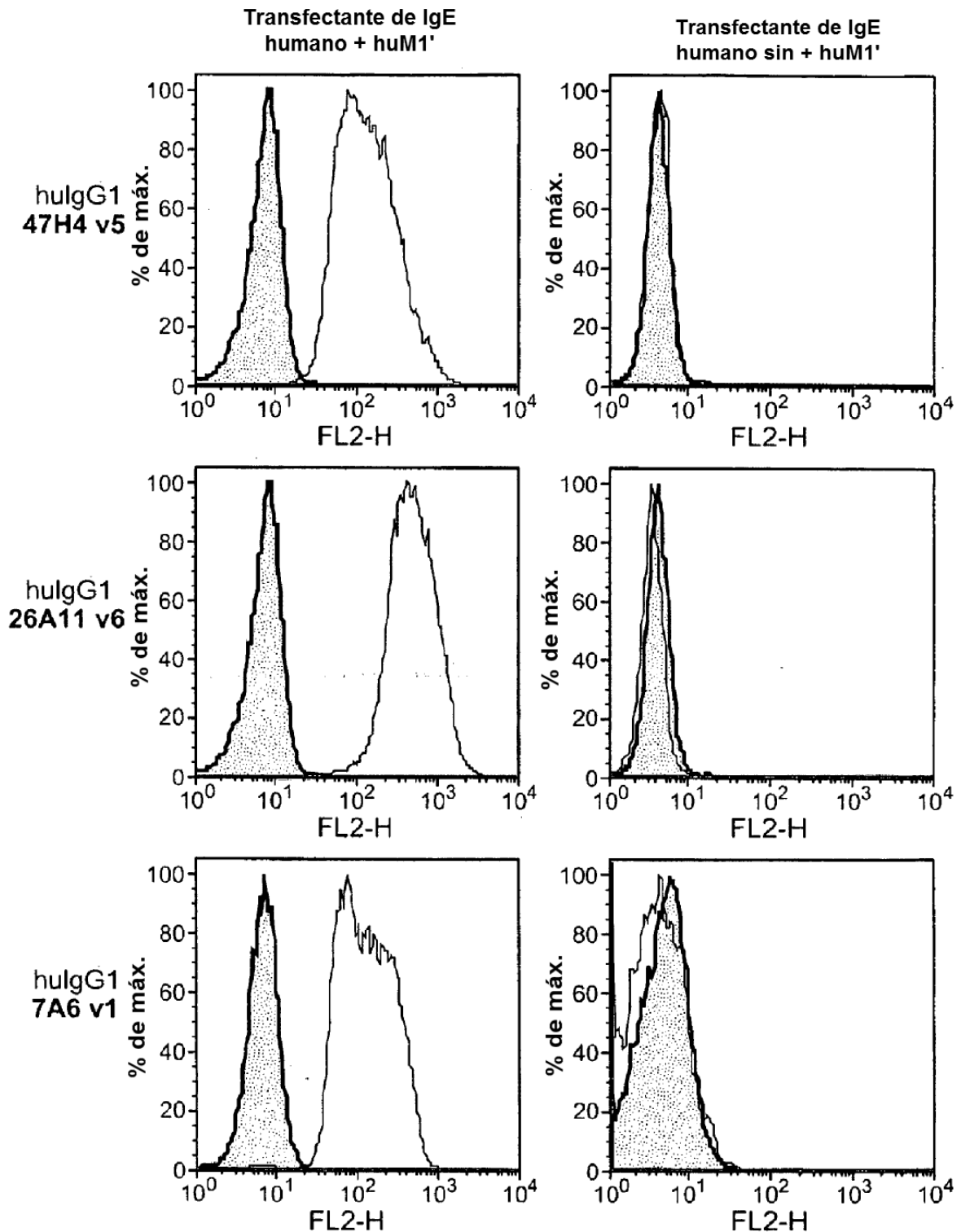
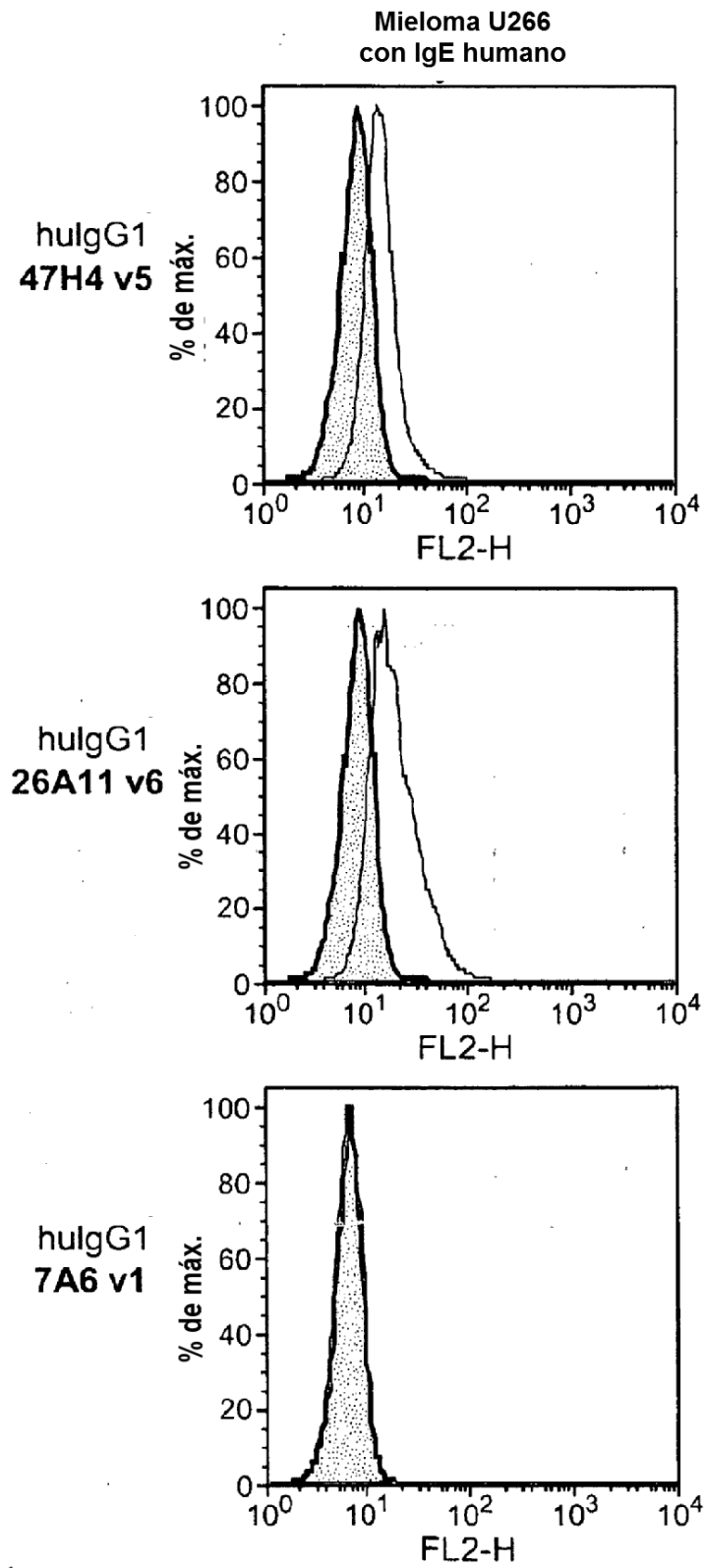


FIG. 2G



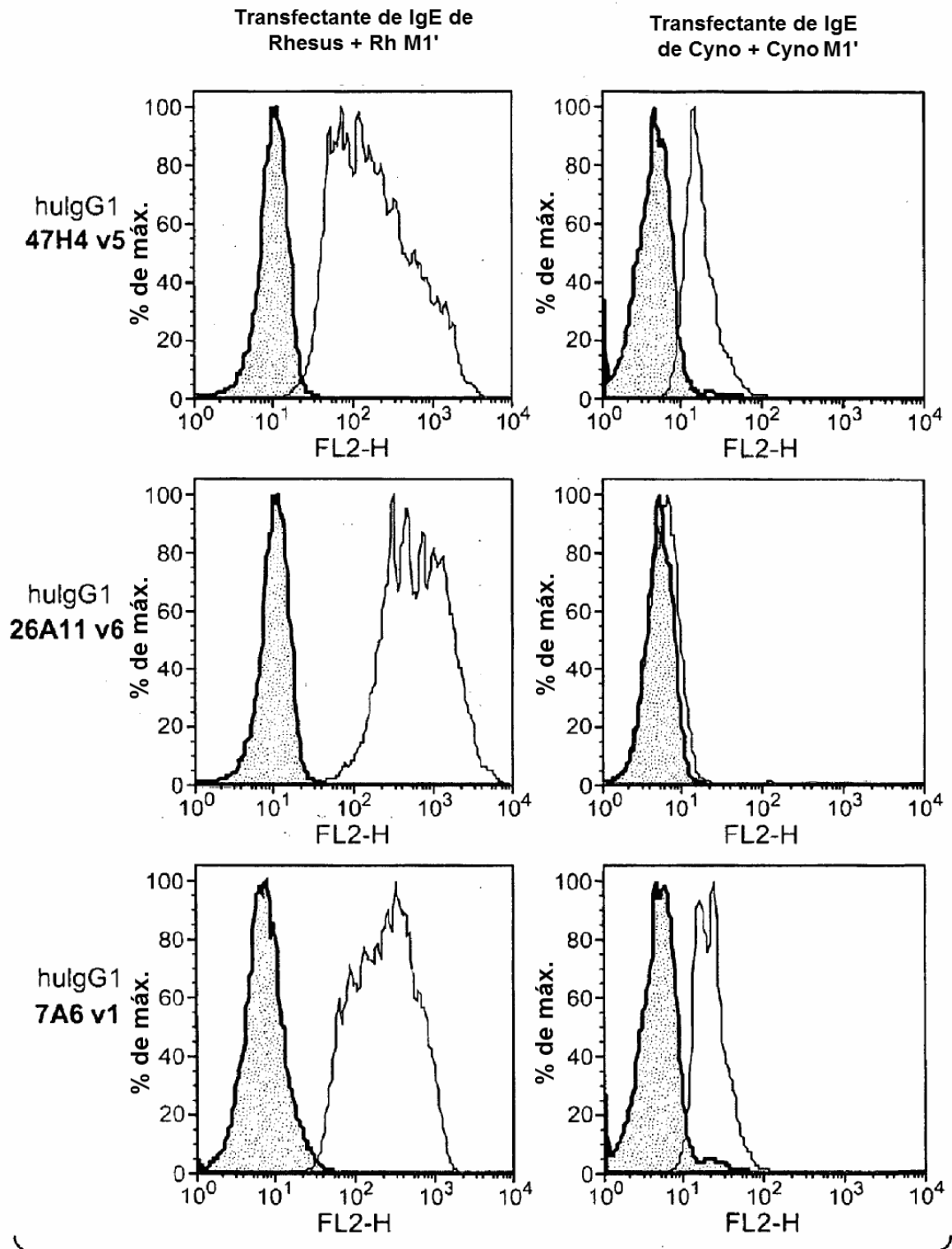


FIG. 2I

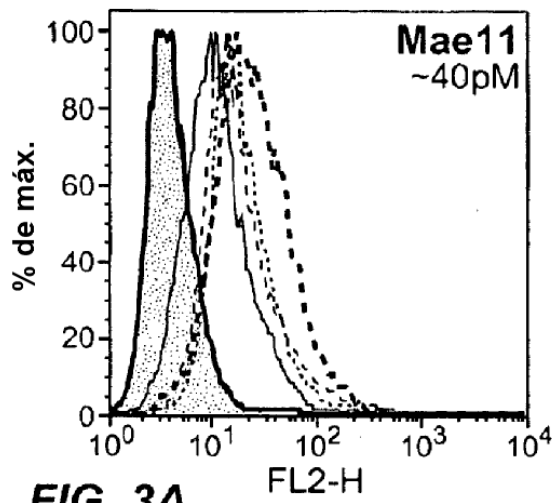


FIG. 3A

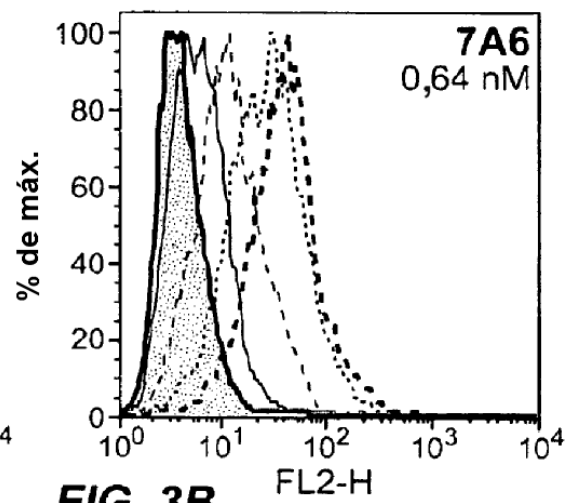


FIG. 3B

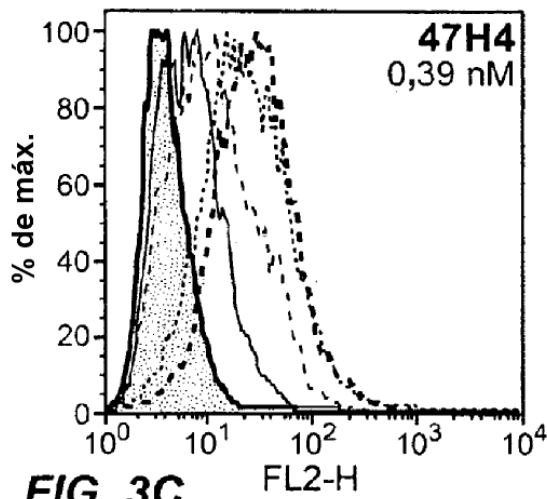


FIG. 3C

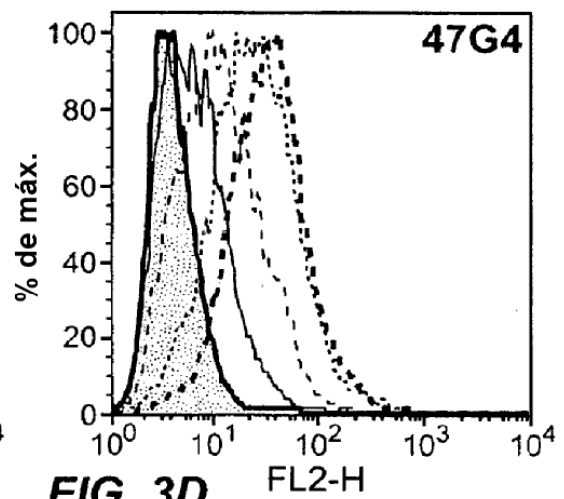


FIG. 3D

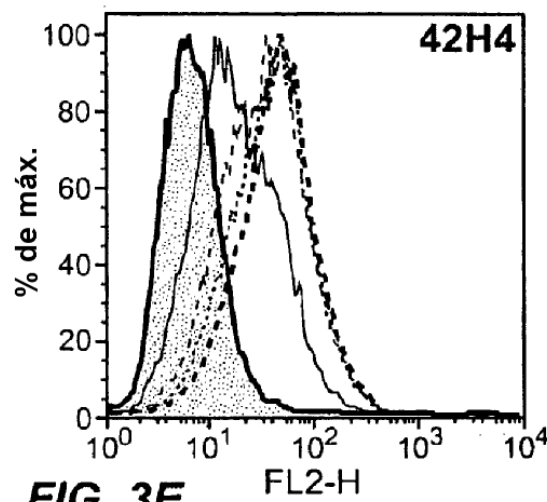


FIG. 3E

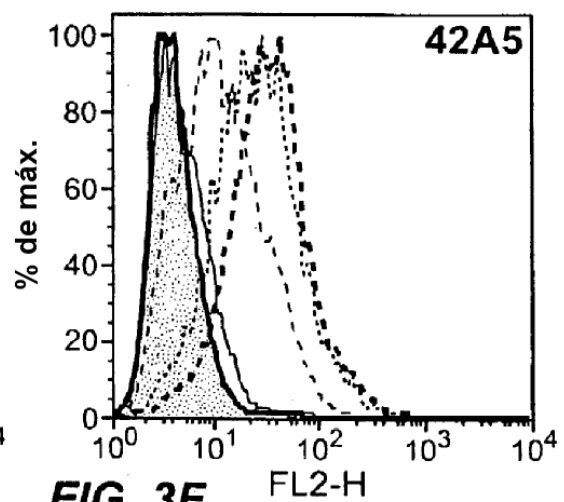
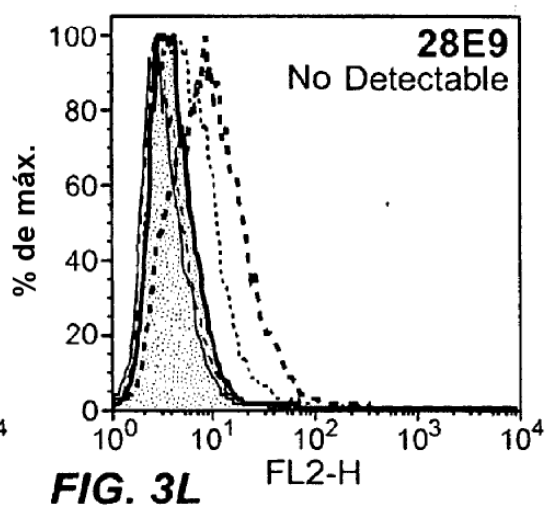
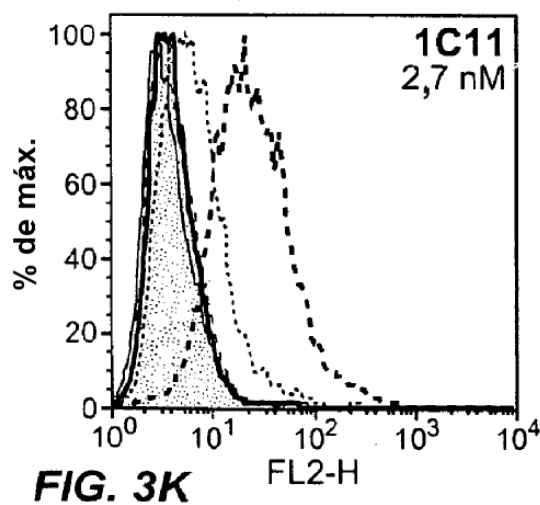
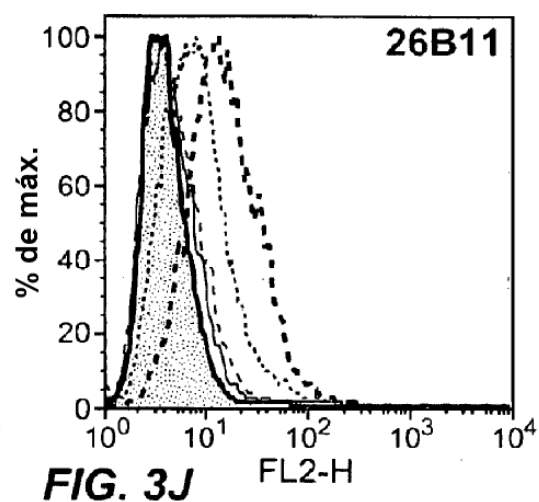
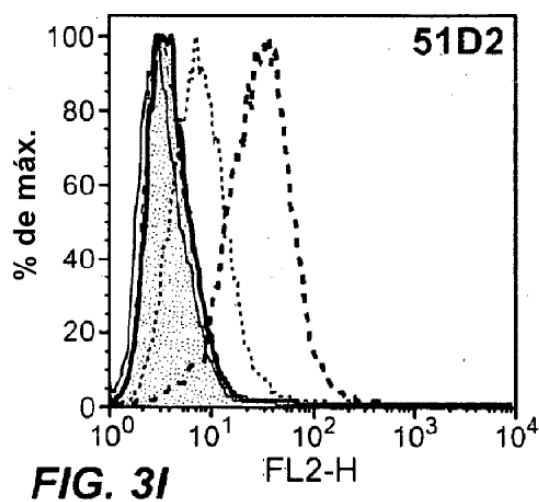
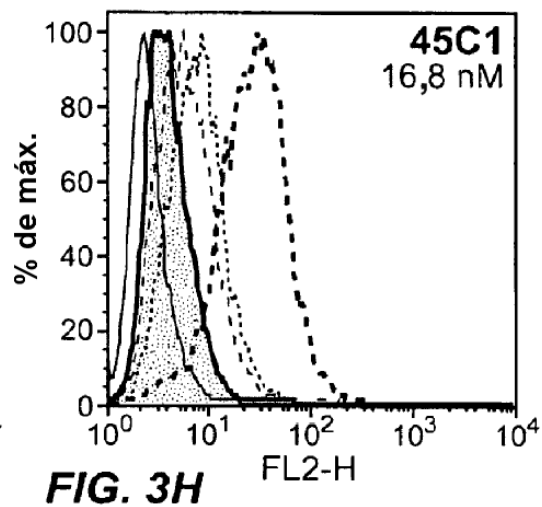
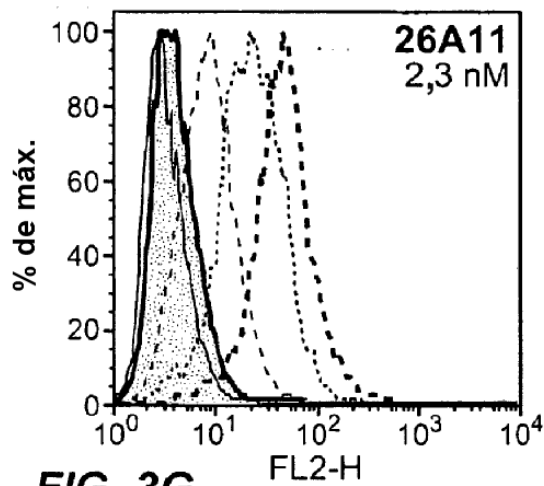
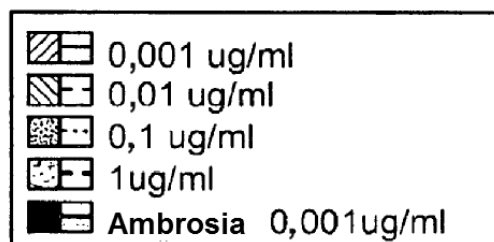
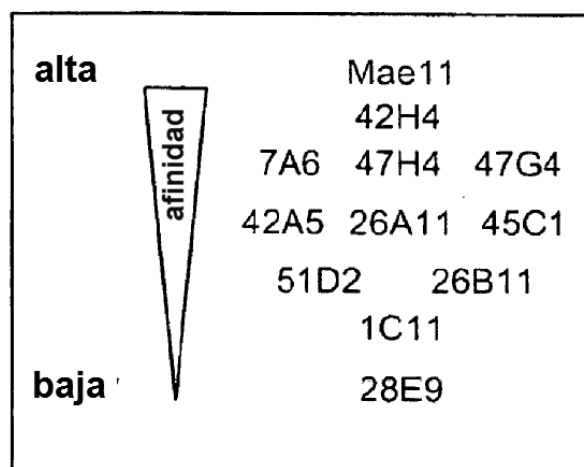


FIG. 3F



** Resultados de Scatchard

**FIG. 3M****FIG. 3N****Afinidades de unión de anti-IgE/M1' humanizado**

	M1' humano Scatchard (nM)			M1' de Rhesus Scatchard (nM)	M1' de Cyno Scatchard (nM)
	Medido	Media	D.T.		
mIgG1 47H4				0,77	0,97
-exp. 1	0,74 0,83	0,79			
-exp. 2	0,55 0,52	0,54			
-exp. 3	0,47 0,30	0,39			
Global		0,57	0,190936		
mIgG1 26A11					
-exp. 1	1,68 2,59	2,14			
-exp. 2	1,20 2,30	1,75			
Global		1,94	0,623772		
mIgG1 7A6		0,64		nd	nd

FIG. 3O

	M1' humano Scatchard (nM)	M1' de Rhesus Scatchard (nM)	M1' de Cyno Scatchard (nM)
hulgG1 47H4 v5	1,5	1,3	2,5
hulgG1 47H4 v2	0,54	nd	nd
hulgG1 47H4 v1	0,37	nd	nd
hulgG1 26A11 v6	1,85	nd	nd
hulgG1 26A11 v14	1,5	nd	nd
hulgG1 26A11 v11	1,06	nd	nd

FIG. 3P

FIG. 4A-1	FIG. 4A-2	FIG. 4A-3	FIG. 4A-4	FIG. 4A-5
FIG. 4A-6	FIG. 4A-7	FIG. 4A-8	FIG. 4A-9	FIG. 4A-10
FIG. 4A-11	FIG. 4A-12	FIG. 4A-13	FIG. 4A-14	FIG. 4A-15
FIG. 4A-16	FIG. 4A-17	FIG. 4A-18	FIG. 4A-19	FIG. 4A-20

FIG. 4A

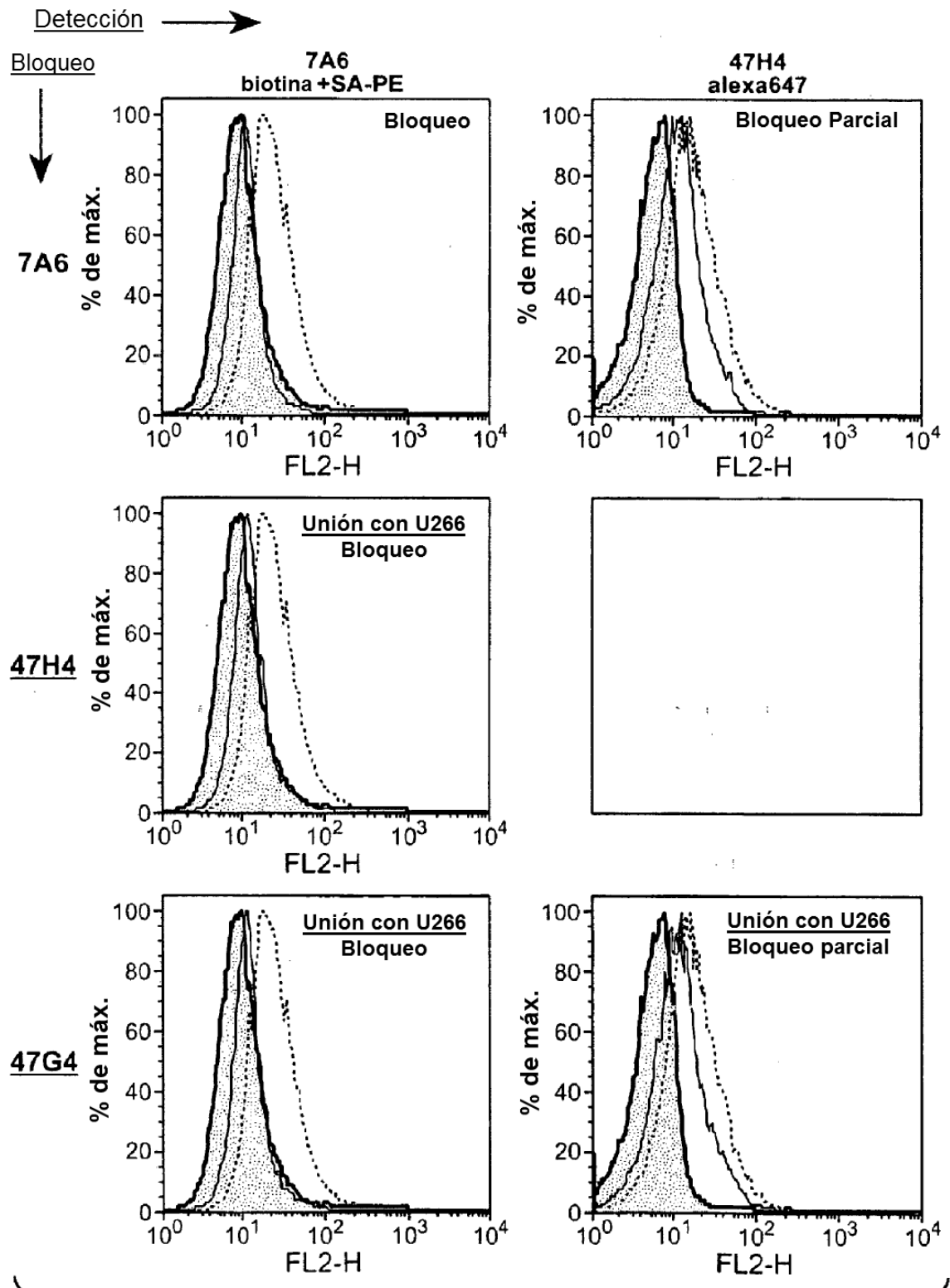


FIG. 4A-1

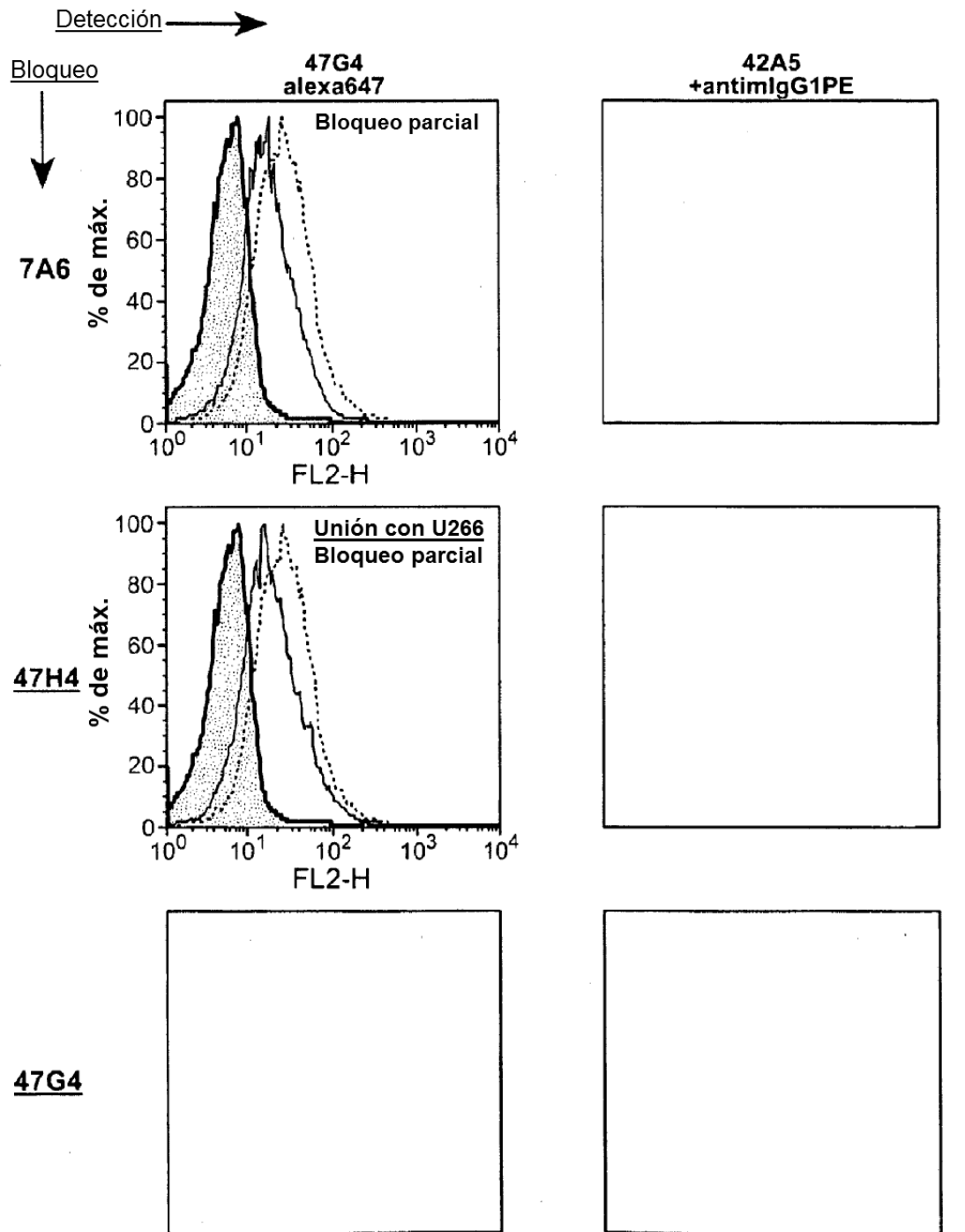


FIG. 4A-2

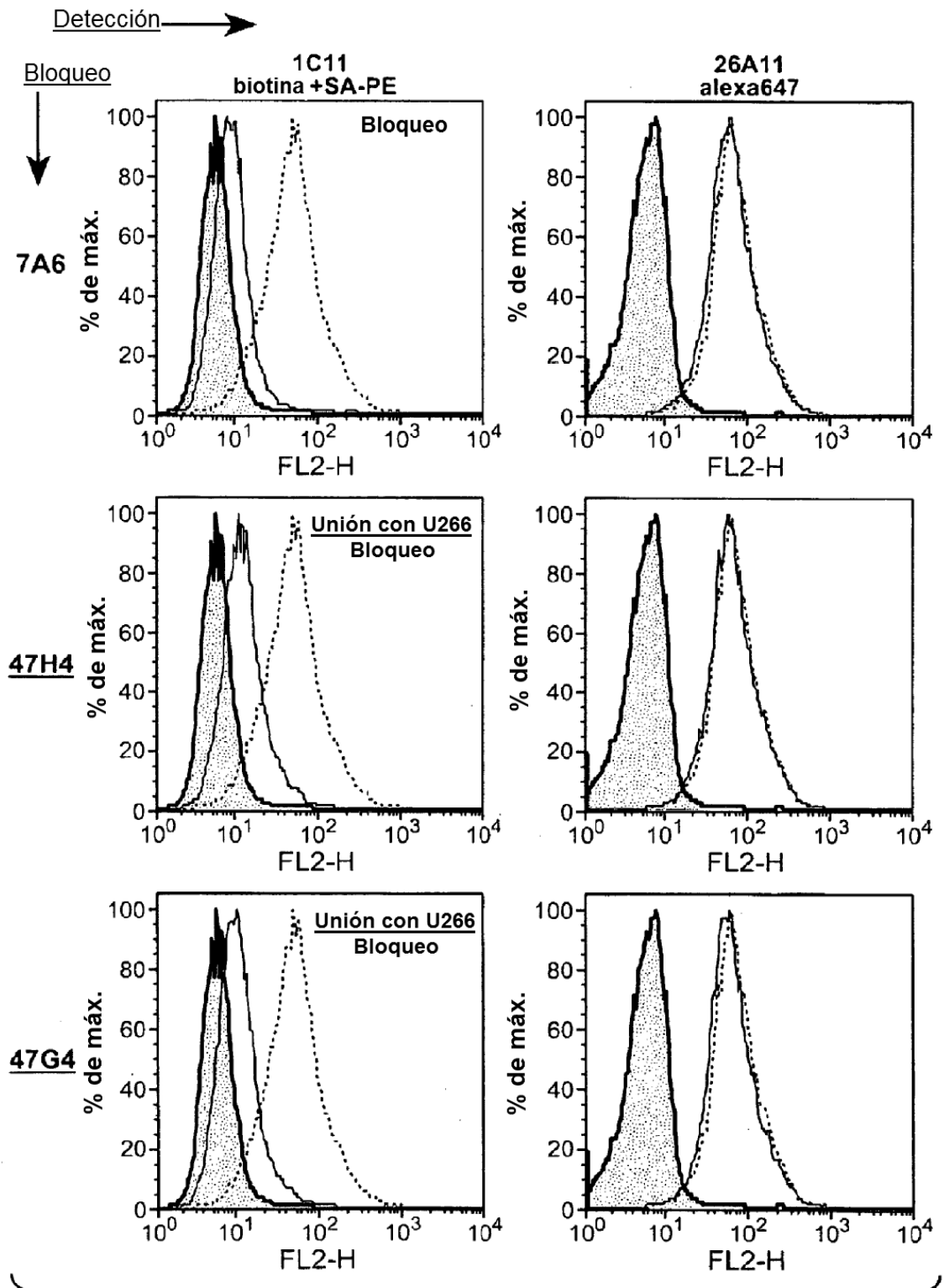


FIG. 4A-3

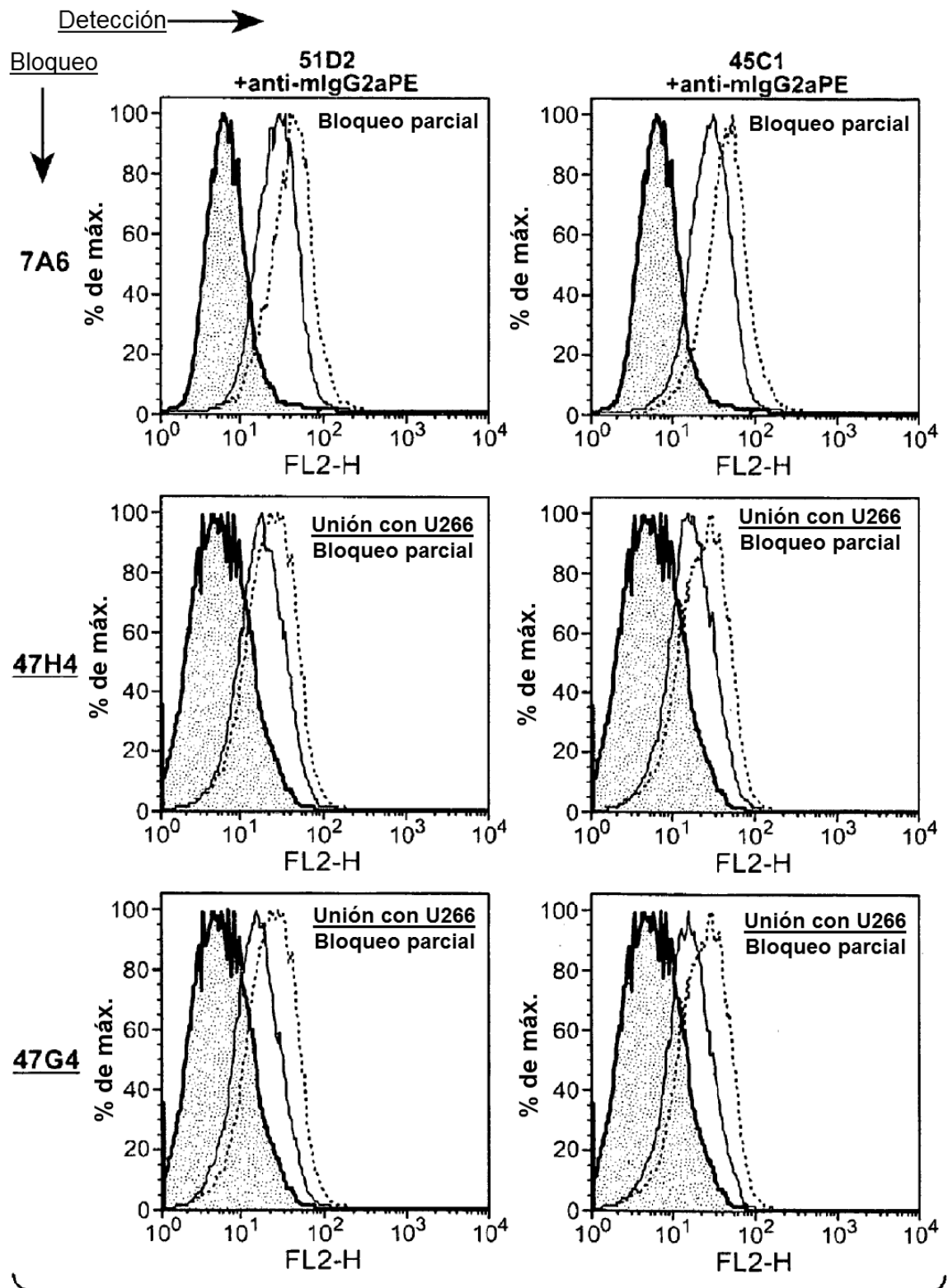


FIG. 4A-4

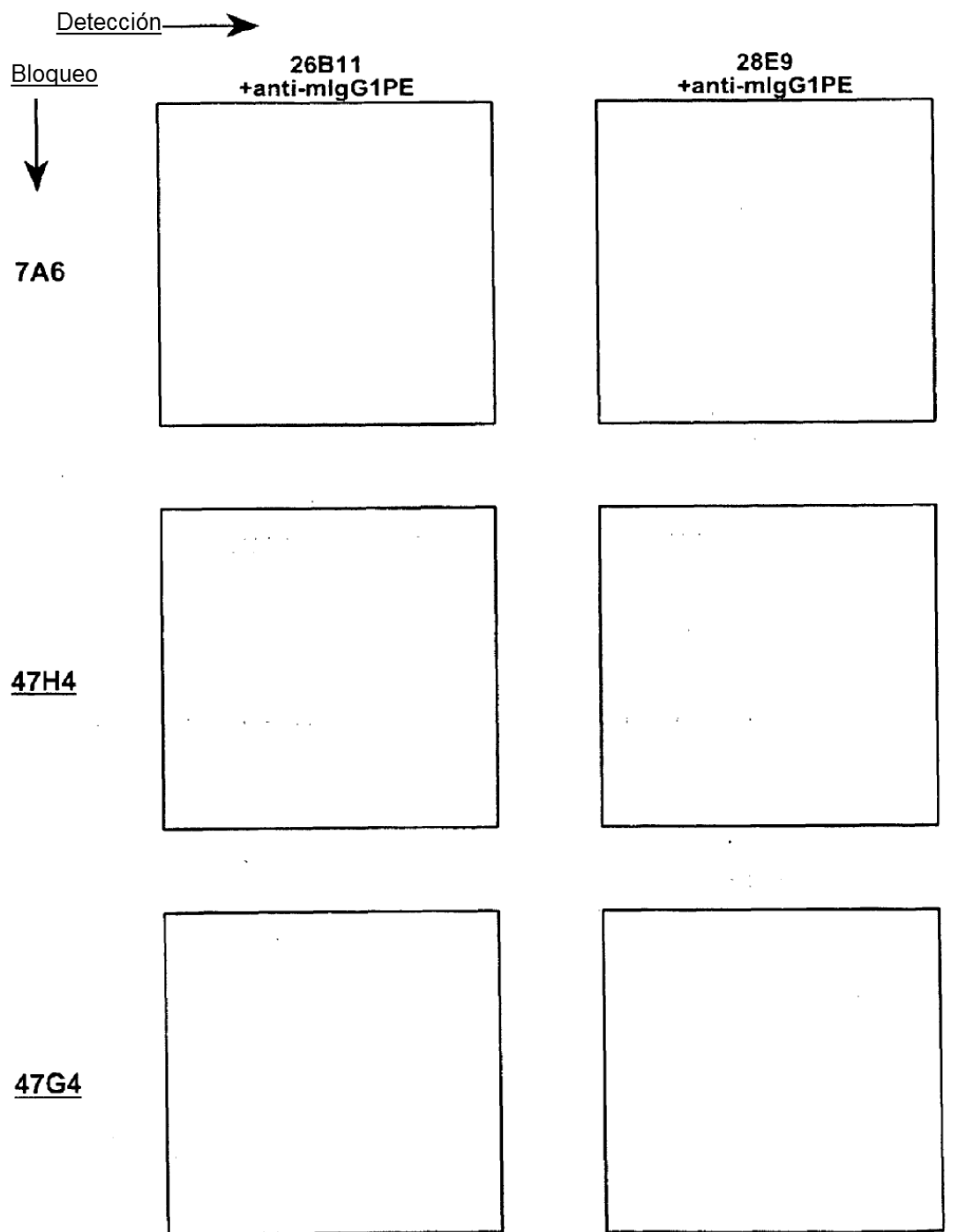


FIG. 4A-5

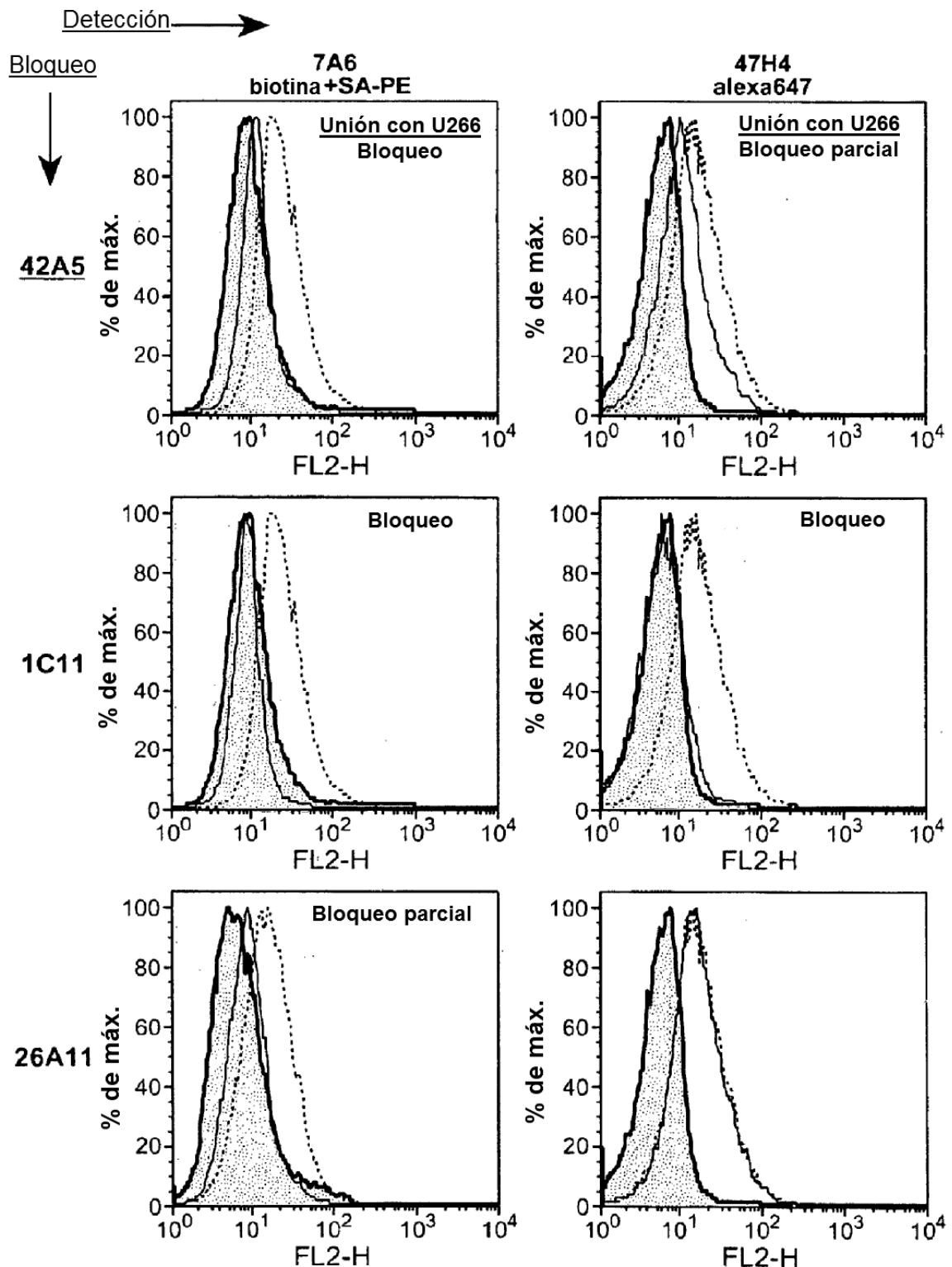


FIG. 4A-6

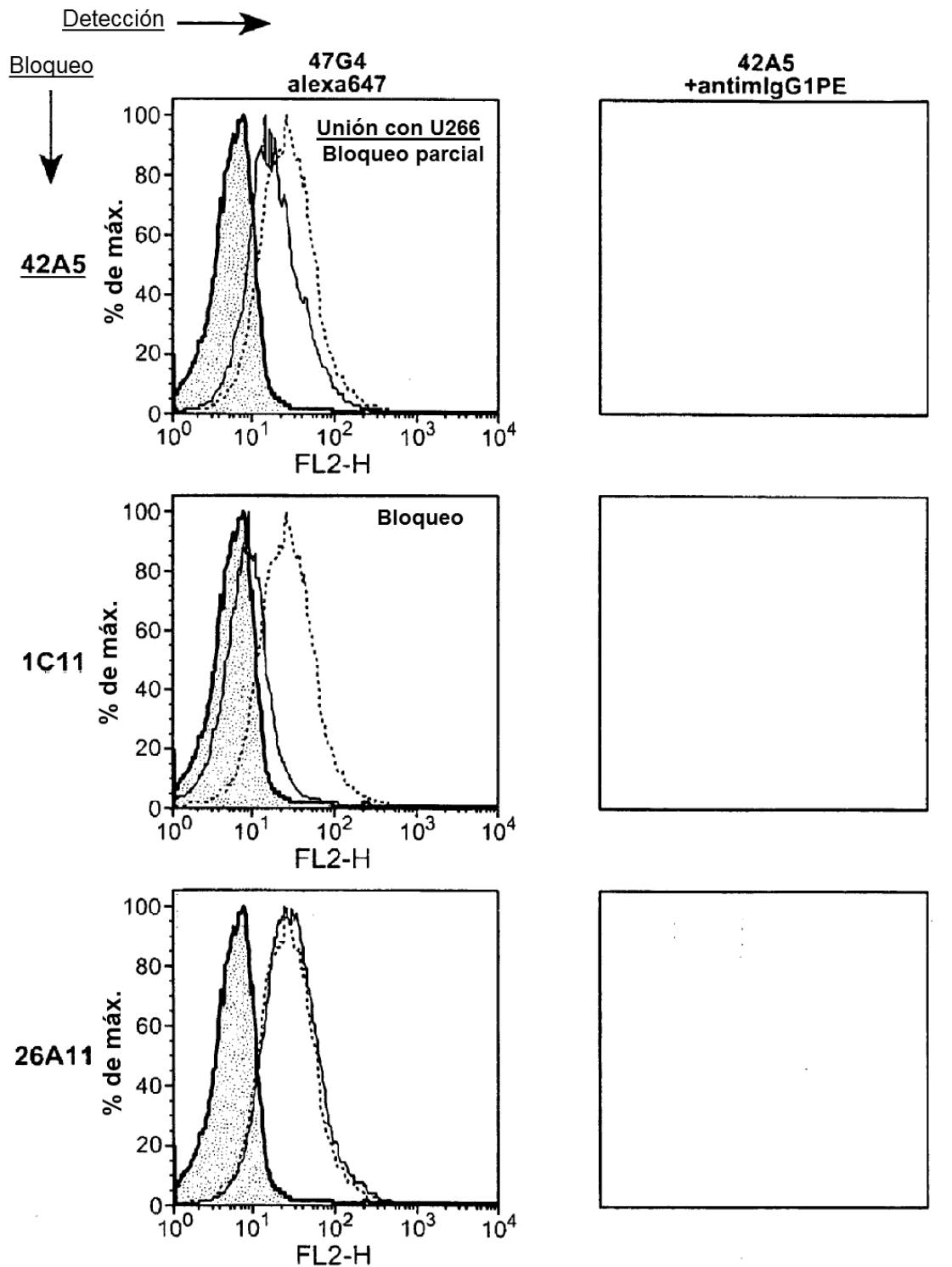


FIG. 4A-7

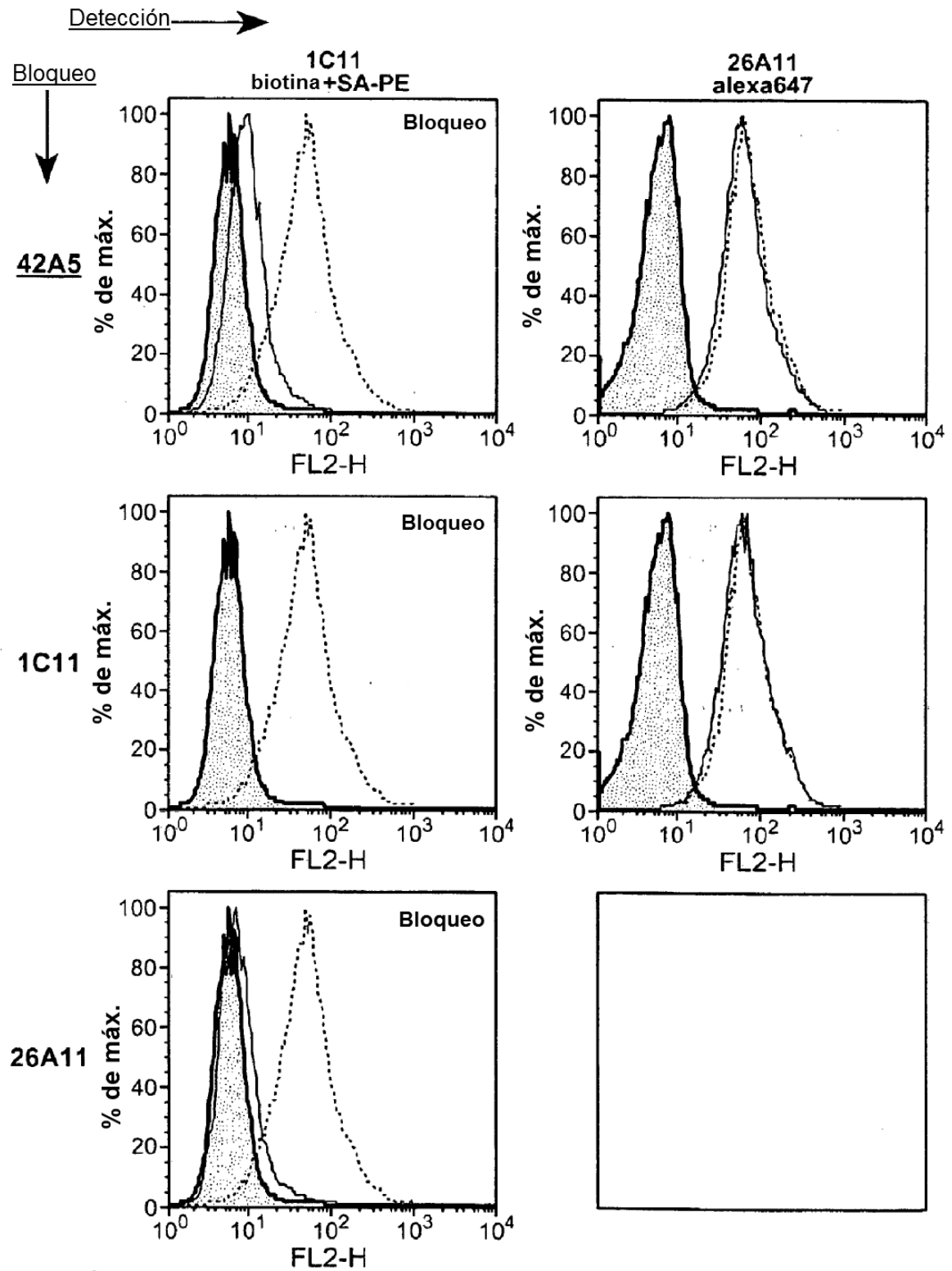


FIG. 4A-8

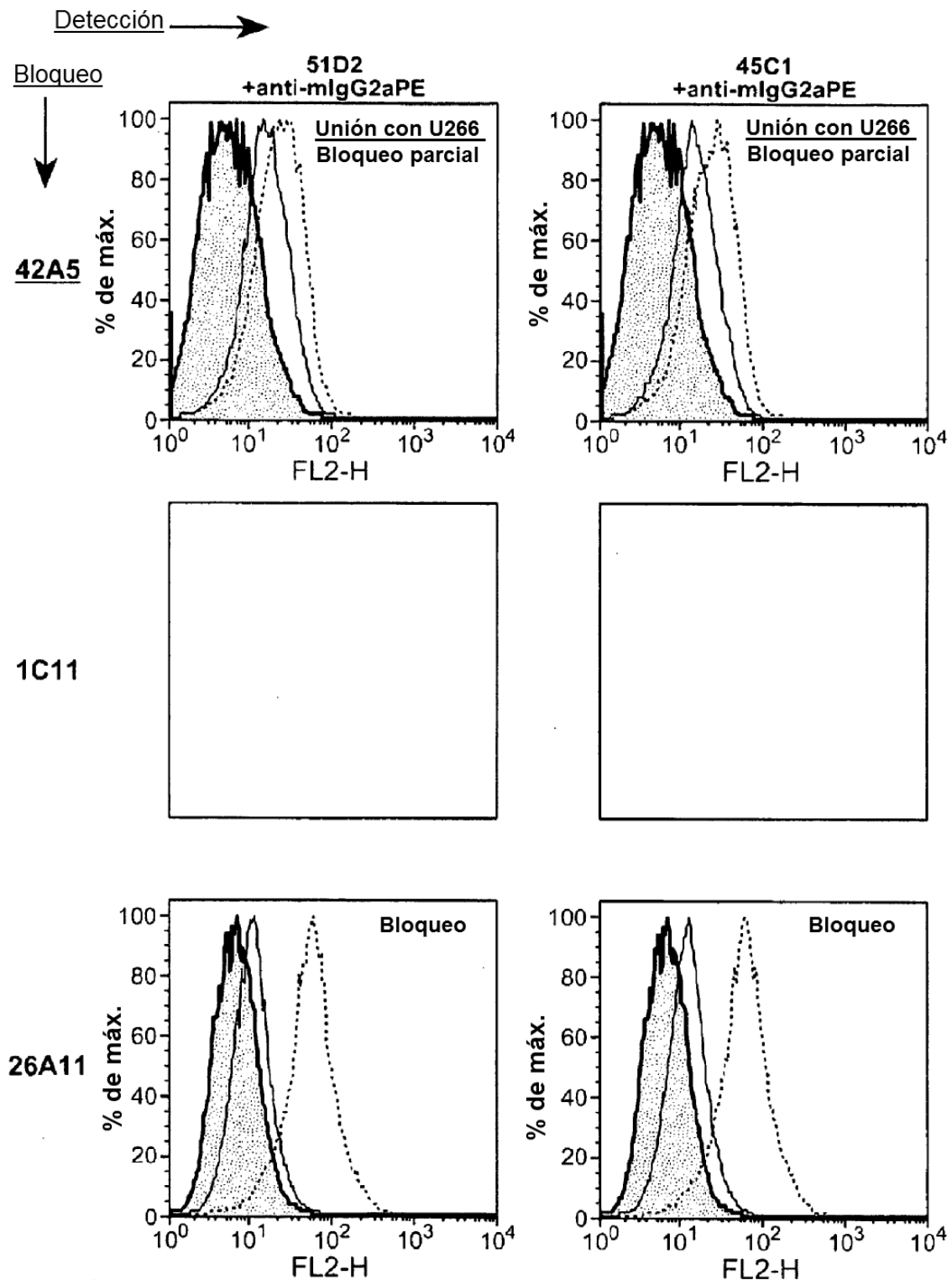


FIG. 4A-9

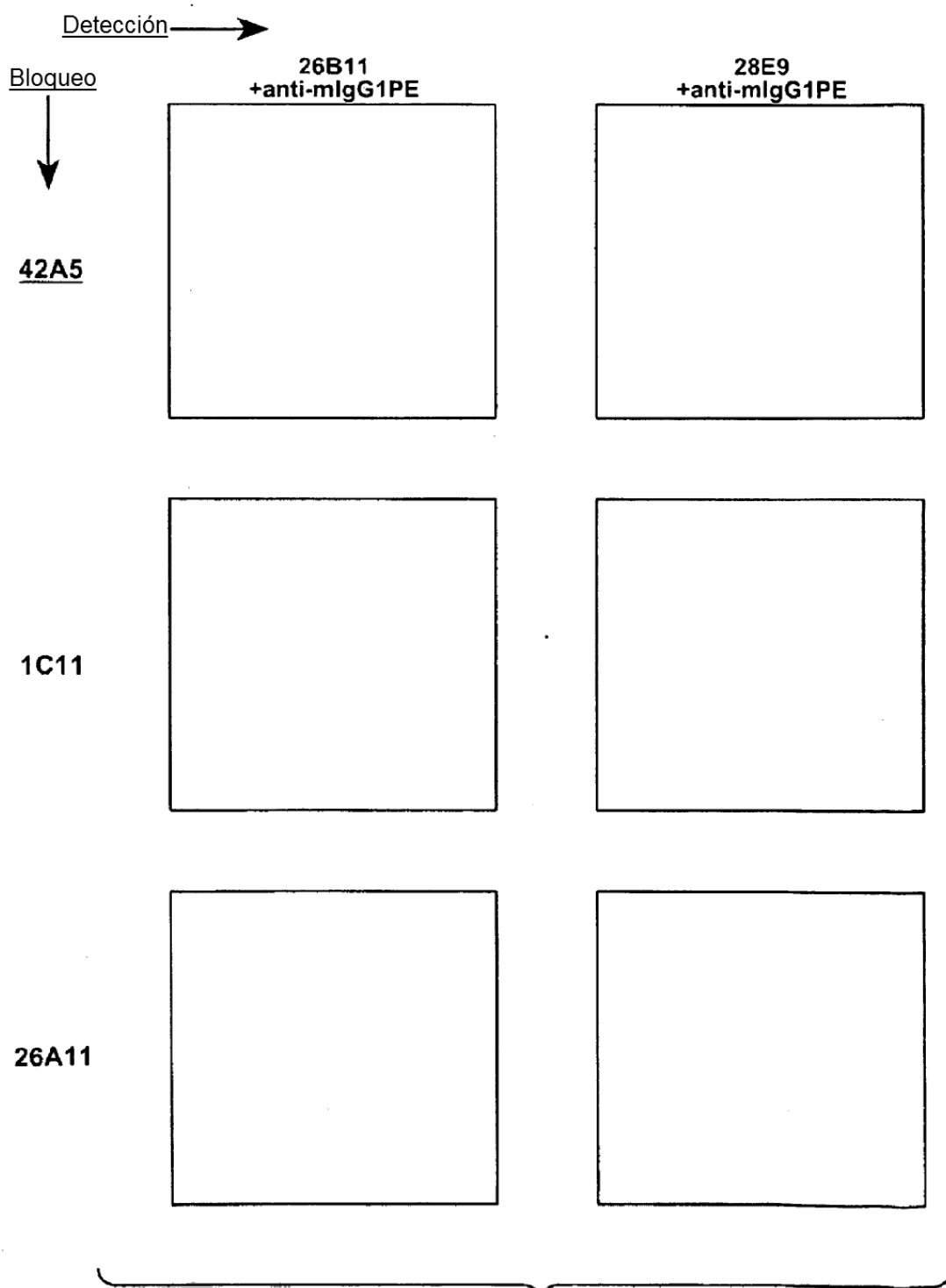


FIG. 4A-10

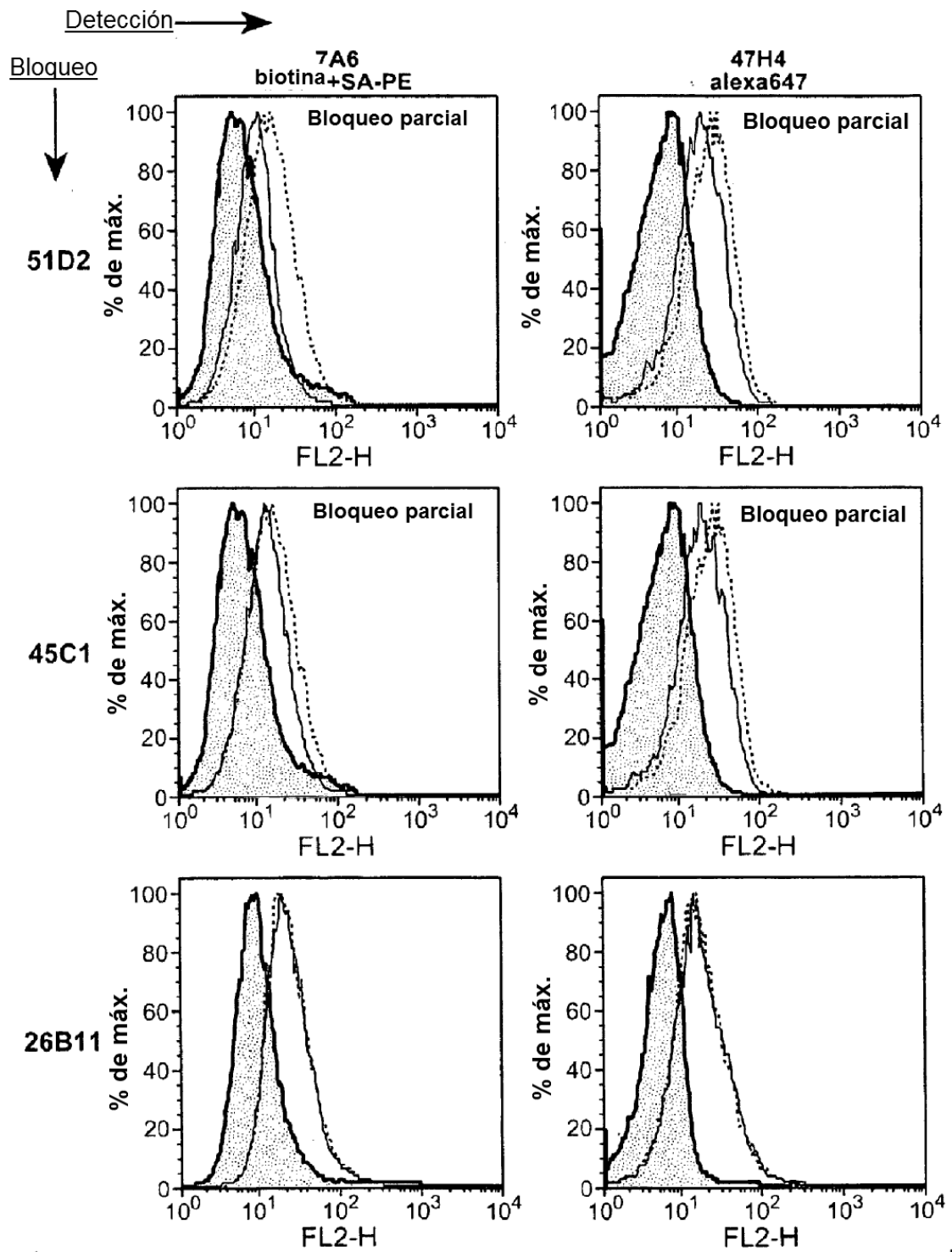


FIG. 4A-11

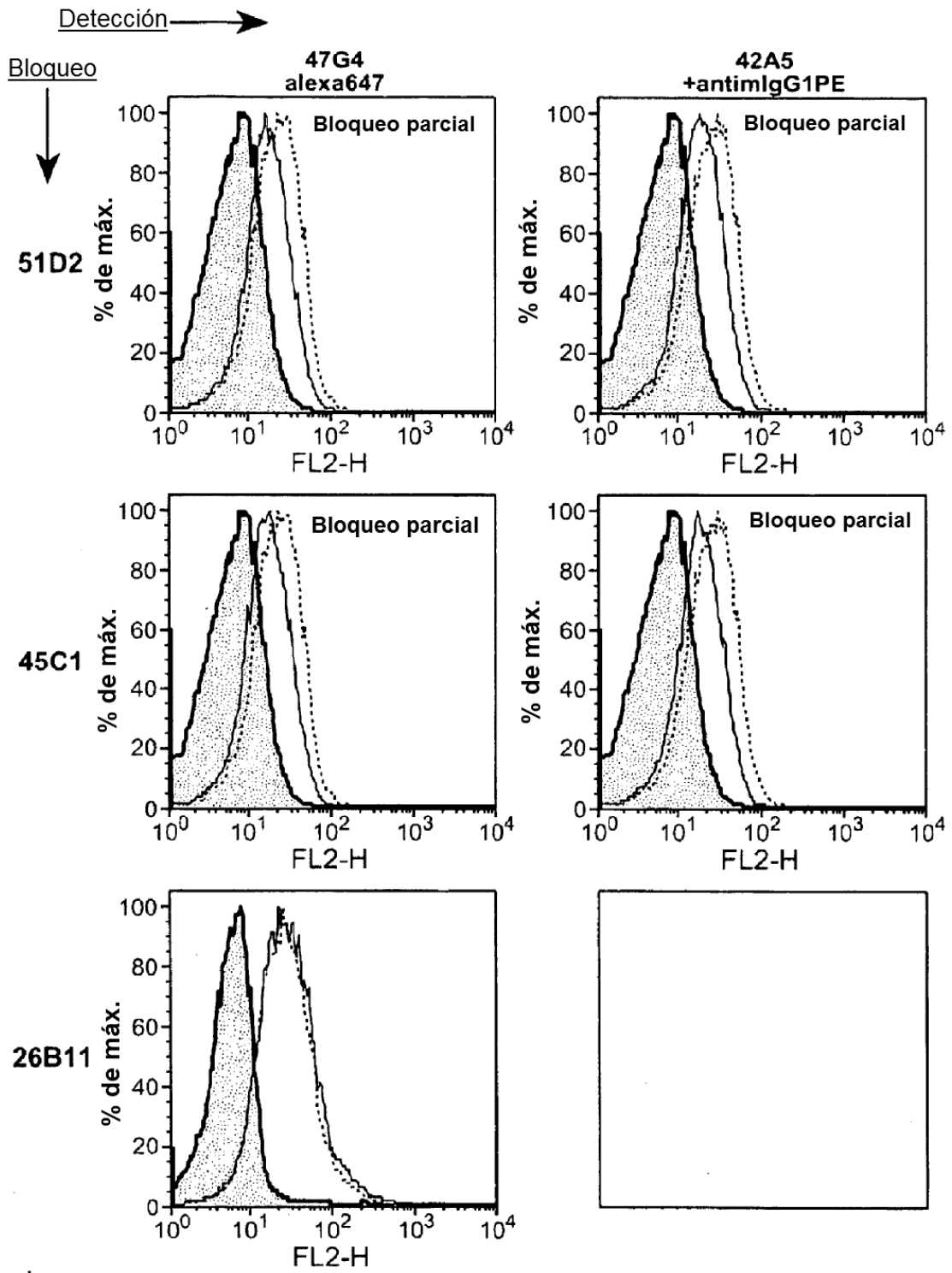


FIG. 4A-12

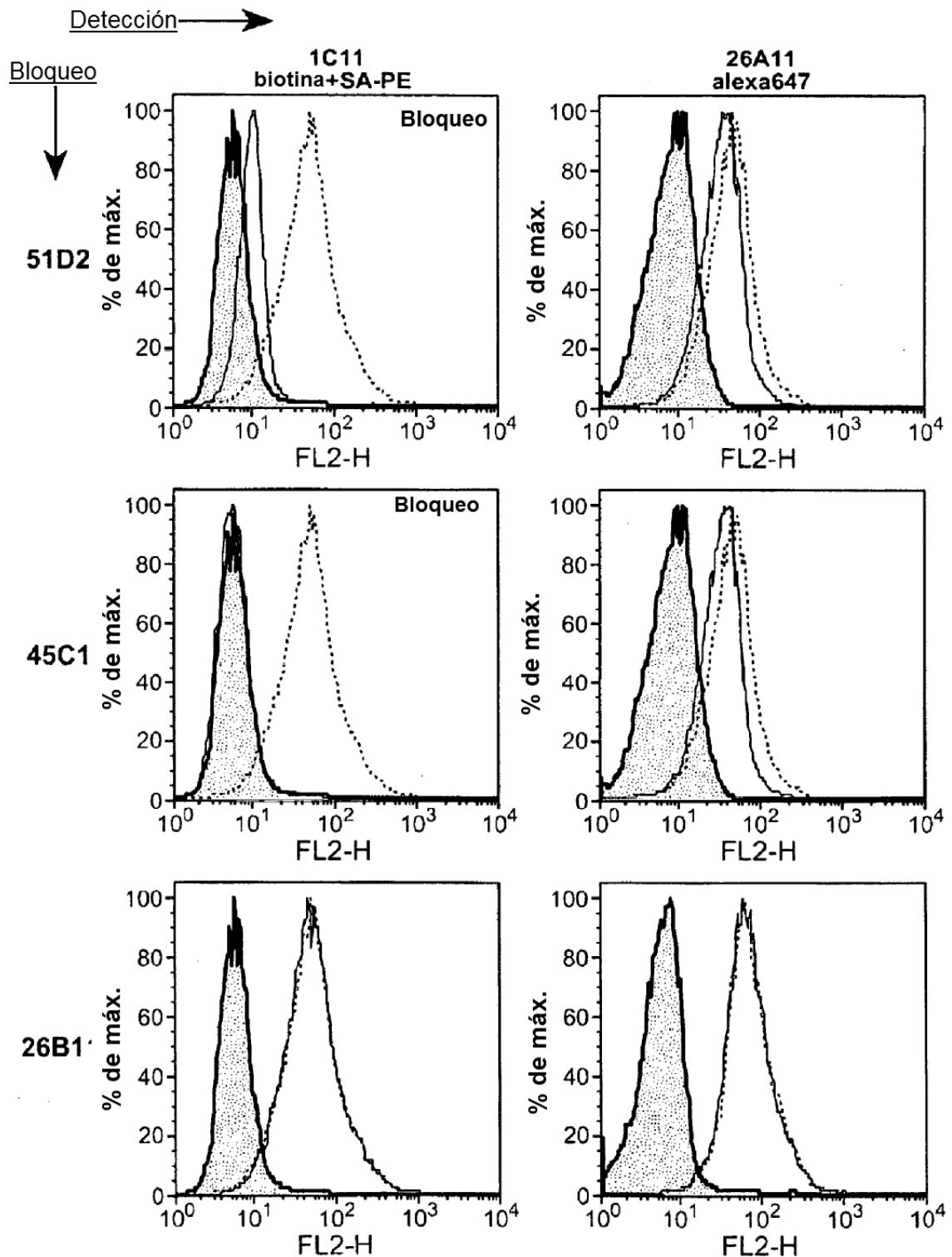


FIG. 4A-13

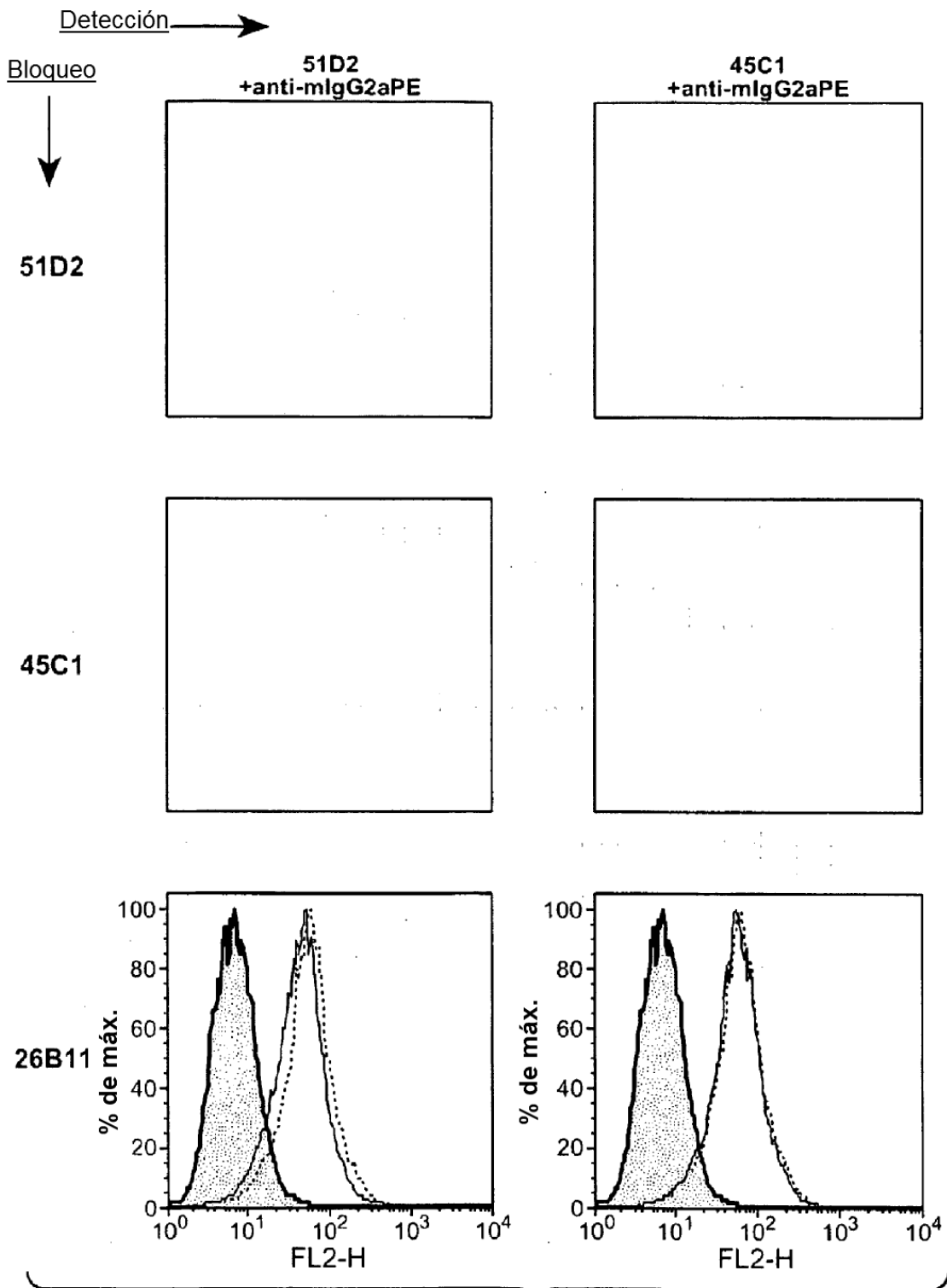


FIG. 4A-14

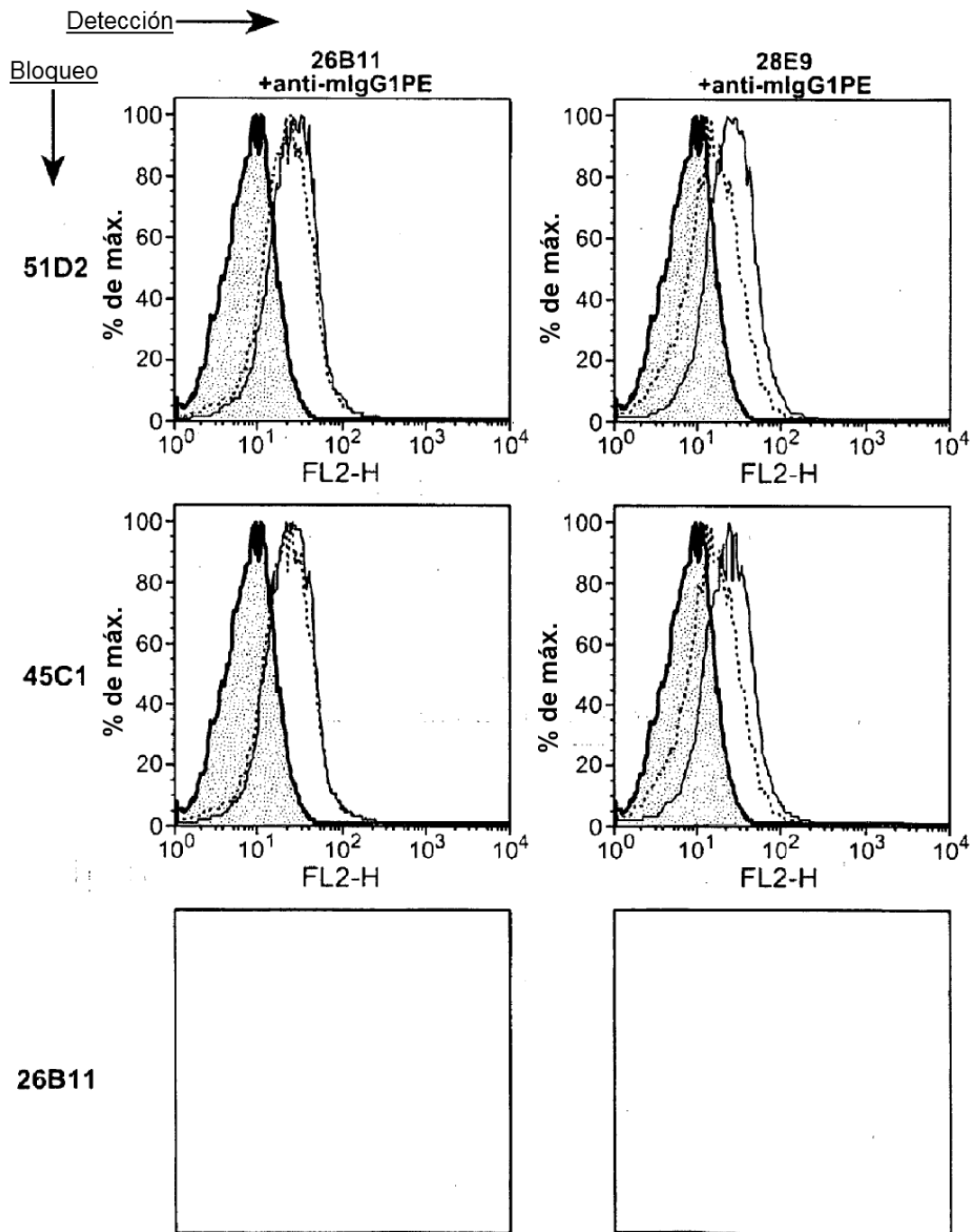


FIG. 4A-15

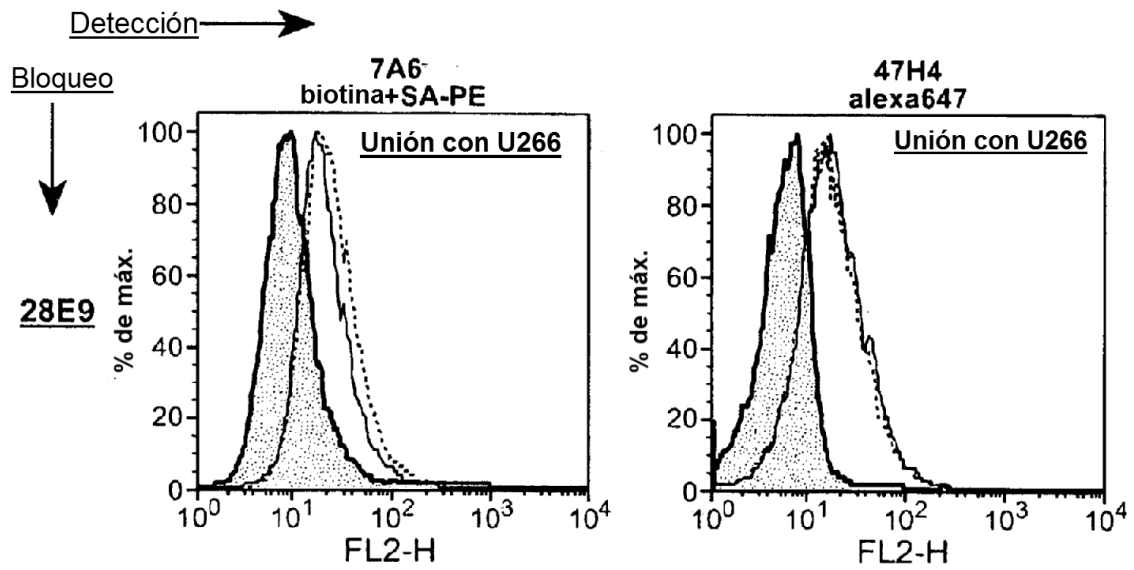


FIG. 4A-16

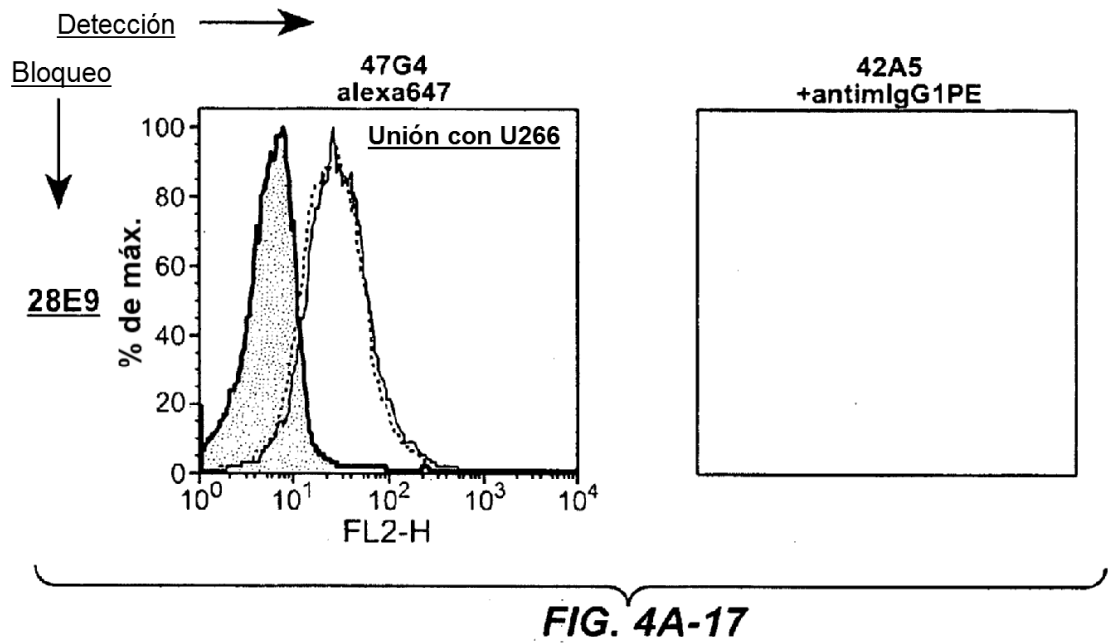


FIG. 4A-17

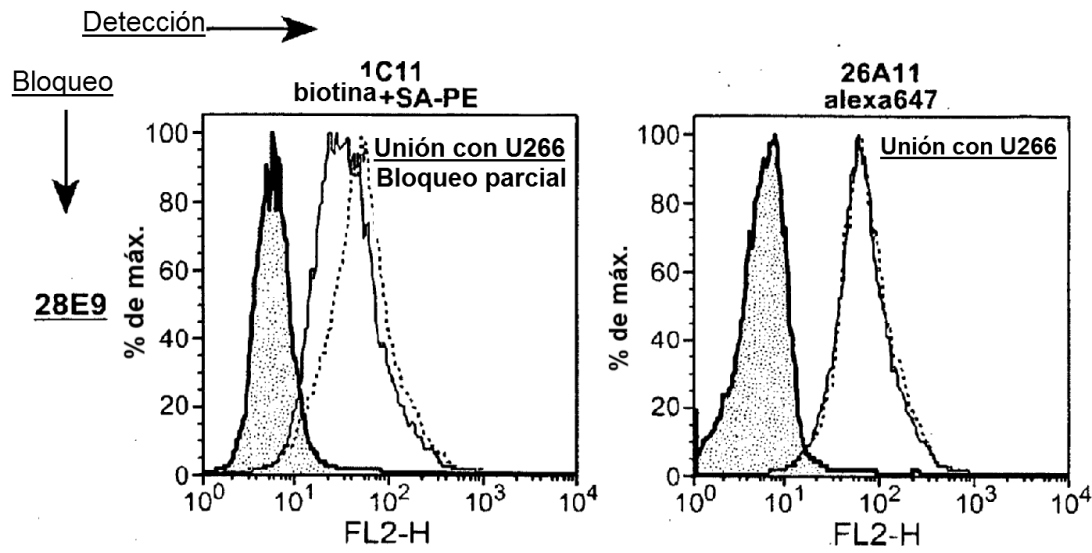


FIG. 4A-18

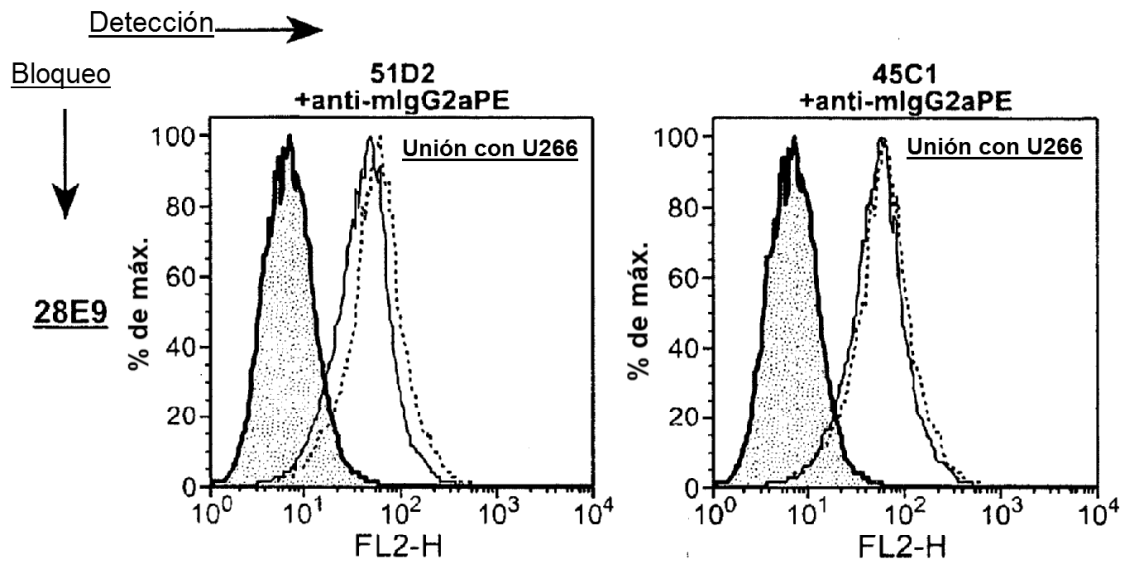
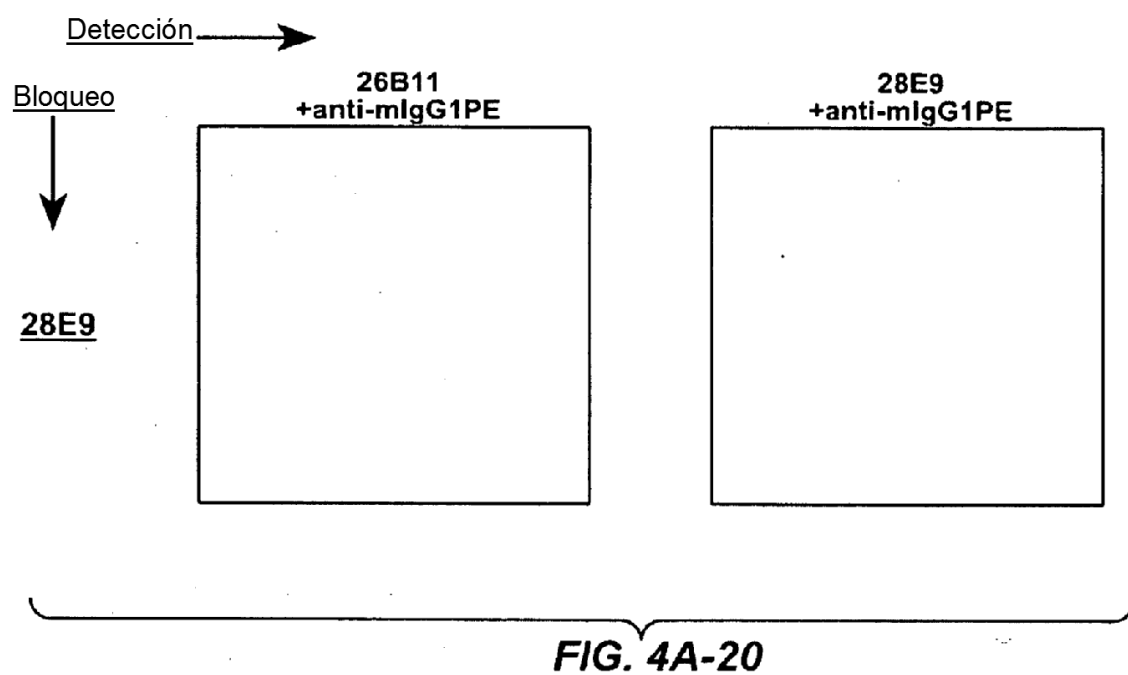


FIG. 4A-19



Estudios de unión/bloqueo de epítomos de anticuerpo anti-IgE/M1'

	Bloqueo (relación 1:1)
	Bloqueo parcial (1:1)
	Sin efecto
	No determinado
* Unión con U266	

Unión con O200

2ª Detección

1º

	7A6 biotina	47H4 alexa647	47G4 alexa647	42A5 mlgG1	42H4 mlgG1	1C11 biotina	26A11 mlgG1/ alexa647	51D2 mlgG2a	45C1 mlgG2a	28E9 mlgG1	26B11 mlgG1
mlgG1											
mlgG1											
mlgG1											
mlgG1											
mlgG1											
mlgG1											
mlgG1											
mlgG2a							ligera				
mlgG2a							ligera				
mlgG1	ligera							ligera			
mlgG1											

FIG. 4B

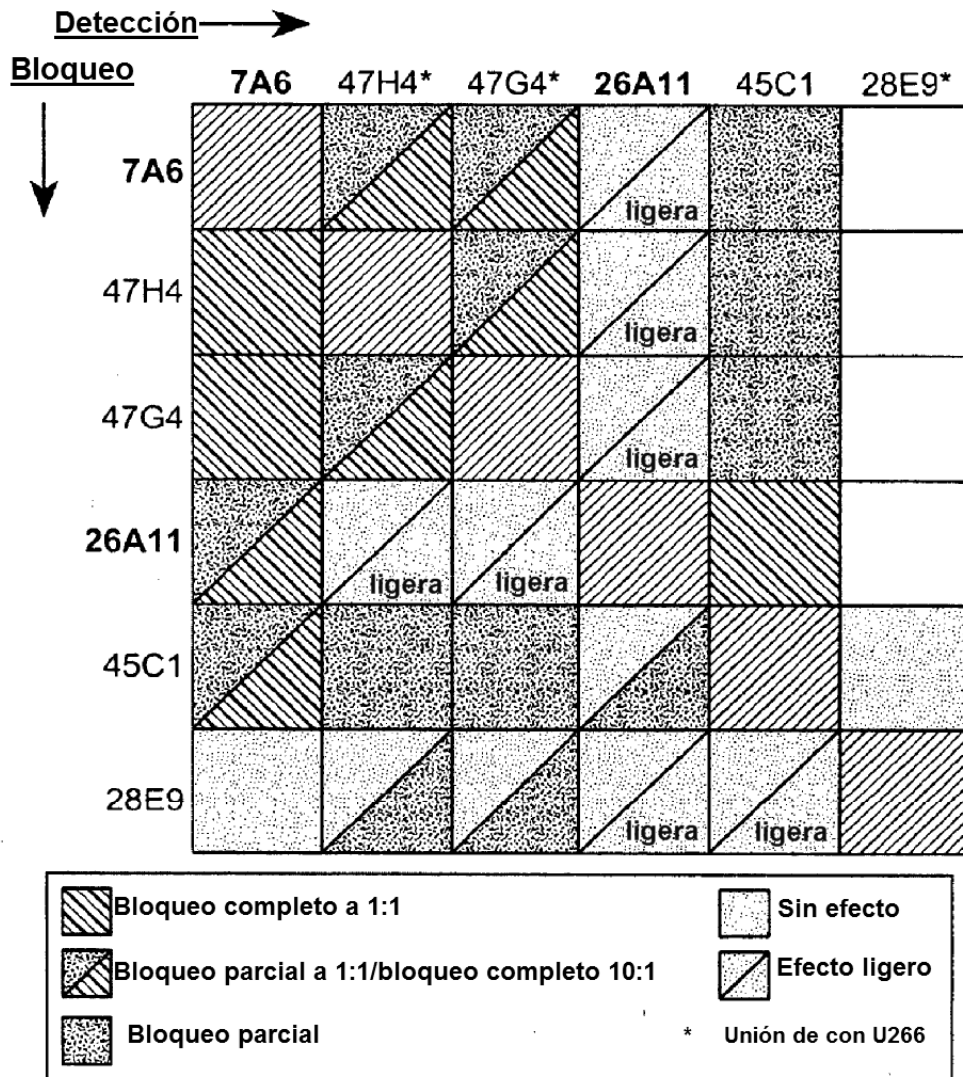


FIG. 4C

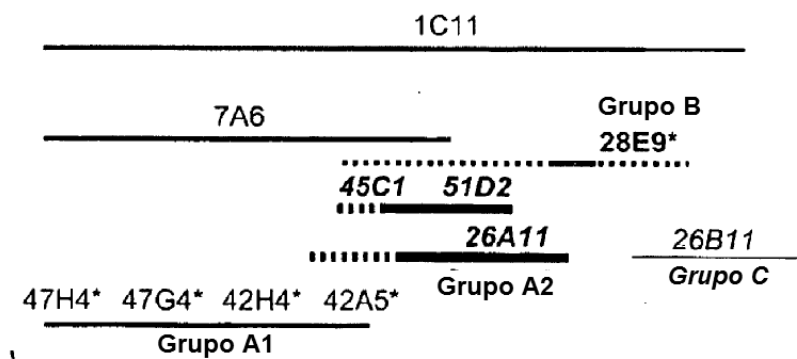


FIG. 4D

Mapeo de epítomos de anti-IgE/M1'

CH4	M1'				T.M.
FICRAVHEAASPQTQRAVSVP	GLAGGSAQSQRAPDRVLCHSGQQQGLPRAAGGSVPHPRCHCGAGRADWPGPPE	G	G	HPR human	LDVCVEEAEGEAPWTWTGLCIFAALFL...
1 ASPSQTVQRAVSVP					
2 TVQRAVSVP	GLAGG	E	R	DHH Rhesus	L
3 GLAGGSAQSQRAPDR	E	R	R	DHR Cyno	L
4 SAQSQRAPDRVLCHS					
5 RAPDRVLCHSGQQQ					
6 VLCHSGQQQGLPRAA					
7 GQQQGLPRAAGGSVP					
8 PRAAGGSVPHPRCH					
9 GGSVPHPRCHCGAGR					
10 HPRCHCGAGRADWPG					
11 CGAGRADWPGPPE	LD				
12 ADWPGPPE	LDVCVEE				
13 PPE	LDVCVEEAEGEA				
14 VCVEEAEGEAPWTWT					
15 AEGEAPWTWTGLCIF					

Péptidos M1'

FIG. 5A

Mapeo de epítomos de anti-IgE/M1'

	Nº de péptido	Secuencia peptídica
47H4	4	SAQSQRAPDRVLCHS
7A6	4	SAQSQRAPDRVLCHS
	5	RAPDRVLCHSGQQQG
26A11	7	GQQQGLPRAAGGSVP
	8	PRAAGGSVPHPRCH

FIG. 5B**Mapeo de epítomos de anti-IgE/M1'**

	Nº de péptido	Secuencia peptídica
47H4 v5	4	SAQSQRAPDRVLCHS
7A6 v1	4	SAQSQRAPDRVLCHS
	5	RAPDRVLCHSGQQQG
26A11 v6	7	GQQQGLPRAAGGSVP
	8	PRAAGGSVPHPRCH

FIG. 5C

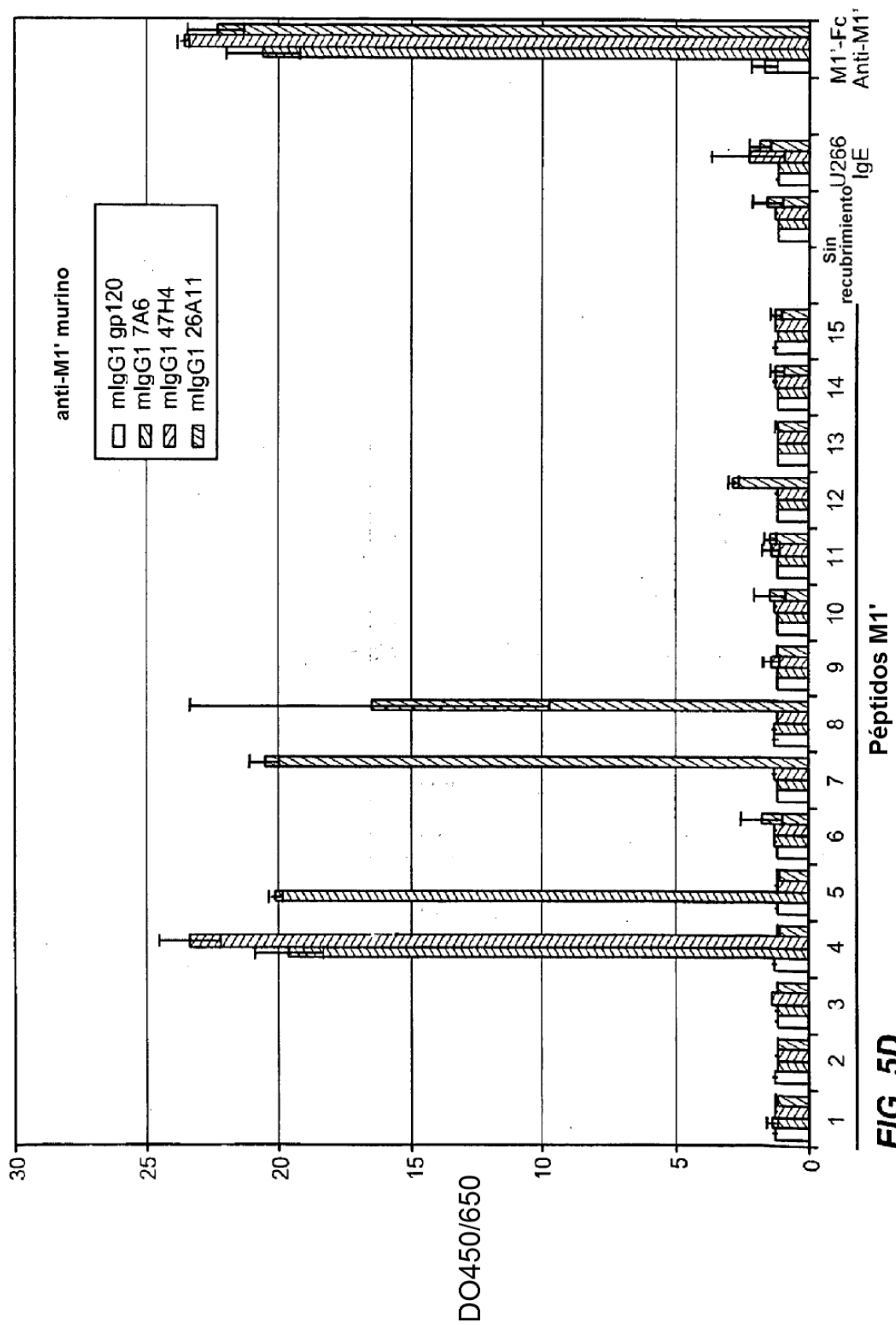


FIG. 5D

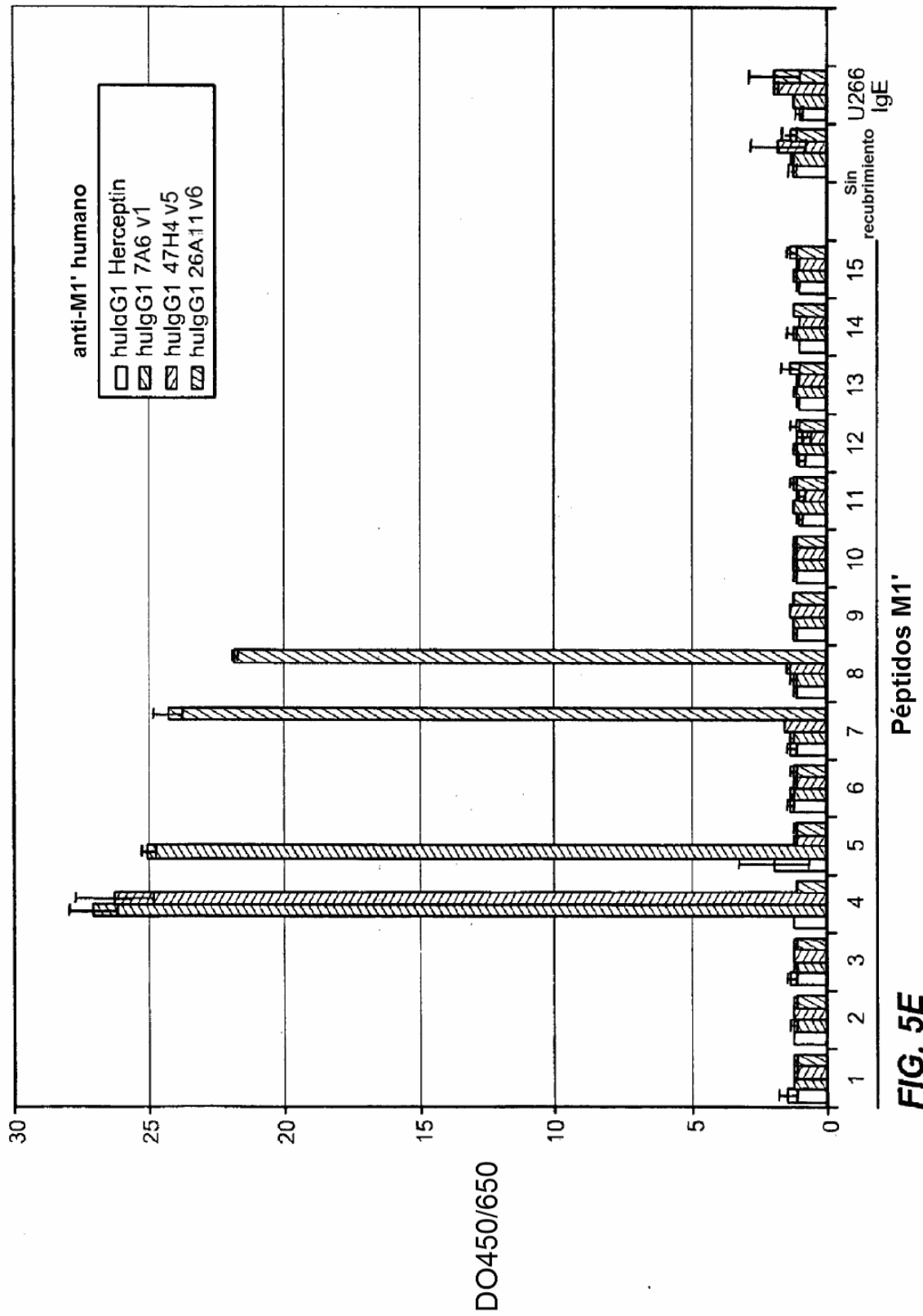


FIG. 5E

N° de Kabat	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	A	B	C	D	E	F	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	
huK1.	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Q	Y	N	S	L	P							W	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R
mu26A11	E	D	L	A	T	Y	F	C	Q	Q	G	H	T	L	P							#	T	F	F	G	G	T	K	V	E	I	K	R	
hu26A11.v1-16	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	G	H	T	L	P							#	T	F	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R

FIG. 6A

7A6 - VL

N° de Kabat	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	A	B	C	D	E	F	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37		
	Kabat - CDR L1																																												
	Choithia - CDR L1																																												
	Contacto - CDR L1																																												
huKI	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	T	L	L	Y	S	T	N	Q	K	N	Y	L	A	W	Y	Q		
mu7A6	D	I	V	M	S	Q	S	P	S	S	L	T	V	S	V	G	E	K	V	T	L	S	C	K	S	S	Q	T	L	L	Y	S	T	N	Q	K	N	Y	L	A	W	Y	Q		
hu7A6.v1	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	K	S	S	Q	T	L	L	Y	S	T	N	Q	K	N	Y	L	A	W	Y	Q		

N° de Kabat	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80			
	Kabat - CDR L2																																													
	Choithia - CDR L2																																													
	Contacto - CDR L2																																													
huK1	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	I	Y	A	A	S	S	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P		
mu7A6	Q	K	P	G	Q	S	P	K	L	L	I	I	Y	W	A	S	T	R	E	S	G	V	P	D	R	F	T	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	V	K	A		
hu7A6.v1	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	I	Y	W	A	S	T	R	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P		

N° de Kabat	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	A	B	C	D	E	F	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108																
																																	Kabat - CDR L3																	
																																	Choithia - CDR L3																	
																																	Contacto - CDR L3																	
huK1	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	N	S	L	P																																			
mu7A6	E	D	L	A	V	Y	Y	C	Q	Q	Y	Y	S	Y	P																																			
hu7A6.v1	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	Y	S	Y	P																																			

FIG. 6B

FIG. 6C

26A11 - VH

N° de Kabat	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41
humIII	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	S	Y	A	M	S	W	V	R	Q	A	P
mu26A11	E	V	Q	L	Q	Q	S	G	P	E	L	V	K	P	G	A	S	V	K	M	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	D	Y	Y	M	M	W	V	K	Q	S	H
hu26A11.v1-3,13,14	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	Y	T	F	T	D	Y	Y	M	M	W	V	R	Q	A	P
hu26A11.v4-6,15,16	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	Y	T	F	T	D	Y	Y	I	M	W	V	R	Q	A	P

Kabat - CDR H1

Choithia - CDR H1

Contacto - CDR H1

N° de Kabat	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
humIII	G	K	G	L	E	N	V	S	V	I	S	G	D	G	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L	Y	L
mu26A11	G	K	S	L	E	N	I	G	D	I	N	P	N	N	Y	D	T	S	Y	N	Q	K	F	K	G	K	A	T	L	T	V	D	K	S	S	T	A	Y	I	
hu26A11.v1-16	G	K	G	L	E	N	V	G	D	I	N	P	N	N	Y	D	T	S	Y	N	Q	K	F	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	L

Kabat - CDR H2

Choithia - CDR H2

Contacto - CDR H2

N° de Kabat	91	92	A	B	C	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	...	...	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113
humIII	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	F	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	
mu26A11	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	S	K	A	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S		
hu26A11.v1-16	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	S	K	A	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S		

Kabat - CDR H3

Choithia - CDR H3

Contacto - CDR H3

FIG. 6D

7A6 - VH

N° de Kabat	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	A	B	36	37	38	39	40	41	
humIII	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	S	Y	A	M	S				W	V	R	Q	A	P
mu7A6	Q	V	Q	L	Q	Q	S	G	A	E	L	V	R	P	G	A	S	V	T	L	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	I	D	Y	E	M	H				W	V	K	Q	T	P
hu7A6.v1	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	Y	T	F	I	D	Y	E	M	H				W	V	R	Q	A	P
															</																													

Choithia - CDR H1

Kabat - CDR H1

Contacto - CDR H1

N° de Kabat	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	a	b	c	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
-------------	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

Choithia - CDR H2

Kabat - CDR H2

Contacto - CDR H2

humII	G	K	G	L	E	W	V	S	V	I	S	G		D	G	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L	Y	L
mu7A6	V	R	G	L	E	W	I	G	A	I	D	E		E	T	G	T	T	A	Y	N	Q	K	F	K	G	K	A	T	L	T	A	A	K	S	S	T	A	Y	M	
hu7A6.v1	G	K	G	L	E	W	V	G	A	I	D	P		E	T	G	T	T	A	Y	N	Q	K	F	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	L

N° de Kabat	81	82	A	B	C	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	A	B	C	D	...	K	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113
-------------	----	----	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	-----	---	---	---	---	-----	---	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Choithia - CDR H3

Kabat - CDR H3

Contacto - CDR H3

humIII	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G		E	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S								
mu7A6	E	L	R	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	Y	C	T	R	L	R	P	H	Y	D	Y	D	N	A	M	D	S	W	G	Q	G	T	L	T	V	S	S	
hu7A6.v1	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	T	R	L	R	P	H	Y	D	Y	D	N	A	M	D	S	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S

FIG. 6E

47H4 - VH

N° de Kabat	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	A	B	36	37	38	39	40	41	
																																		</										

Kabat - CDR H1

Choitia - CDR H1

Contacto - CDR H1

N° de Kabat	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	a	b	c	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
-------------	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

Kabat - CDR H2

Choitia - CDR H2

Contacto - CDR H2

humIII	G	K	G	L	E	W	V	S	V	I	S	G	D	G	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L	Y	L
mu47H4	G	K	G	P	E	W	V	A	F	I	S	D	L	A	Y	T	I	Y	Y	A	D	T	V	T	G	R	F	T	I	S	R	E	N	A	K	N	T	L	Y	L
hu47H4.v1-16	G	K	G	L	E	W	V	A	F	I	S	D	L	A	Y	T	I	Y	Y	A	D	T	V	T	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L	Y	L

N° de Kabat	81	82	A	B	C	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	...	K	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113
-------------	----	----	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	-----	---	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Kabat - CDR H3

Choitia - CDR H3

Contacto - CDR H3

humIII	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	F	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S				
mu47H4	E	M	S	S	L	R	A	E	D	T	A	L	Y	Y	C	A	R	D	N	W	D	A	M	D	Y	G	Q	G	T	S	V	T	V	S	S	
hu47H4.v1,2,5	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	D	N	W	D	A	M	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
hu47H4.v3-4,6	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	D	N	W	D	A	L	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S

FIG. 6F

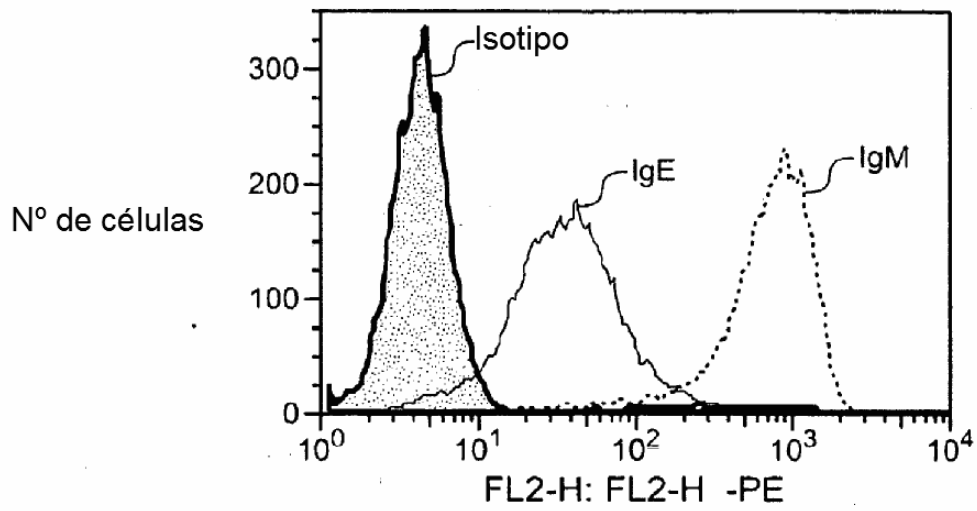


FIG. 7A

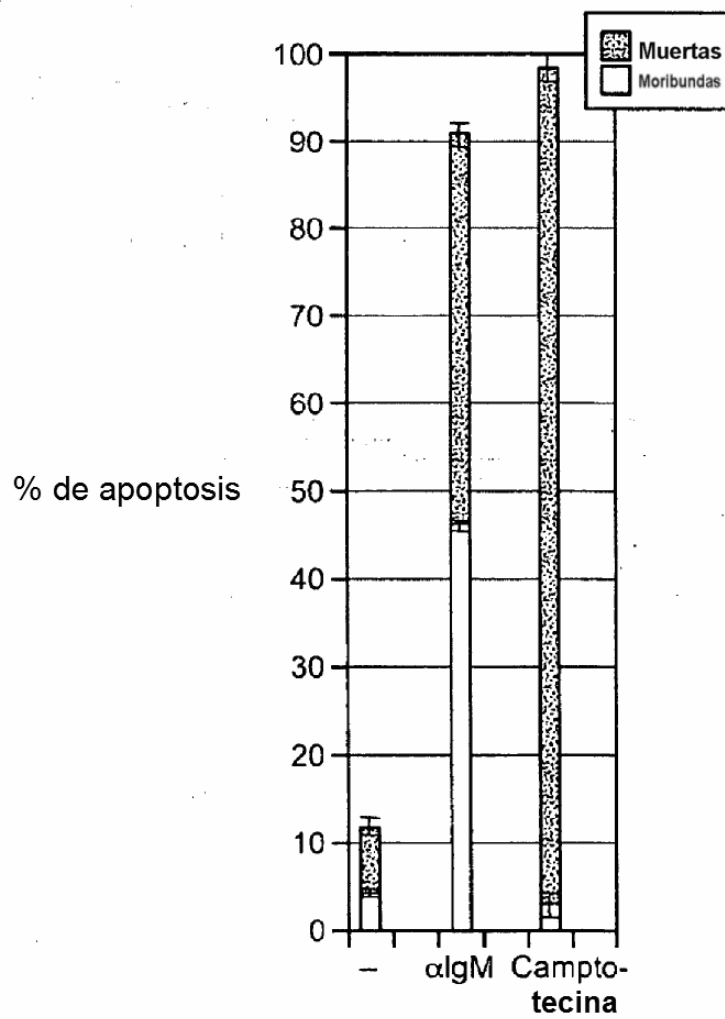


FIG. 7C

Ensayo de apoptosis de Daudi-IgE/M1'

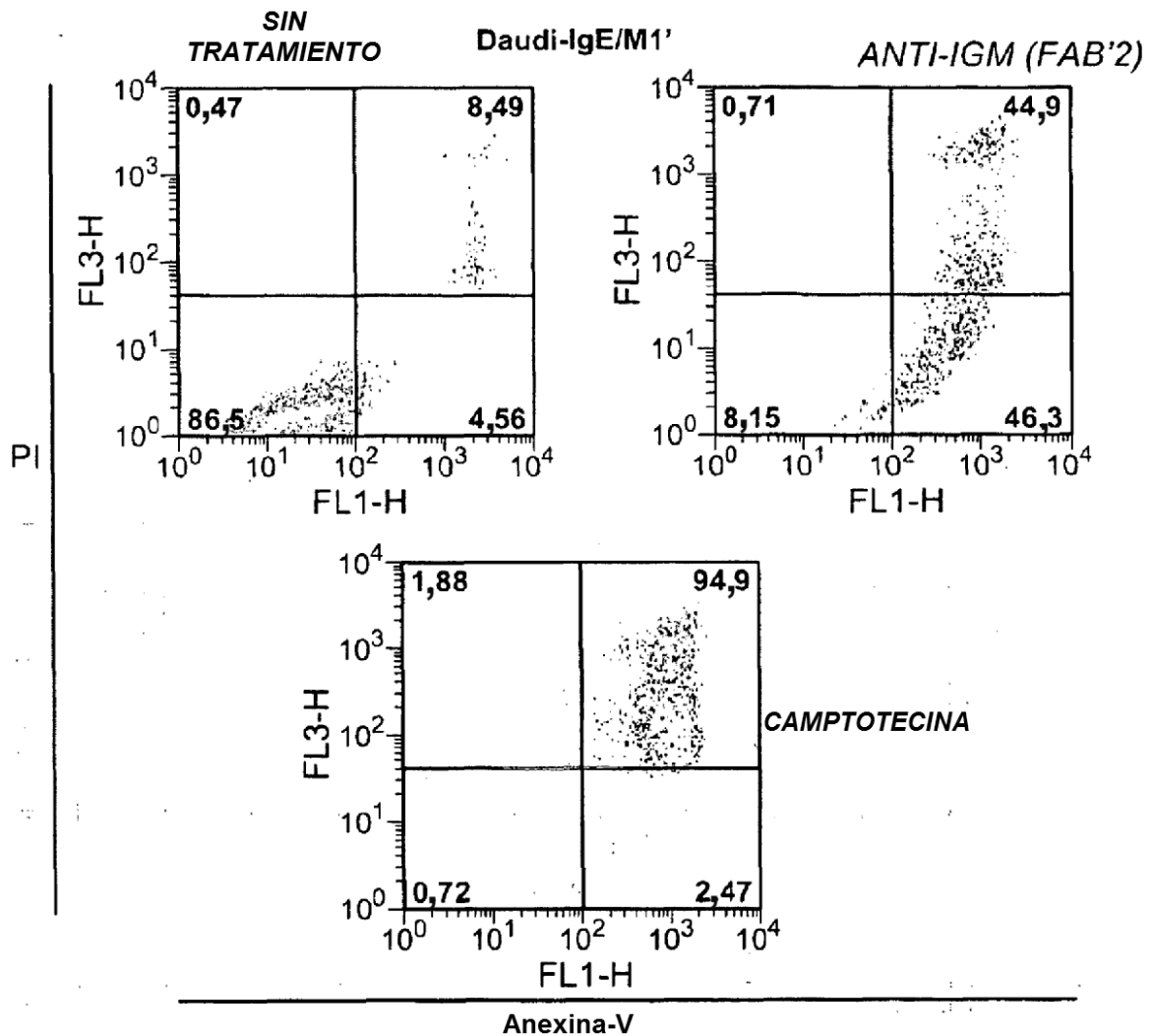


FIG. 7B

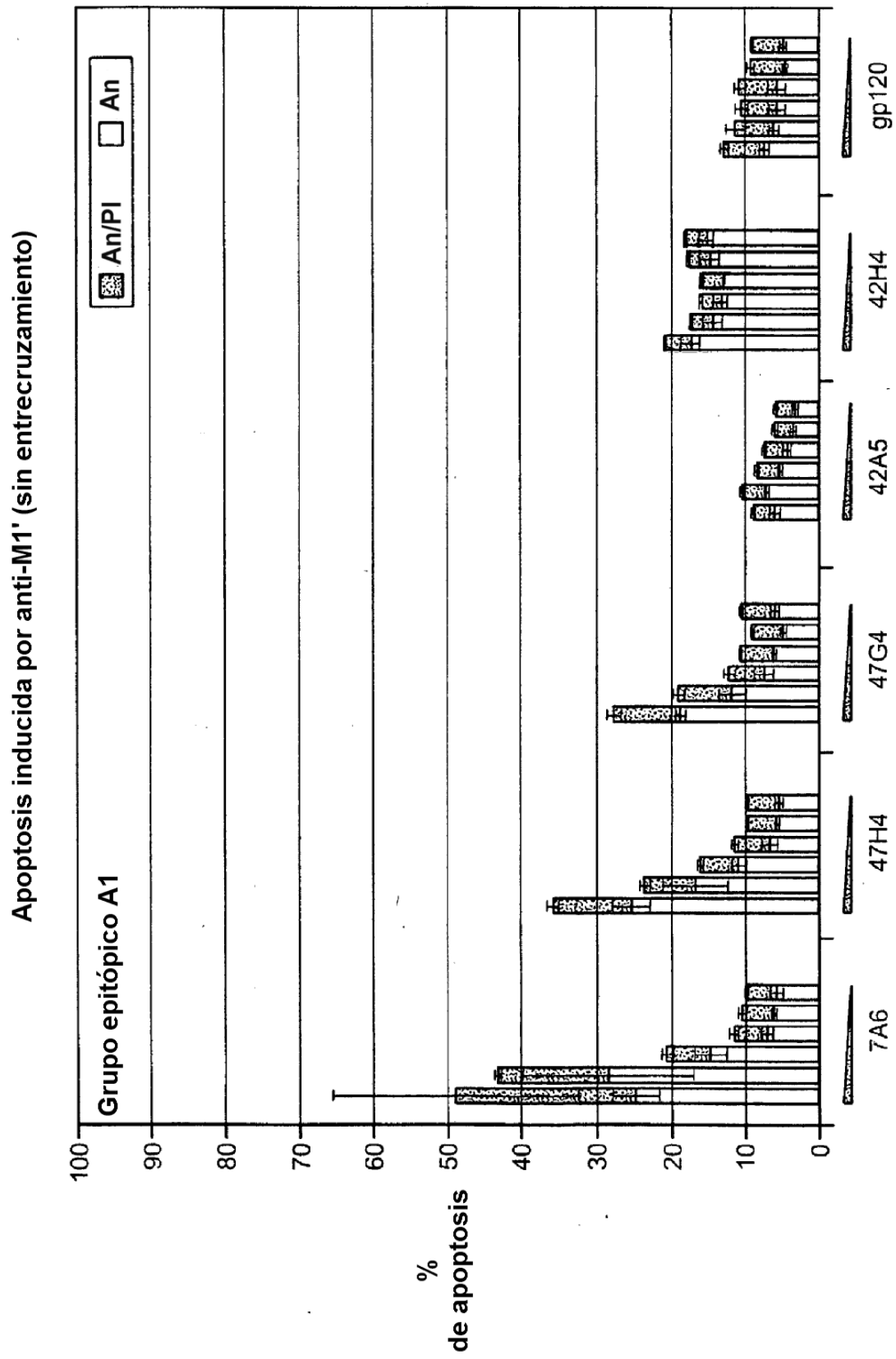


FIG. 7D

Apoptosis inducida por anti-M1' (sin entrecruzamiento)

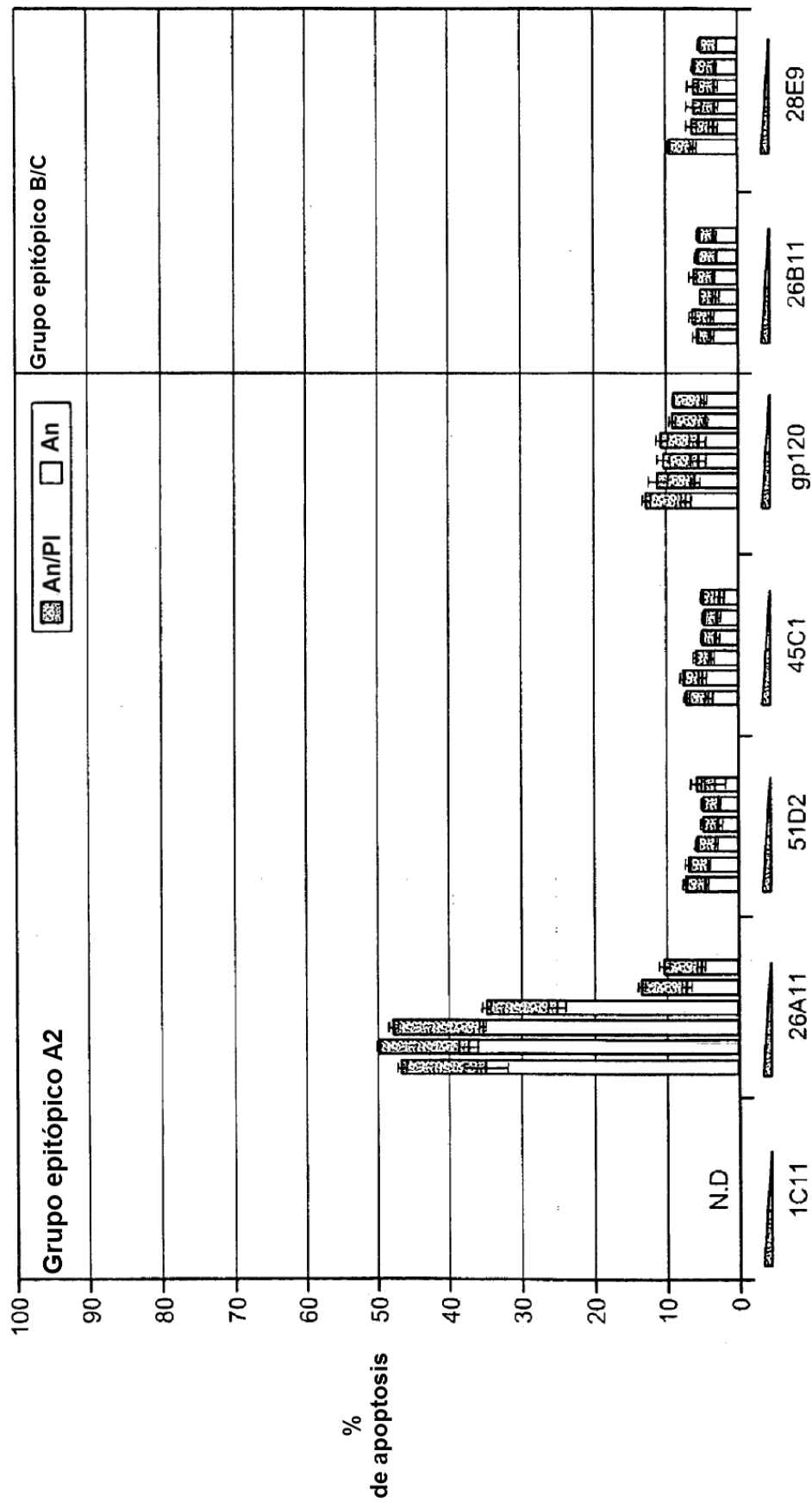


FIG. 7E

Apoptosis inducida por anti-M1' (sin entrecruzamiento)

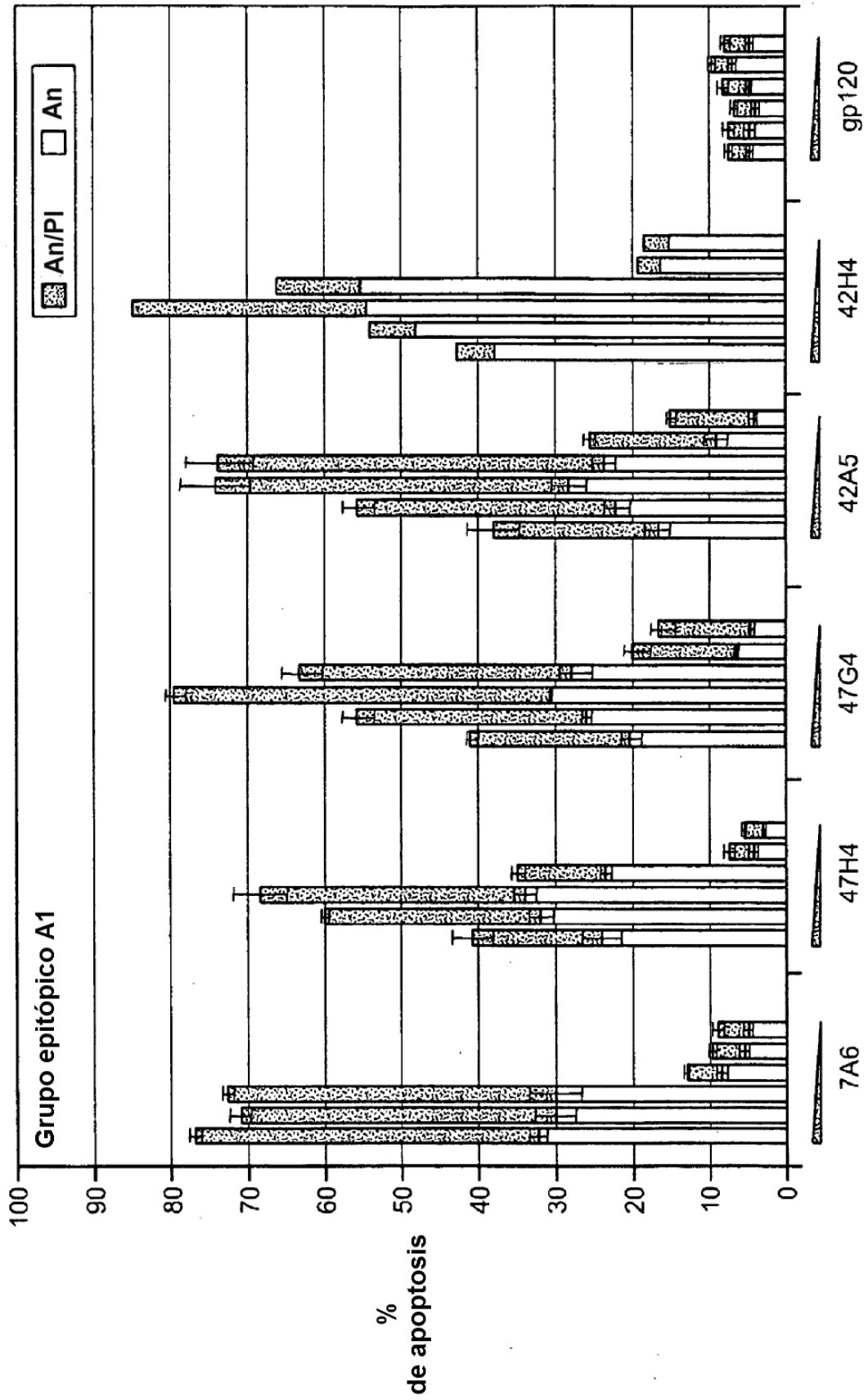


FIG. 7F

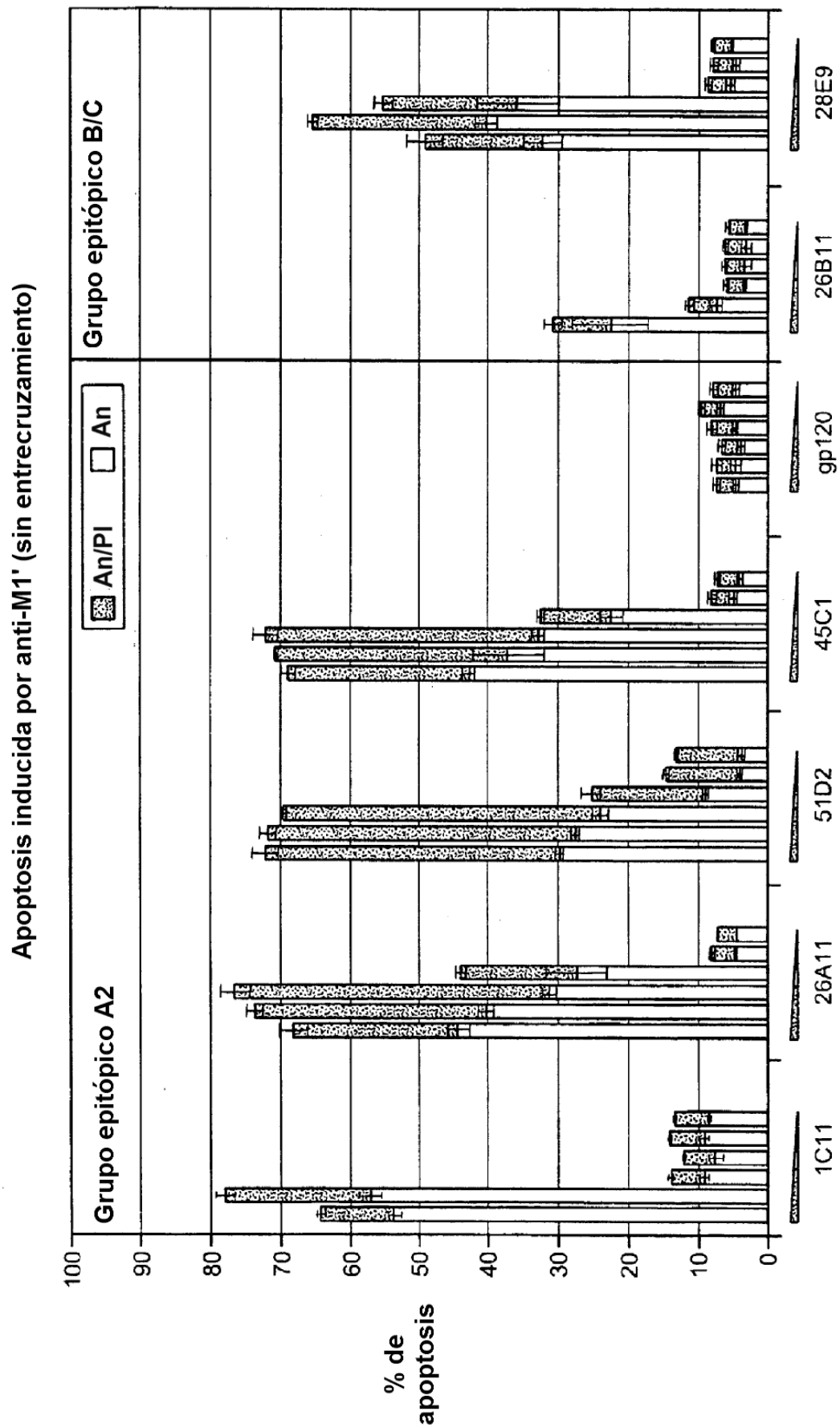


FIG. 7G

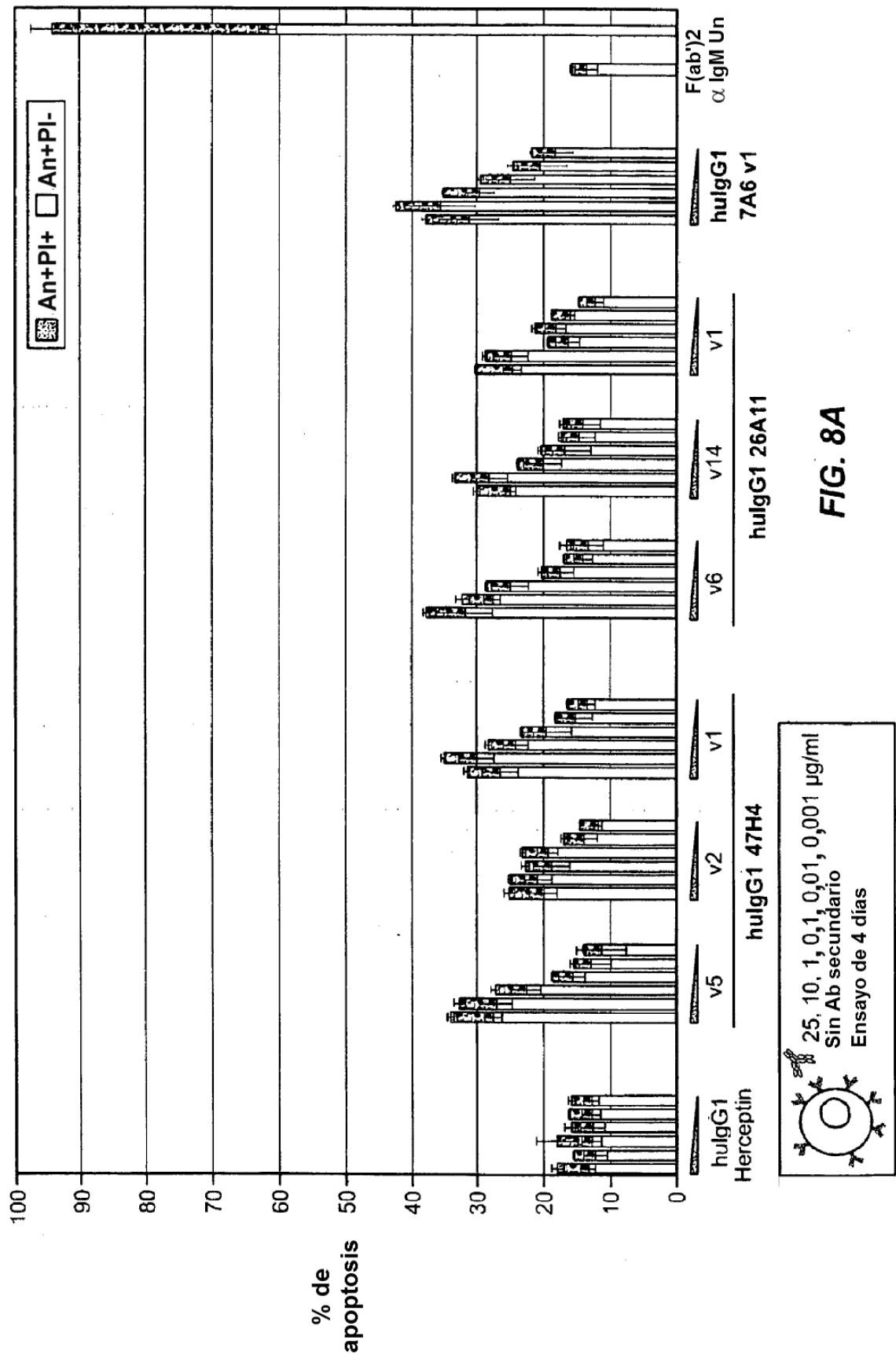


FIG. 8A

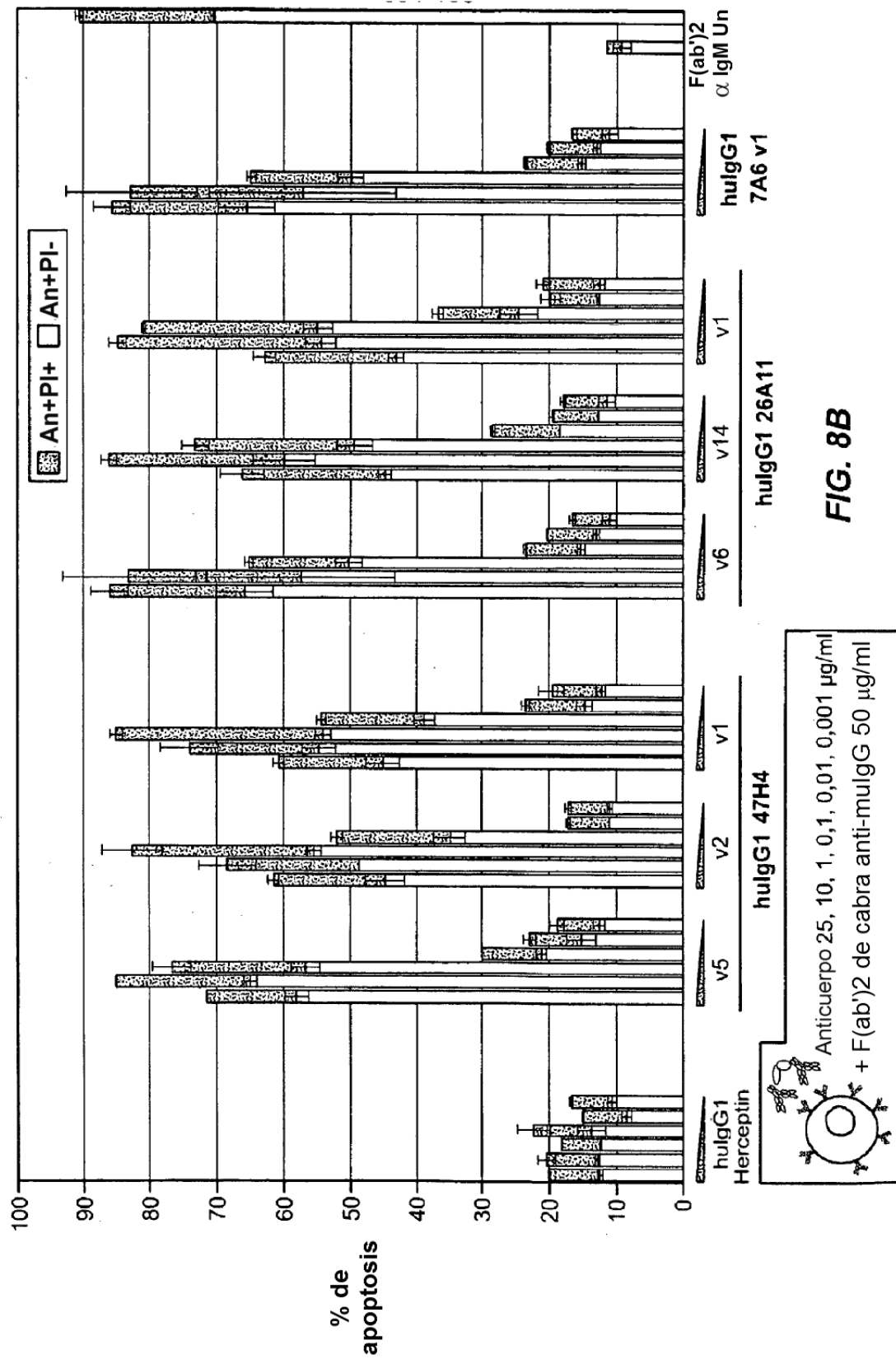


FIG. 8B

hulG1 47H4 v5 anti-IgE/M1' tipo silvestre frente a afucosilado

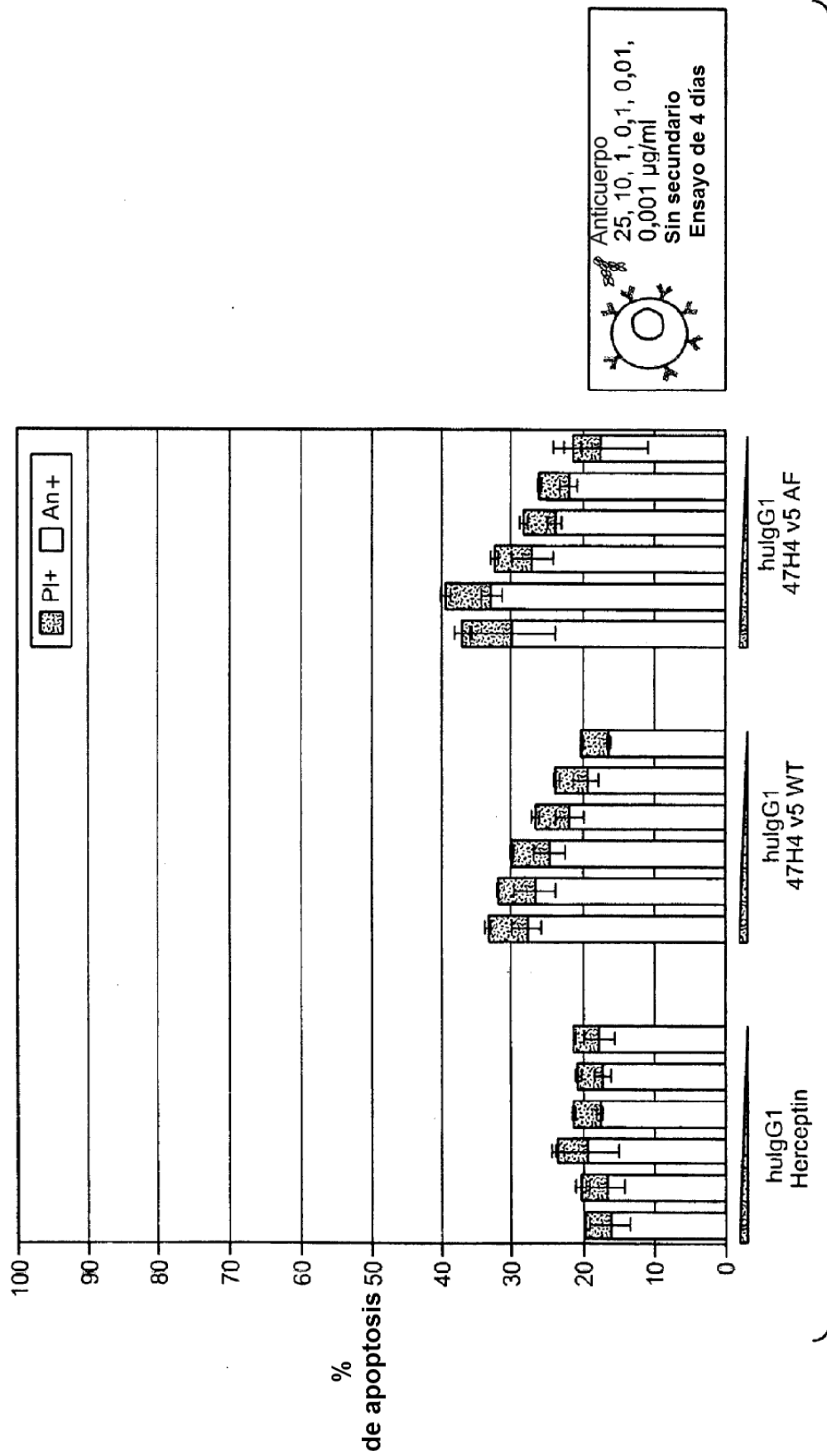


FIG. 8C

Flujo de calcio inducido por anticuerpos anti-M1'

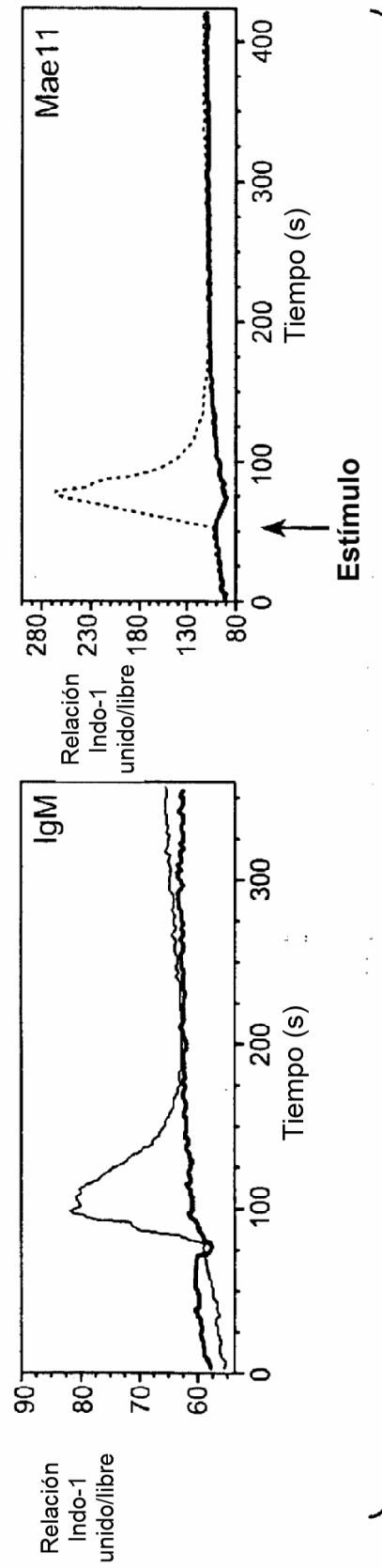


FIG. 9A

Flujo de calcio inducido por anticuerpos anti-M1'

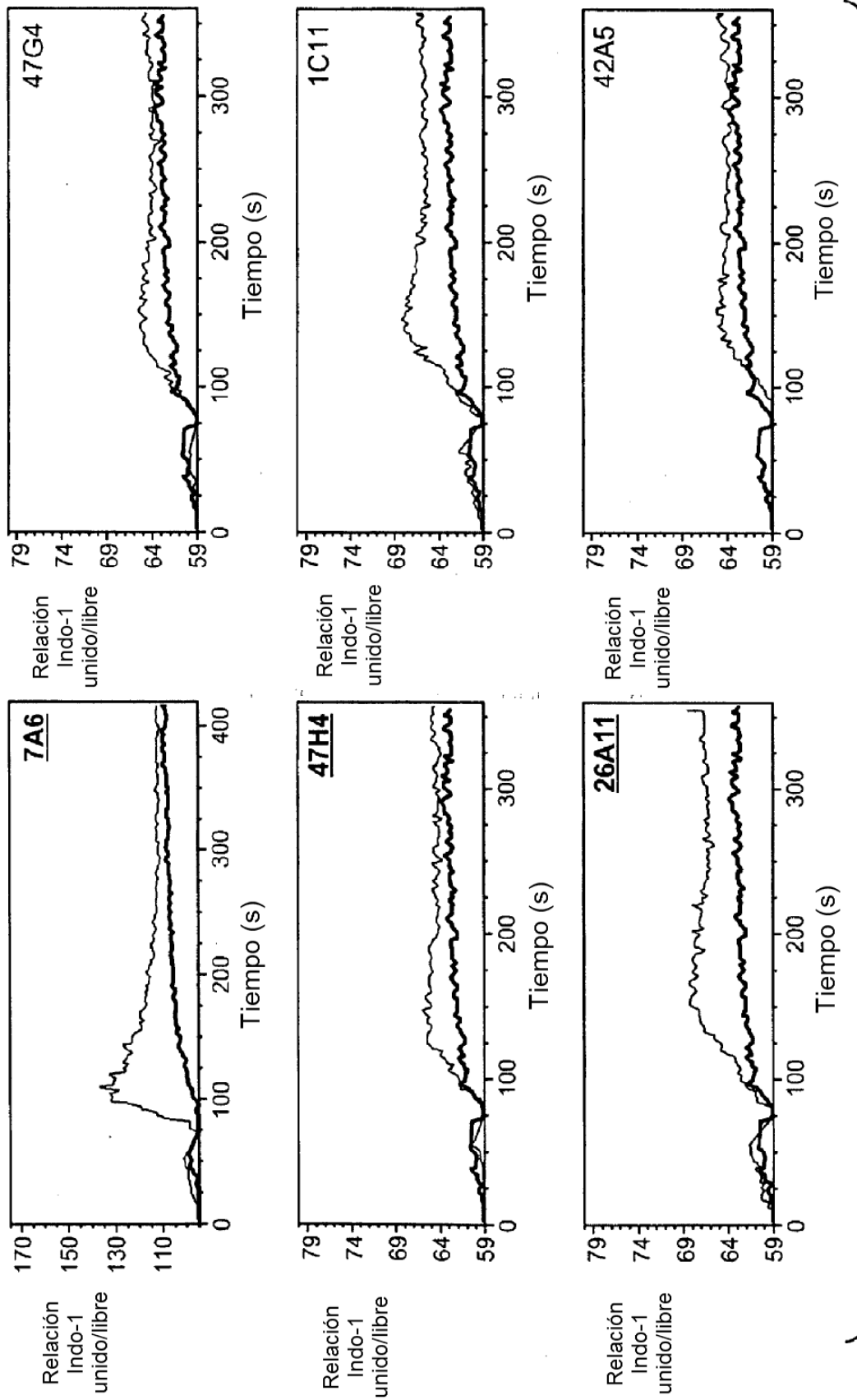


FIG. 9B-1

Flujo de calcio inducido por anticuerpos anti-M1'

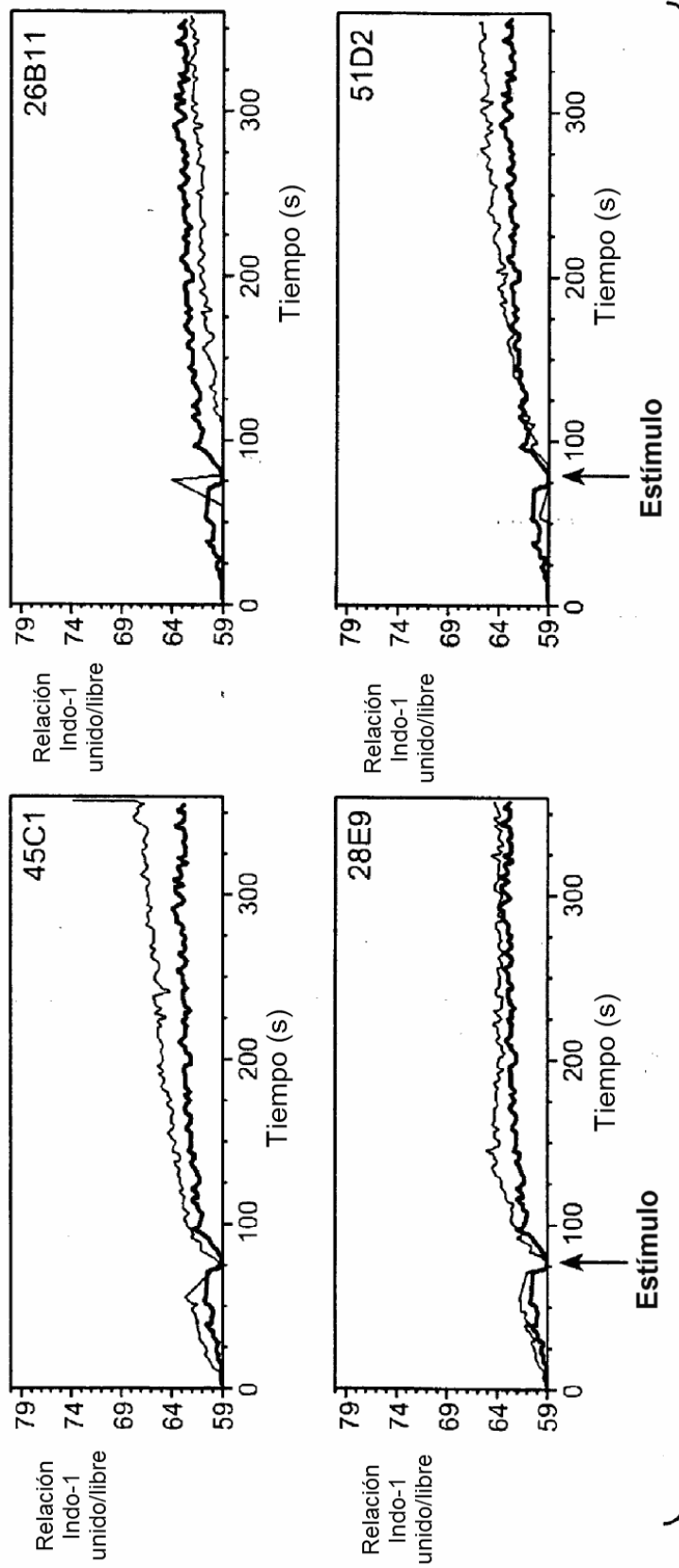
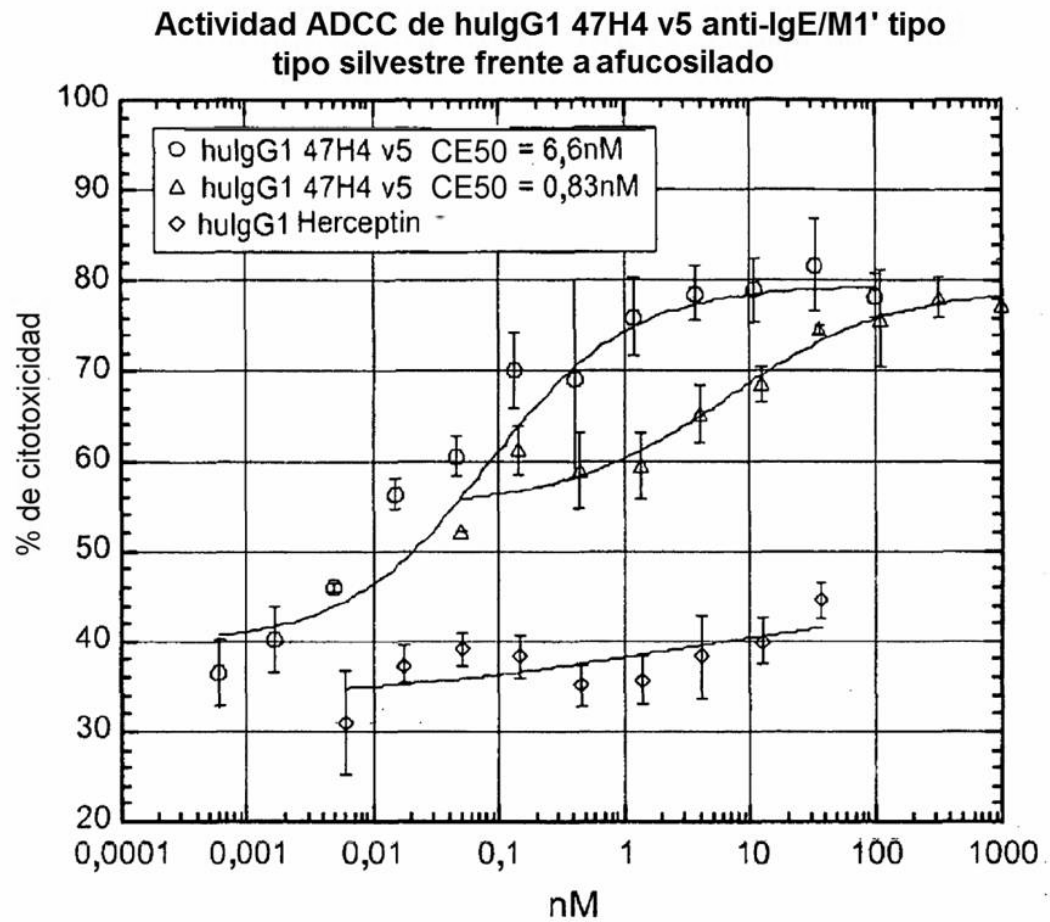


FIG. 9B-2

FIG. 9B

FIG. 9B-1

FIG. 9B-2

**FIG. 10**

7A6

HC mlgG1 7A6

QVQLQQSGAELVRPGASVTLSCKASGYTFIDYEMHWVKQTPVHGLEWIGAIDPETGTTAYNQKF
KGKATLTAAKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCTRLRPHYDYDNAMDSWGQGTTLTVSSASTKGP
 // SVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSS
 SVTVPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLTI
 TLTPKVTVCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGK
 EFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTI PPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEW
 QWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHSP
 GK

LC mkappa 7A6

DIVMSQSPSSLTVSVGEKVTLSCKSSQTLTYSTNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGV
PDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLAVYYCQQYISYPYTFGGGT // KVEIKRADAAPTVSIF
 PPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLT
 KDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNNEC

FIG. 11A

47H4

HC mlgG1 47H4

EVKLVESGGGLVQPGGSRKLSCAASGFTFSDYGMWVRQAPGKGPEWVAFISDLAYTIYYADTV
TGRFTISRENAKNTLYLEMSSLRSEDTALYYCARDNWDAMDYWGQGTSVTVSSAKTTPP // S
 SVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTV
 PSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLTI TLTP
 KVTVCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKC
 RVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTI PPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNG
 QPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHSPGK

LC mkappa 47H4

DIVLTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHNNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGV
DRFSGSGSGTDFTLKISRLEAEDLGVYFCQNTLVPWTFGGGT // KVEIKRADAAPTVSIFP
 PSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLT
 KDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNNEC

FIG. 11B

26A11

HC mlqGI 26A11

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYMMWVKQSHGKSLEWIGDINPNNYDTSYNQKF
 KGKATLTVDKSSSTAYIQLNSLTSEDSAVYYCASKAYWGQGLTVTVSAASTTPP // SVYPLA
 PGSAAQTNMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWP
 SETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITITLTPKVTQV
 VDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAA
 FPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDVKSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENY
 KNTQPIMDTDGSYFVYSKLVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTKSLSHSPGK

LC mkappa 26A11

DIQMTQTTSLSASLGDRVTITCRSSQDISNSLNWYQOKPDGPVKLLIYSTSRLHSGVPSRFSG
 SSGGTDYSLTISNLEQEDLATYFCQOGHTLPWTFGGGT // KVEIKRADAAPTVSIFPPSSEQ
 LTSGGASVVCFLNNFYPKDINVWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTTLTKDEYER
 HNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNREC

FIG. 11C

45C1

HC mlqG2a 45C1

QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMNWVKQAPGKGLKWMGWINTYTGEPTYVDDF
 KGRFAFSLETSASTAYLQINNLLKNEDMATYFCARGIYYDNDIYWGQGTILTSSAKTTAP //
 SVYPLAPVCGDITGSSVTLGCLVKGYFPEPVTTLWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTV
 TSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVL
 MISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQWMS
 GKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYV
 EWTNNGKTELNYKNTPEVLDSGYSYFMYSLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSR
 TPGK

LC mkappa 45C1

DIVMTQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLLDSGKTYLNWLLQRPQSPKRLIYLVSKLDSGVP
 DRFTGSGSGDFTLTKISRVEAEDLGVIYCWQGTHTPHTFGGGT // KVEIKRADAAPTVSIFP
 PSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTTLTK
 DEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNREC

FIG. 11D

28E9

HC mlqG1 28E9

EVKLVESEGGVLVQPGGSLRLSCATSGFTFTDYMSWVRQPPGKPLEWLGFISNKLNGYTTEYSS
SVQGRFTISRDDSQSILYLQMNTLRPEDSAAYYCARDMPVYYYALDYWGQGTSAVAVSSAKTTPP
// SVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSS
SVTVPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFFPKPKDVLTI
TLTPKVTVCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGK
EFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEW
QWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHTEKSLSHSP
GK

LC mkappa 28E9

DIQMTQSPASLSVSVGETVTFTCRTSENIYTYLAWIQKQKSPQLLVYNAQILAEGVPSRFSG
SGSGSQFSLQINSLQPEDFGYYCQHGYGTPFTFGSGT // KVEIKRADAAPTVSIFPPSSEQ
LTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTTLTKDEYER
HNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC

FIG. 11E

1C11

HC mlqG1 1C11

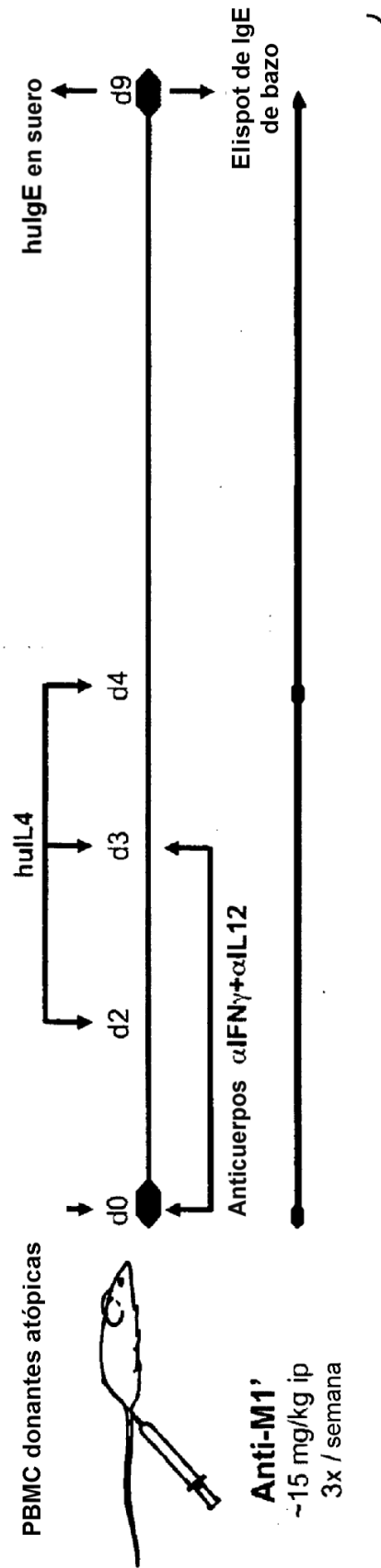
QVQLQQSGAELVLRPGASVTLSCASGYTFTDFEMHWVKQTPVHGLEWIGAIAPETGTSAYNQKF
RGKATLTADISSSTAYMDLRSLTSEDSAVYYCTIYYAAPWFAYWGQGLVTVSSASTKGP //
SVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTV
PSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFFPKPKDVLTIITLTP
KVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKC
RVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNG
QPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHTEKSLSHSPGK

LC mkappa 1C11

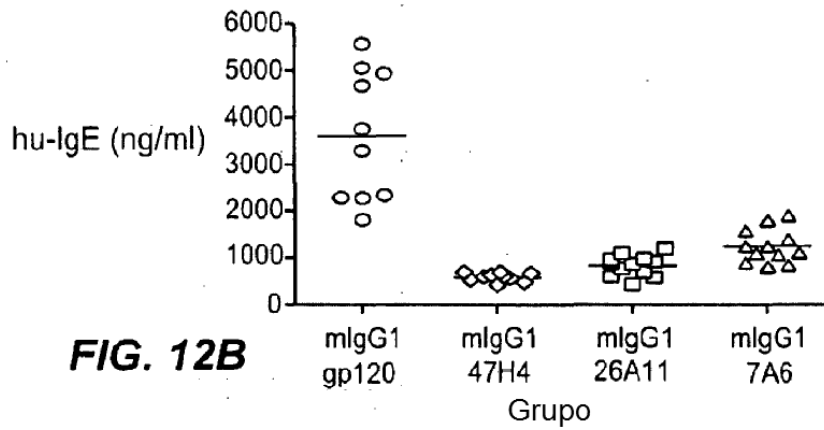
DIVMSQSPSSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGV
PDRFTGSGSVTDFPLTISVKAEDLAVYYCQYYSYPYTFGGGT // KVEIKRADAAPTVSIF
PPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTTLT
KDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC

FIG. 11F

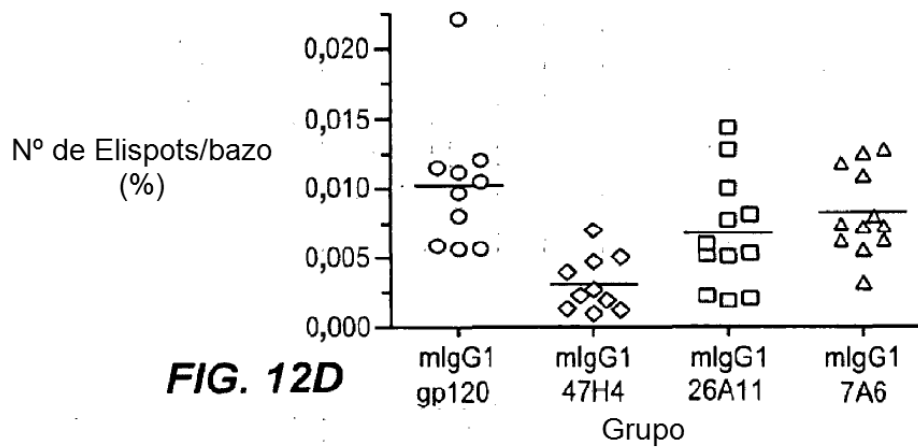
Efecto de anti-IgE/M1' en IgE en suero



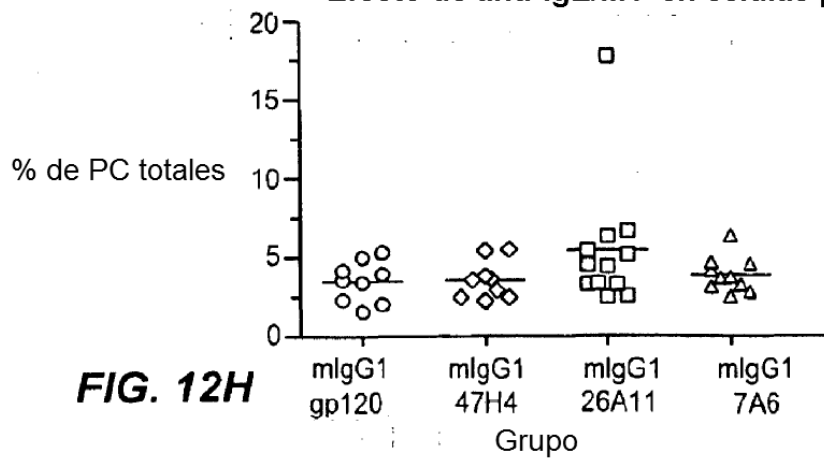
Efecto de anti-IgE/M1' en IgE en suero



Efecto de anti-IgE/M1' en células productoras de IgE



Efecto de anti-IgE/M1' en células plasmáticas



Efecto de anti-M1' en IgE en suero

N° 07-0377		IgE total (ng/ml)		
Grupo	Media	D.T.	% de cambio	p-valor
mlgG1 gp120	3606,0	1385,3	na	nd
mlgG1 47H4	589,2	91,8	-83,7%	<0,0001
mlgG1 26A11	838,42	224,8	-76,7%	<0,0001
mlgG1 7A6	1248,33	360,4	-65,4%	<0,0001

FIG. 12C**Efecto de anti-IgE/M1' en células productoras de IgE**

N° 07-0377		N° de Elispots/bazo (%)		
Grupo	Media	D.T.	% de cambio	p-valor
mlgG1 gp120	0,0103	0,0040	na	nd
mlgG1 47H4	0,0032	0,0020	-68,9%	0,0003
mlgG1 26A11	0,0068	0,0040	-34,0%	0,0815
mlgG1 7A6	0,0083	0,0030	-19,4%	0,4518

FIG. 12E**Efecto de anti-IgE/M1' en células plasmáticas totales**

N°07-0377		% de PC totales		
Grupo	Media	D.T.	% de cambio	p-valor
mlgG1 gp120	4,24	1,52	na	nd
mlgG1 47H4	4,20	1,30	-1%	1,0000
mlgG1 26A11	6,18	4,51	+45,8%	0,2667
mlgG1 7A6	4,6	1,28	+8,5%	0,9835

FIG. 12I

Efecto de anti-IgE/M1' en otras inmunoglobulinas en suero

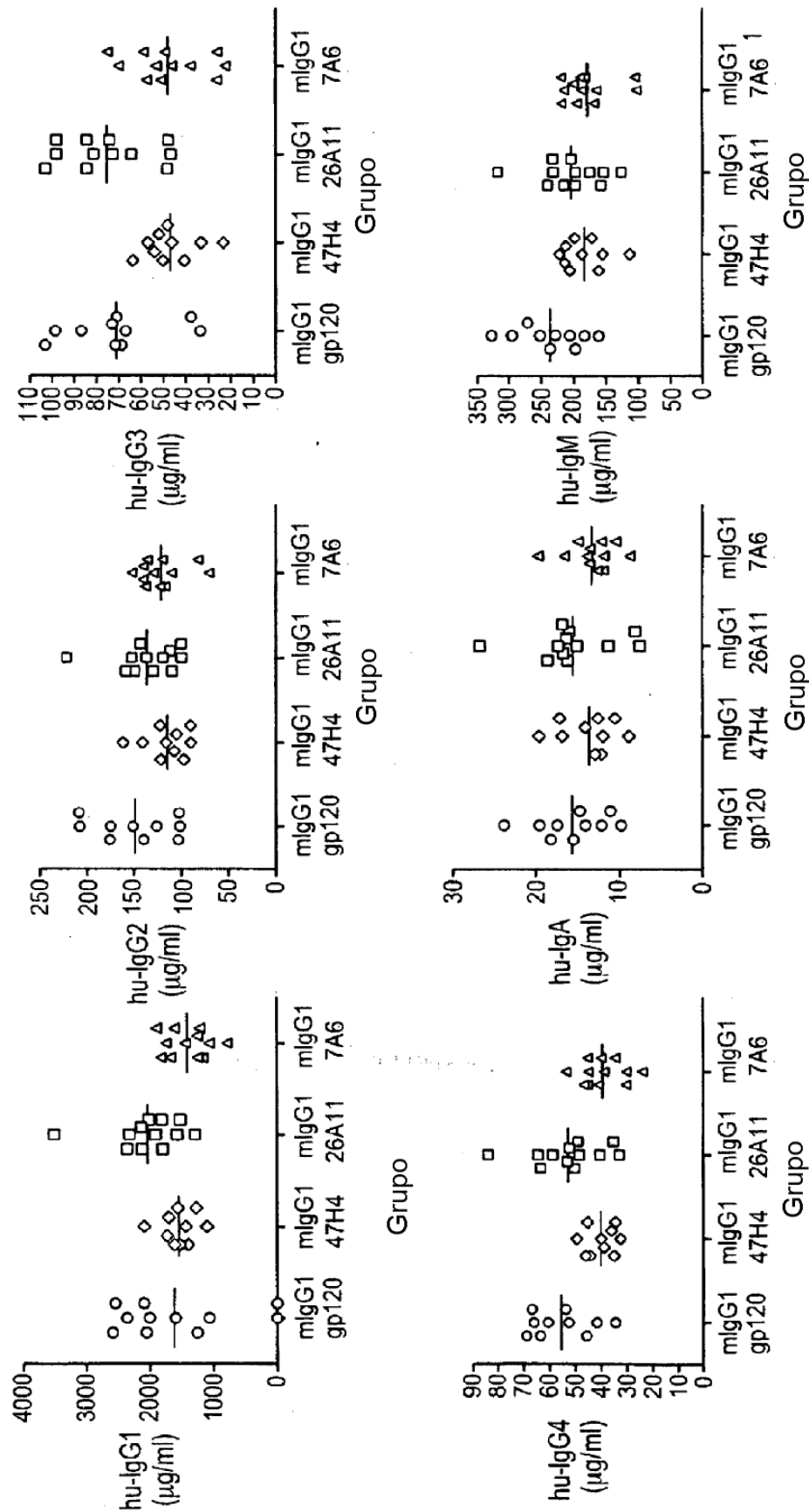


FIG. 12F

Efecto de anti-IgE/M1' en otras inmunoglobulinas en suero

N°07-0377		hulG1			hulG2		
Grupo	Media	D.T.	% de cambio	p-valor	Media	D.T.	p-valor
mlgG1 gp120	1936,8	512,2	nd	nd	149,4	41,5	nd
mlgG1 47H4	1540,8	269,1	-20,4	0,1265	115,4	22,7	0,0504
mlgG1 26A11	2020,7	567	+4,7	0,9278	136,4	33,8	0,6399
mlgG1 7A6	1406,8	341	-27,4	0,0210	121,8	24,2	0,1125
N°07-0377		hulG3			hulG4		
Grupo	Media	D.T.	% de cambio	p-valor	Media	D.T.	p-valor
mlgG1 gp120	71,1	22,7	nd	nd	55,7	11,8	nd
mlgG1 47H4	46,8	11,9	-34,2	0,0143	40,5	5,8	0,0071
mlgG1 26A11	75,4	20,2	+6,0	0,9013	53	14	0,8799
mlgG1 7A6	47,9	17	-32,6	0,0138	39,7	8,4	0,0031
N°07-0377		hulG			hulG		
Grupo	Media	D.T.	% de cambio	p-valor	Media	D.T.	p-valor
mlgG1 gp120	236,9	51,7	nd	nd	15,7	4,2	nd
mlgG1 47H4	184,8	33,8	-22	0,0321	13,7	3,3	0,5443
mlgG1 26A11	205,2	50	-13,4	0,2375	15,6	5	+1,0
mlgG1 7A6	180,2	39,2	-23,9	0,0131	13,4	2,9	0,3992

FIG. 12G

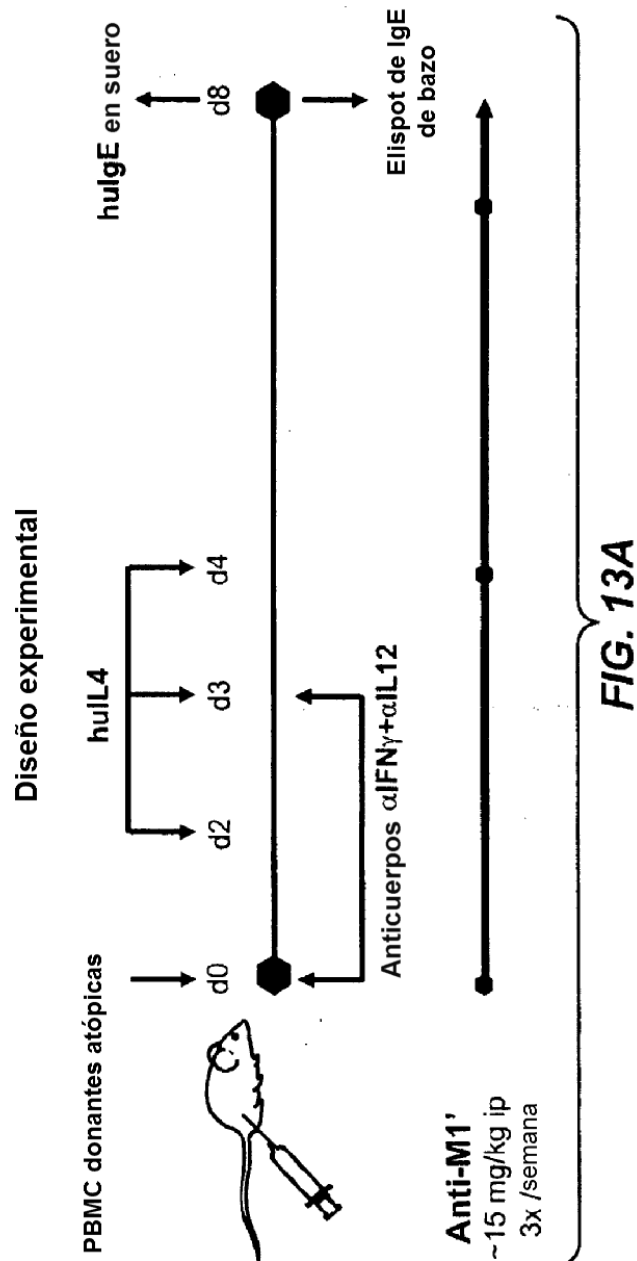


FIG. 13A

Efecto de 47H4 v5 en IgE en suero y células productoras de IgE

Nº 07-1232		IgE total (ng/ml)			Frecuencia de Elispot de hu-IgE		
Grupo	Media	D. T.	% de cambio	p-valor	Media	D. T.	% de cambio
hulG1 Herceptin	3158,2	1458,5	nd	nd	0,0108	0,0029	nd
hulG1 47H4 v5	651,9	272,8	-79,4%	<0,0001	0,0028	0,0011	-74,5%

FIG. 13D

Efecto de 47H4 v5 en IgE en suero y células productoras de IgE

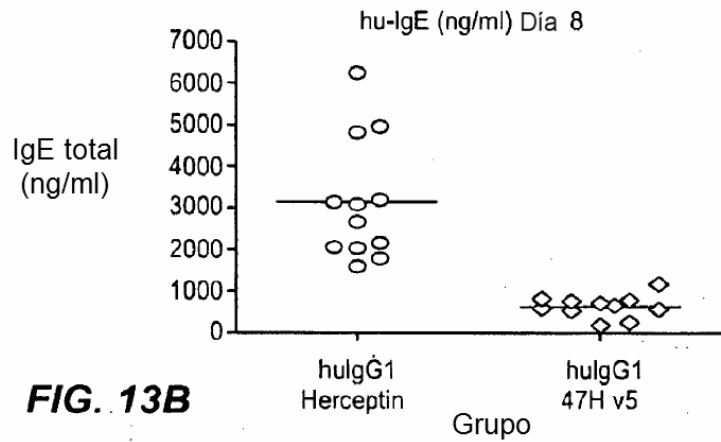


FIG. 13B

Efecto de 47H4 v5 en células productoras de IgE

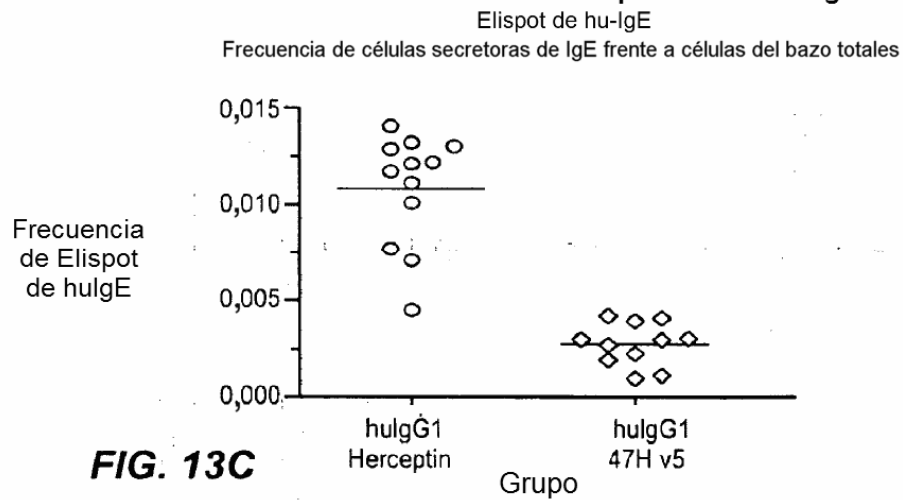


FIG. 13C

Efecto de 47H4 v5 en células plasmáticas totales

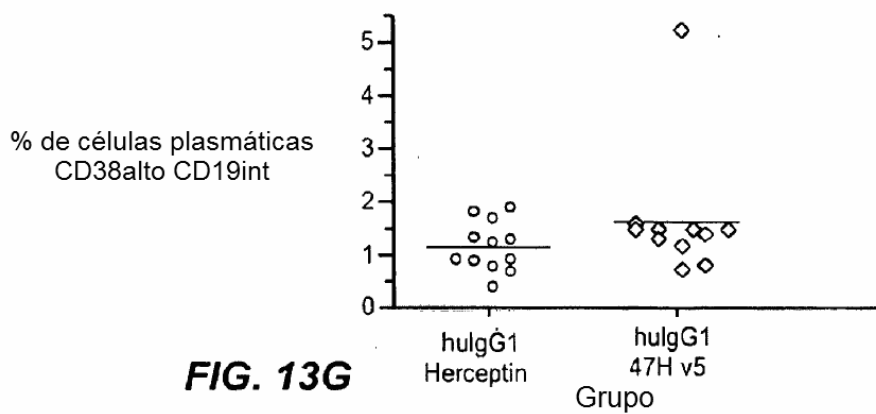


FIG. 13G

Efecto de 47H4 v5 en otras inmunoglobulinas en suero

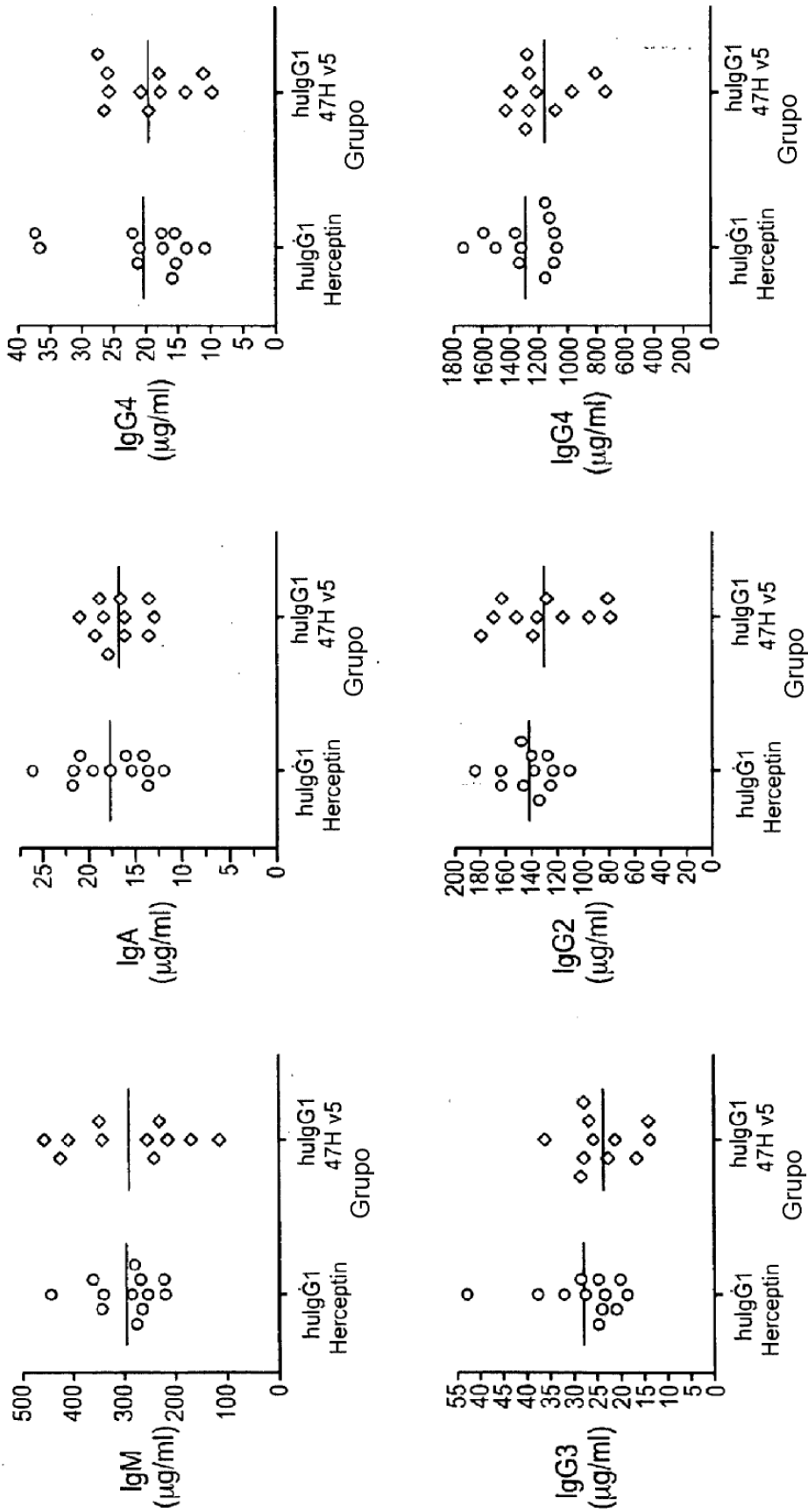


FIG. 13E

Efecto de 47H4 v5 en otras inmunoglobulinas en suero

Grupo	hulG1				hulG2			
	Media	D.T.	% de cambio	p-valor	Media	D.T.	% de cambio	p-valor
hulG1 Herceptin	1304,8	221	nd	nd	142,2	20,5	nd	nd
hulG1 47H4 v5	1165,2	232,4	-10,7	0,1545	130,7	34,7	-8,1	0,3357

Grupo	hulG3				hulG4			
	Media	D.T.	% de cambio	p-valor	Media	D.T.	% de cambio	p-valor
hulG1 Herceptin	27,9	9,5	nd	nd	20,5	8,9	nd	nd
hulG1 47H4 v5	23,6	6,9	-15,4	0,2331	19,7	6,3	-3,9	0,808

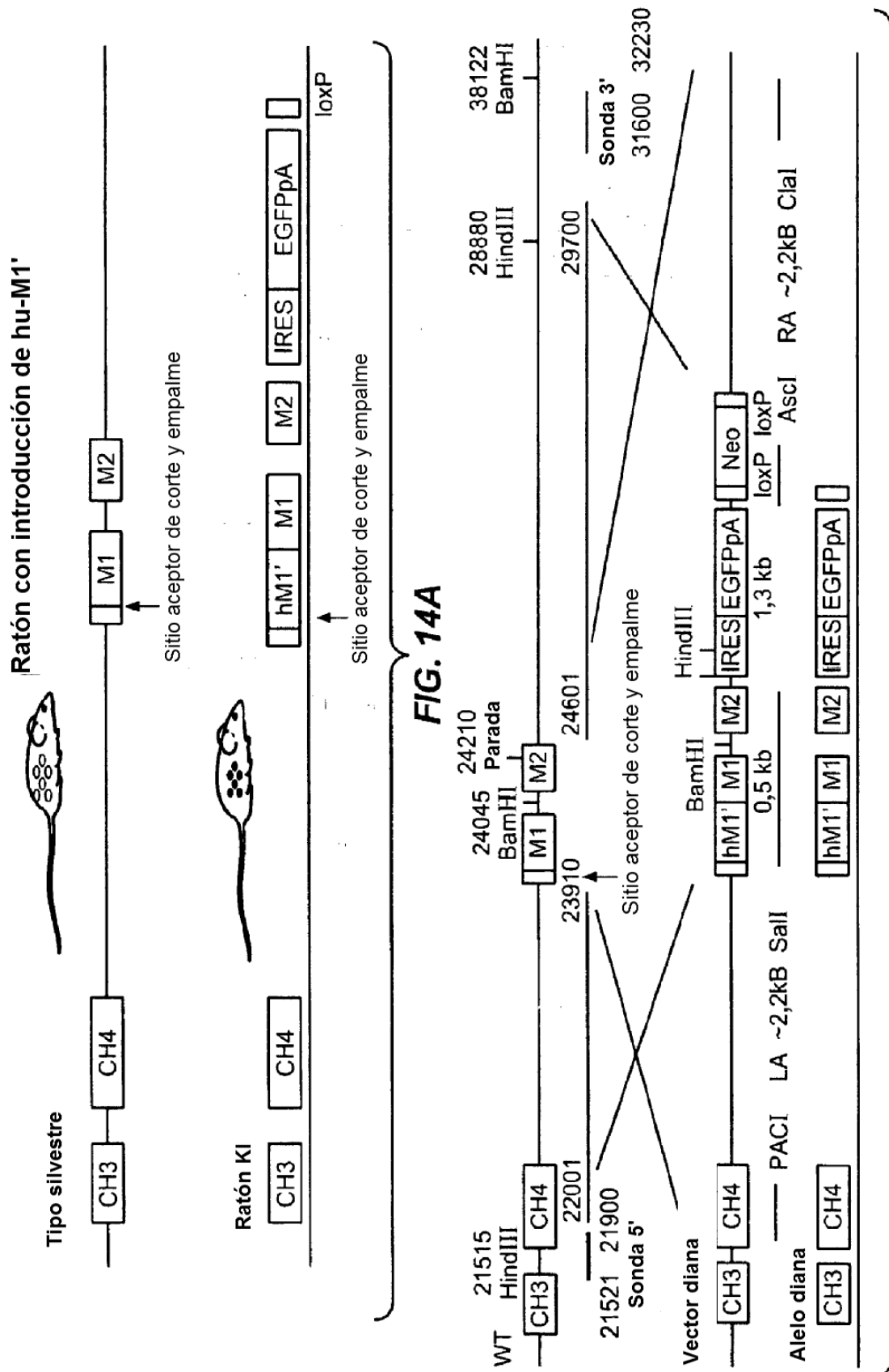
Grupo	hulGA				hulGM			
	Media	D.T.	% de cambio	p-valor	Media	D.T.	% de cambio	p-valor
hulG1 Herceptin	17,7	4,3	nd	nd	296,1	64,6	nd	nd
hulG1 47H4 v5	16,7	2,6	-5,6	0,5243	290,3	111,7	-2	0,8791

FIG. 13F

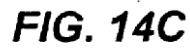
Efecto de 47H4 v5 en células plasmáticas totales

Grupo	PC totales (%)		
	Media	D.T.	p-valor
hulG1 Herceptin	1,2%	0,46%	nd
hulG1 47H4 v5	1,6%	1,2%	+33,3% 0,2132

FIG. 13H



$+/+$	$+/\text{Kin}$	Kin/Kin
-------	----------------	-------------------------



2A7E8

$$/+ \quad +/Kin$$

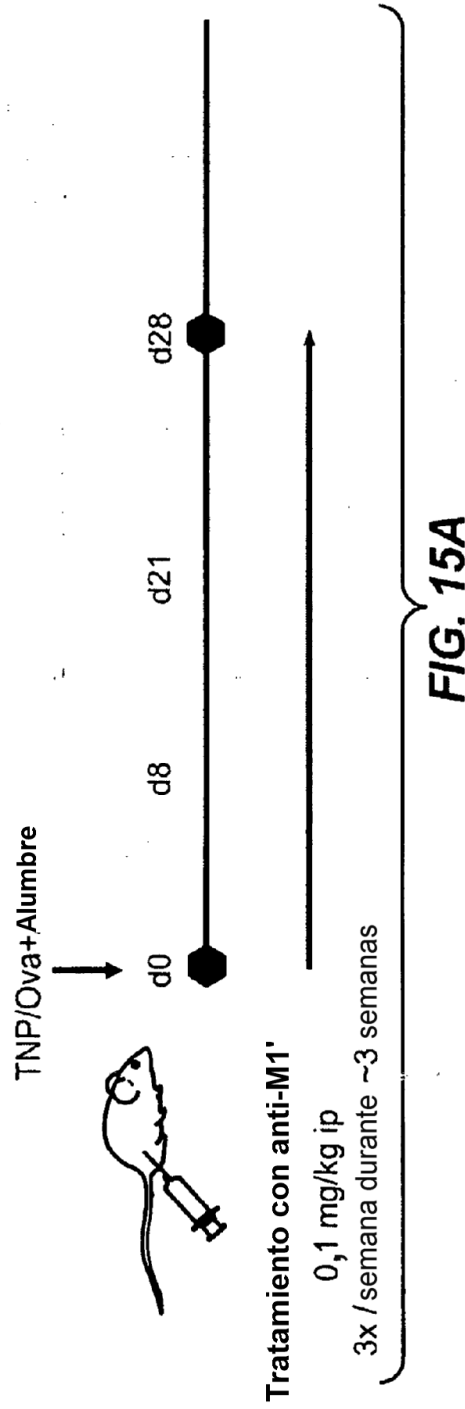
← WT (7,4 kB)
← Kin (3 kB)

← Kin (18,1 kB)
← WT (14,1 kB)

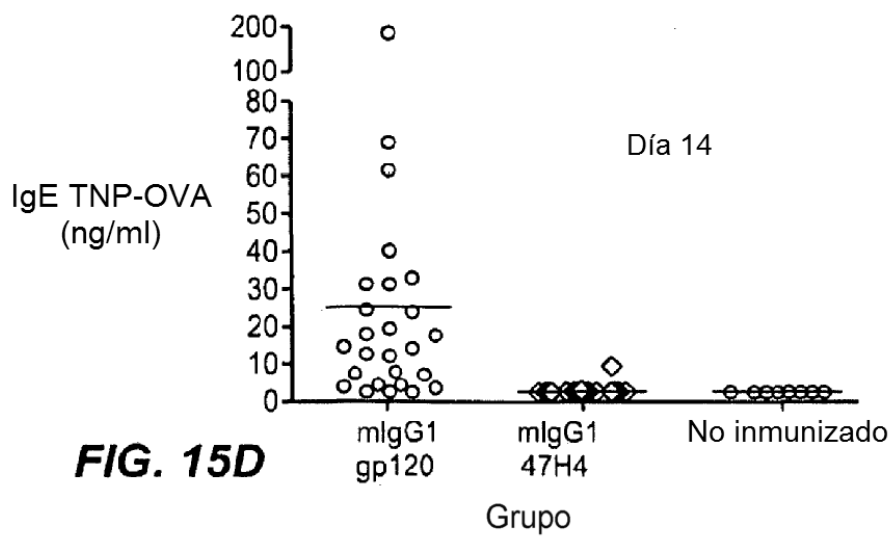
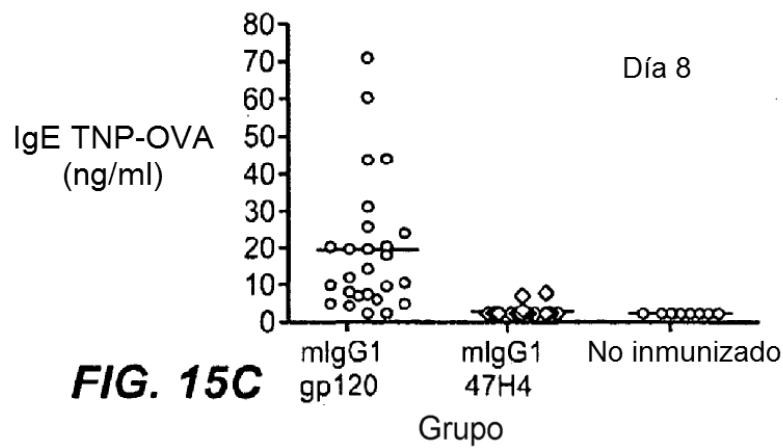
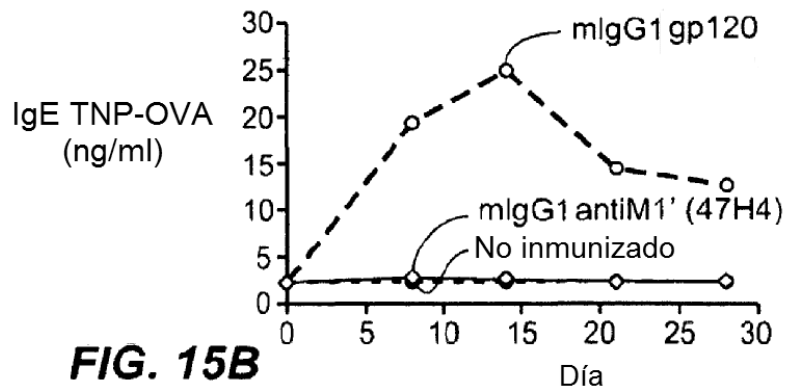
WT: 14,1 kb
KI: 18,1 kb

FIG. 14D

Efecto de anti-IgE/M1' en la respuesta inmunitaria primaria a TNP-OVA



**Efecto de anti-IgE/M1' en los niveles de IgE
Respuesta inmunitaria primaria a TNP-OVA**



Efecto de anti-IgE/M1' en los niveles de IgE en respuesta inmunitaria primaria a TNP-OVA

Nº07-0234 F Grupo	mIgE Día 8			mIgE Día 14		
	Media	D.T.	% de cambio	Media	D.T.	% de cambio
mIgG1 gp120	19,3	17,8	nd	25	36,8	nd
mIgG1 47H4	2,8	1,4	-97,5%	2,6	1,4	-98,7%
No inmunizado	<2,3	0	-100,0%	<2,3	0	-100%

FIG. 15E

Efecto de anti-IgE/M1' en los niveles de IgE en respuesta inmunitaria primaria a TNP-OVA

Grupo	mIgG1 Día 8			mIgG1 Día 14		
	Media	D.T.	% de cambio	Media	D.T.	% de cambio
mIgG1 gp120	3467,1	2841,7	nd	40592,8	32951,3	nd
mIgG1 47H4	2393,3	2049,5	-31,1%	25363,4	11750,8	-37,5%
No inmunizado	3,4	5,1	-100%	11,4	21,8	-100%

FIG. 15I

Efecto de anti-IgE/M1' en los niveles de IgG1 en la respuesta inmunitaria primaria a TNP-OVA

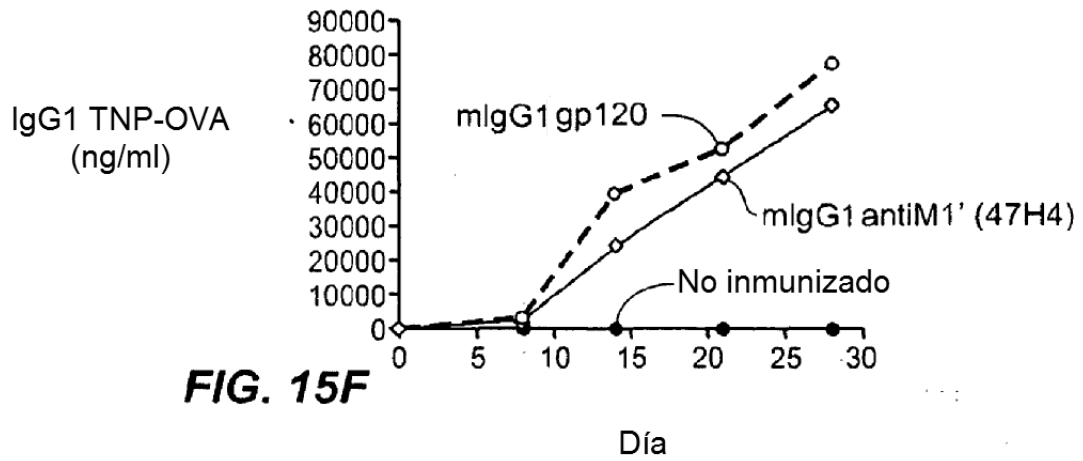


FIG. 15F

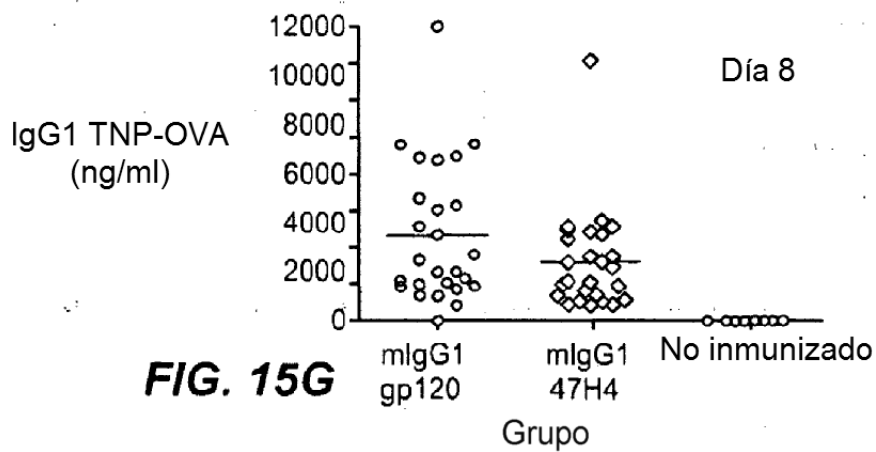


FIG. 15G

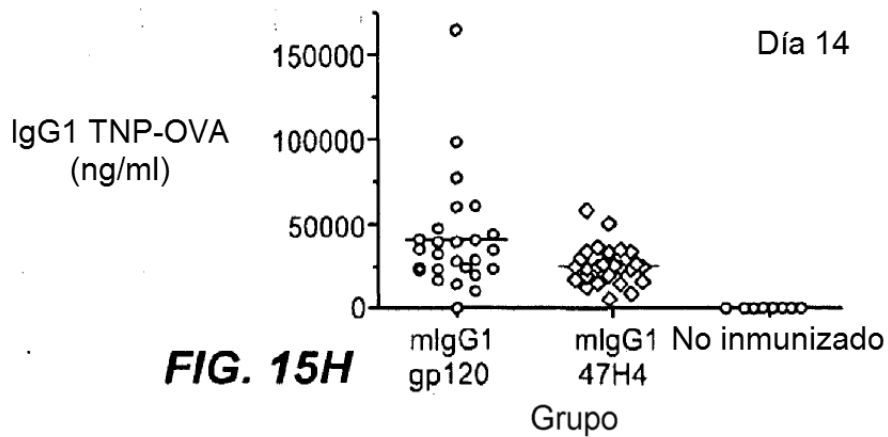
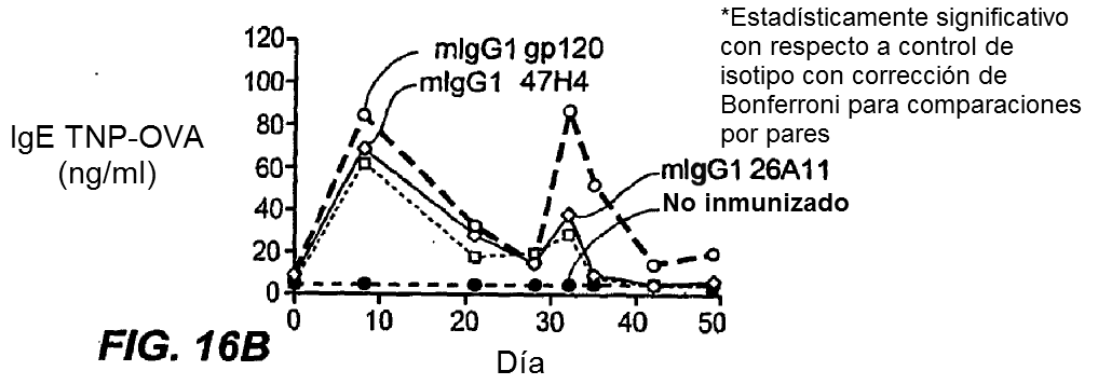


FIG. 15H

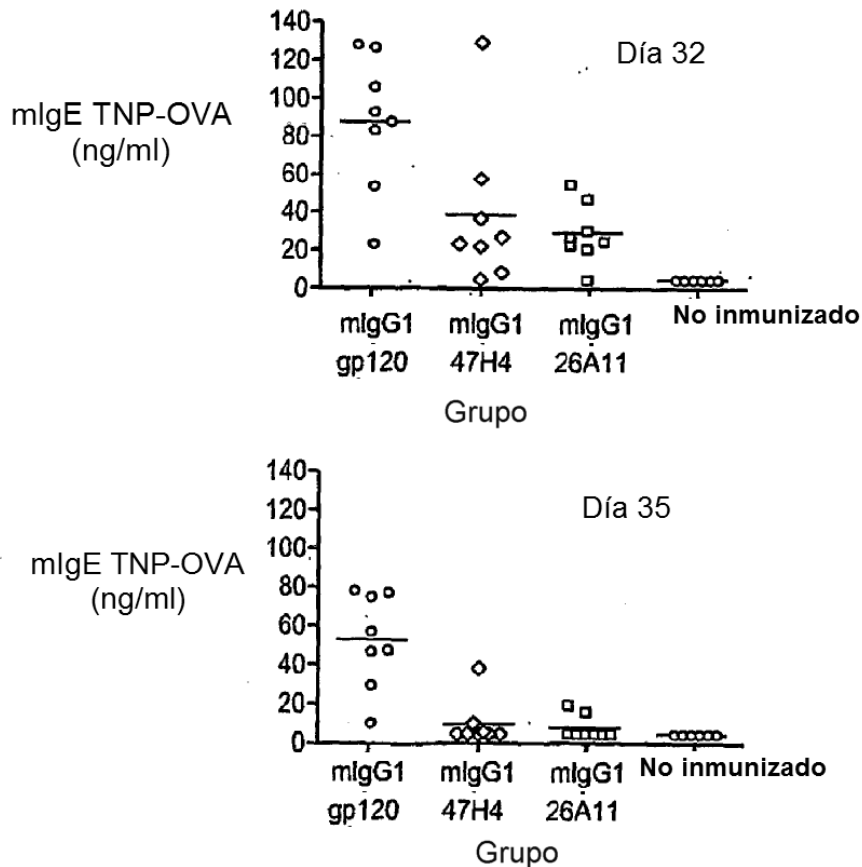
Efecto de anti-IgE/M1' en respuesta secundaria/de memoria a TNP-OVA



**Efecto de anti-IgE/M1' en respuesta secundaria/
de memoria a TNP-OVA**



**Efecto de anti-IgE/M1' en los niveles de IgE
en la respuesta inmunitaria de memoria a TNP-OVA**



Efecto de anti-IgE/M1' en los niveles de IgE en la respuesta inmunitaria de memoria a TNP-OVA

Grupo	IgE TNP-OVA (ng/ml) Día 32			IgE TNP-OVA (ng/ml) Día 35		
	Media	D.T.	% de cambio	Media	D.T.	% de cambio
mlgG1 gp120	87,3	35,3	nd	52,3	24	nd
mlgG1 47H4	38,5	40	-59,1%	9,7	11,6	-89,5%
mlgG1 26A11	25,3	12,5	-75,1%	7,8	5,8	-93,3%
No inmunizado	<4,69	0,0	-100%	<4,69	0,0	-100,0%

FIG. 16D

Efecto de anti-IgE/M1' en los niveles de IgE en respuesta secundaria/de memoria inducida por TNP-OVA

Grupo	AUC: IgE TNP-OVA (ng/ml)			Media diaria de IgE TNP-OVA		
	Media	D.T.	% de cambio	Media	D.T.	% de cambio
mlgG1 gp120	770	316,4	nd	36,7	15,1	nd
mlgG1 47H4	271	208,5	-74,3%	12,9	9,9	-74,3%
mlgG1 26A11	214	61,6	-83,5%	10,2	2,9	-83,4%
No inmunizado	98,4	0,0	-100%	<4,69	0,0	-100%

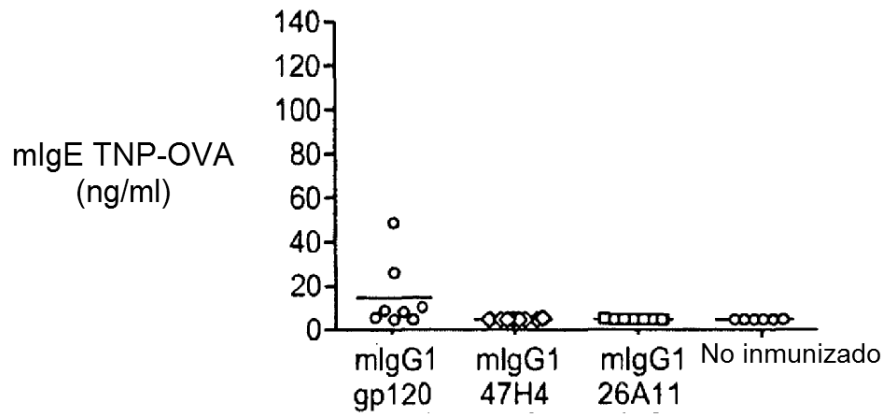
FIG. 16H

Efecto de anti-IgE/M1' en los niveles de IgG1 en respuesta secundaria/de memoria inducida por TNP-OVA

Grupo	mlgG1 TNP-OVA (1 µg/ml) Día 28			mlgG1 TNP-OVA (1 µg/ml) Día 35		
	Media	D.T.	% de cambio	Media	D.T.	% de cambio
mlgG1 gp120	107	64,7	nd	139	92,7	nd
mlgG1 47H4	91,7	56,3	-14,3%	149	73,8	+7,2%
mlgG1 26A11	61,7	48,3	-42,3%	99,3	84,4	-28,6%
No inmunizado	<0,00078	0,0	-100%	<0,00078	0,0	-100%

FIG. 16K

**Reducción de IgE por anti-IgE/M1'
en respuesta secundaria/de memoria inducida por TNP-OVA**

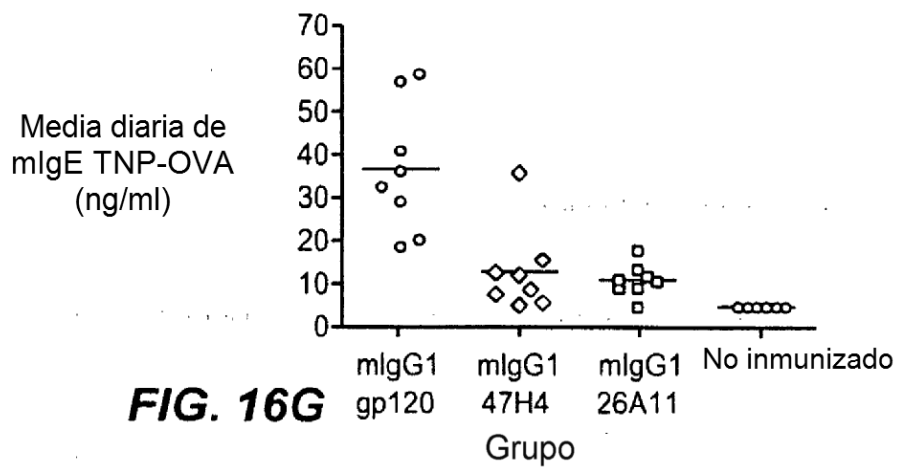
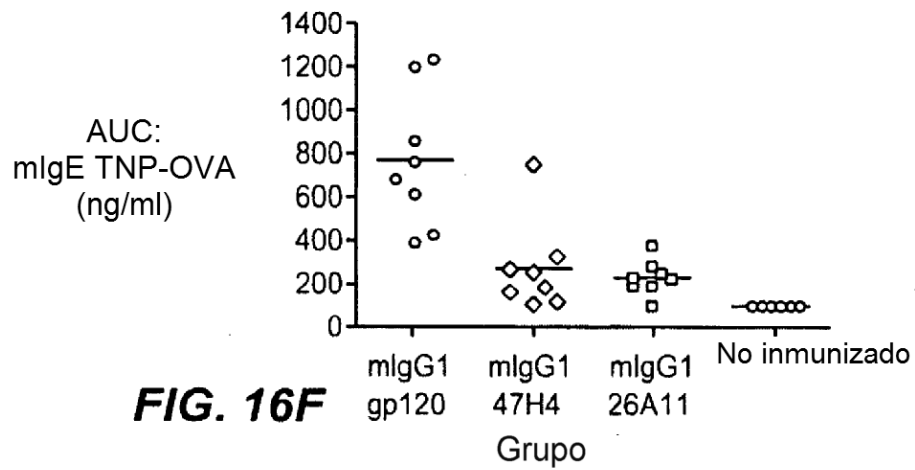


Nº07-0234 B

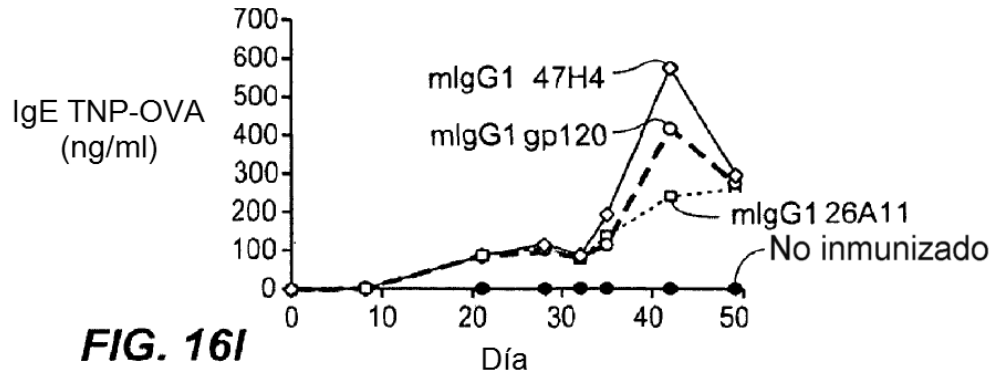
Grupo	IgE TNP-OVA (ng/ml) Día 42			
	Media	D.T.	% de cambio	p-valor
mlgG1 gp120	14,7	15,4	nd	nd
mlgG1 47H4	4,78	0,25	-99,1%	0,059
mlgG1 26A11	4,78	0,24	-99,1%	0,071
No inmunizado	<4,69	0,0	-100%	0,083

FIG. 16E

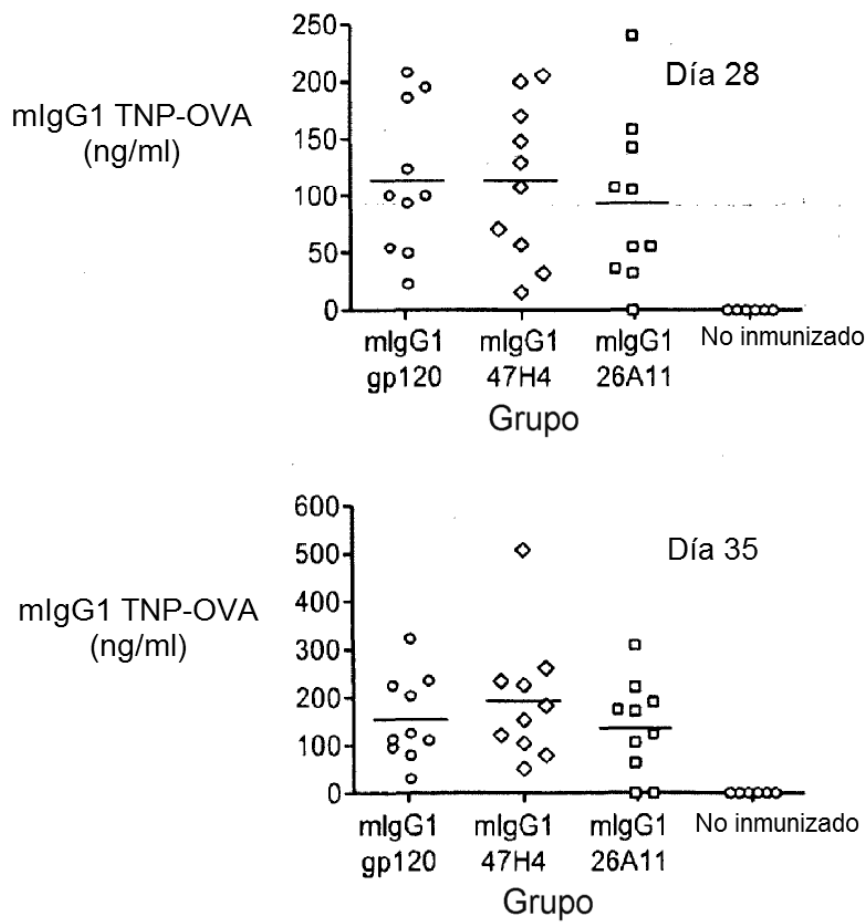
**Efecto de anti-IgE/M1' en IgE en respuesta secundaria/
de memoria inducida por TNP-OVA**

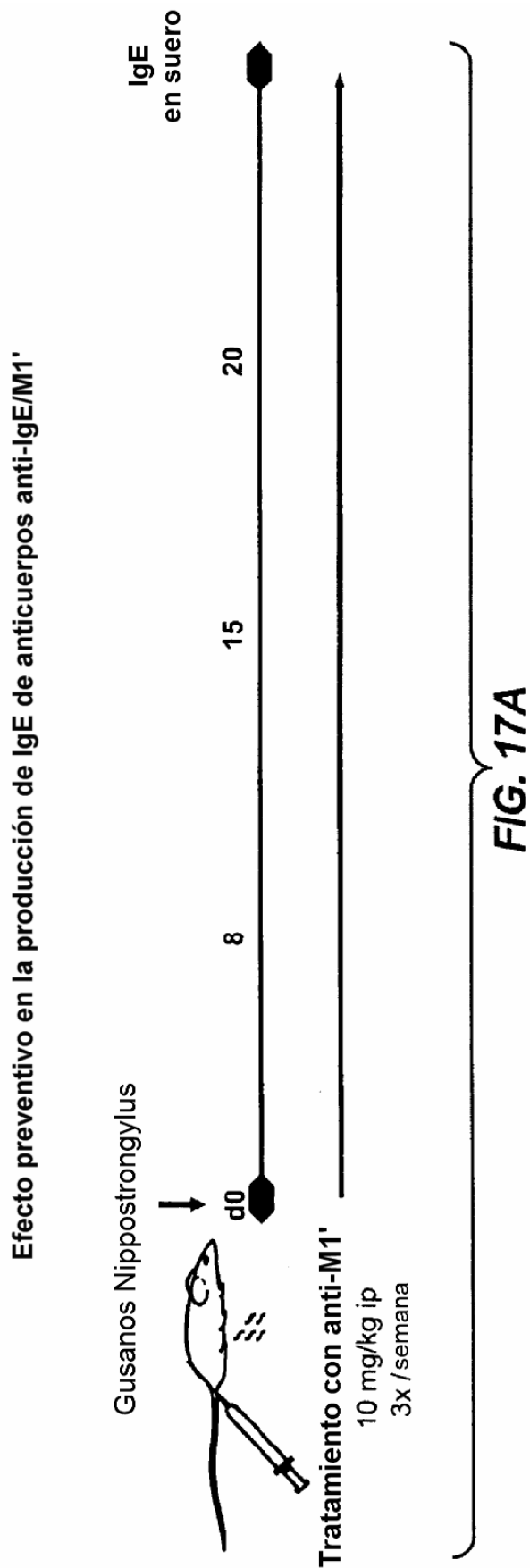


**Efecto de anti-IgE/M1' en IgG1 en respuesta secundaria/
de memoria inducida por TNP-OVA**



**Efecto de anti-IgE/M1' en IgG1 en respuesta secundaria/
de memoria inducida por TNP-OVA**





Efecto preventivo en la producción de IgE de anticuerpos anti-IgE/M1'

Grupo	IgE en suero total (ng/ml) Día 15		
	Media	D.T.	% de cambio
mlgG1 gp120	1633,6	738,8	nd
mlgG1 47H4	166,3	70,4	93,8%
mlgG1 26A11	174	66,5	93,4%
No infectado	70,1	35,9	-100%

FIG. 17D

**Efecto preventivo en la producción de IgE
de los anticuerpos anti-IgE/M1'**

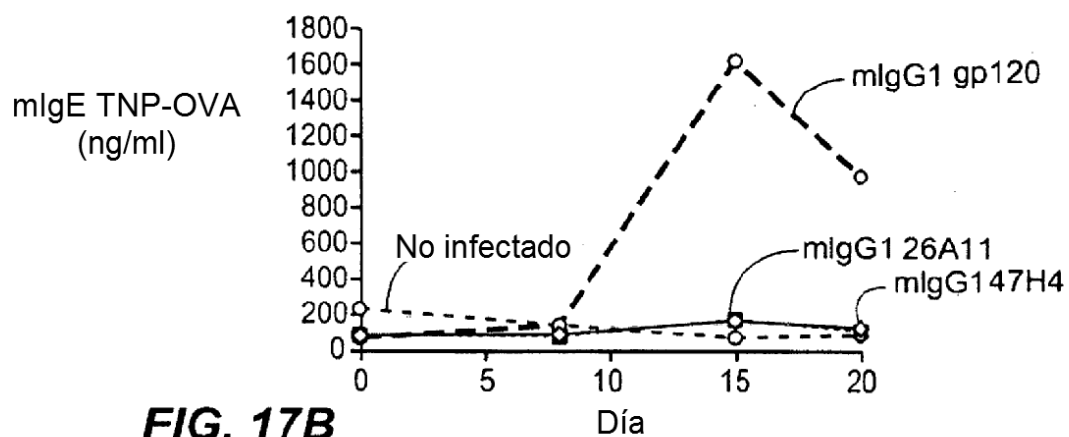


FIG. 17B

**Efecto preventivo en la producción de IgE
de los anti-IgE/M1'**

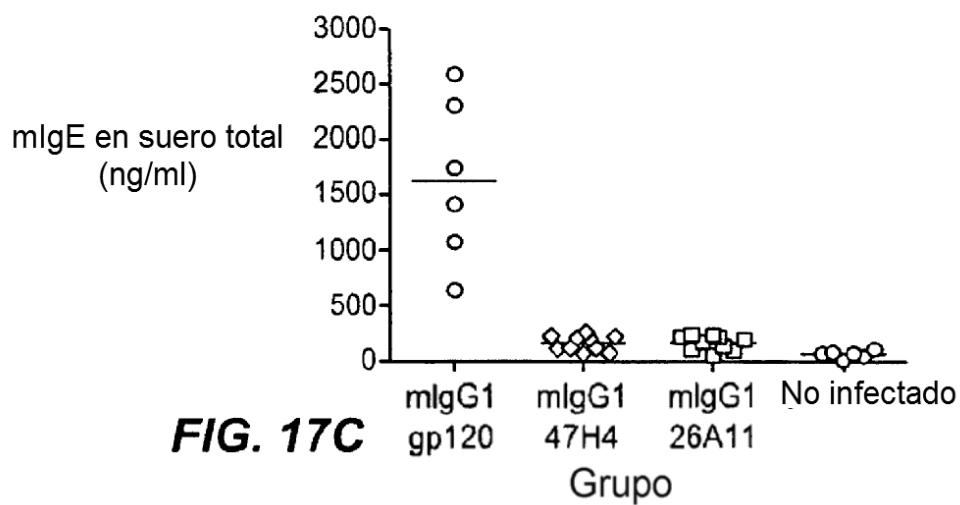


FIG. 17C

Efecto terapéutico en la producción de IgE máxima de los anticuerpos anti-IgE/M1'

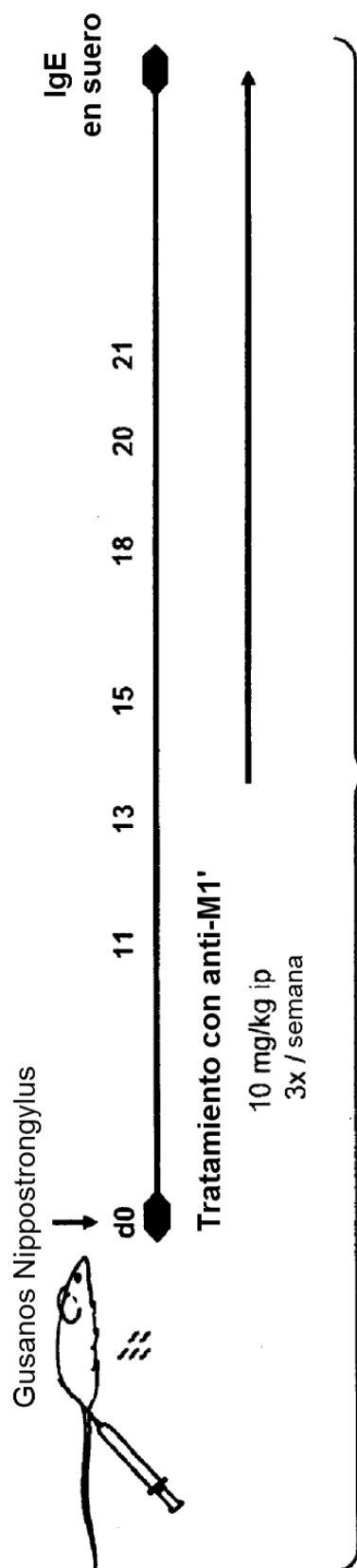


FIG. 18A

Efecto terapéutico en la producción de IgE máxima de los anticuerpos anti-IgE/M1'

mIgG1 26A11		mIgE total (ng/ml)		
Grupo	Media	D.T.	% de cambio	p-valor
mIgG1 gp120	2289	1367	nd	nd
mIgG1 47H4	270	123	-89,0%	<0,0001*
mIgG1 26A11	431	332	-81,9%	<0,0001*
No inmunizado	20,72	29,12	-100%	<0,0001*

* Estadísticamente significativo con respecto a control de isotipo con correccion de Bonferroni para comparaciones por pares

FIG. 18D

**Efecto terapéutico en la producción de IgE máxima
de los anticuerpos anti-IgE/M1'**

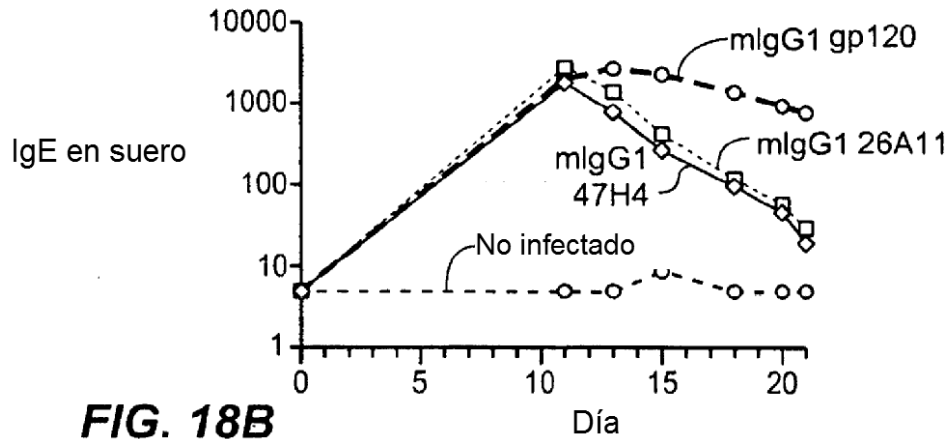


FIG. 18B

**Efecto terapéutico en la producción de IgE máxima
de los anticuerpos anti-IgE/M1'**

~90% de reducción IgE en un periodo de 4 días de tratamiento

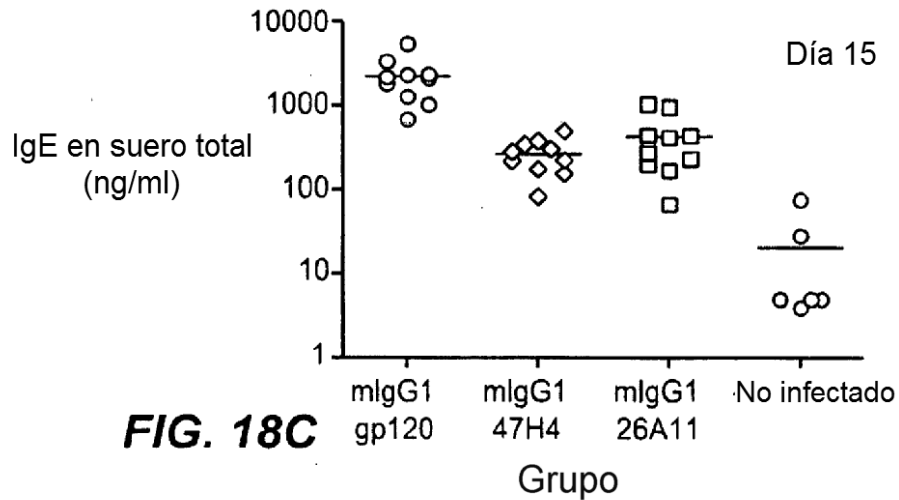
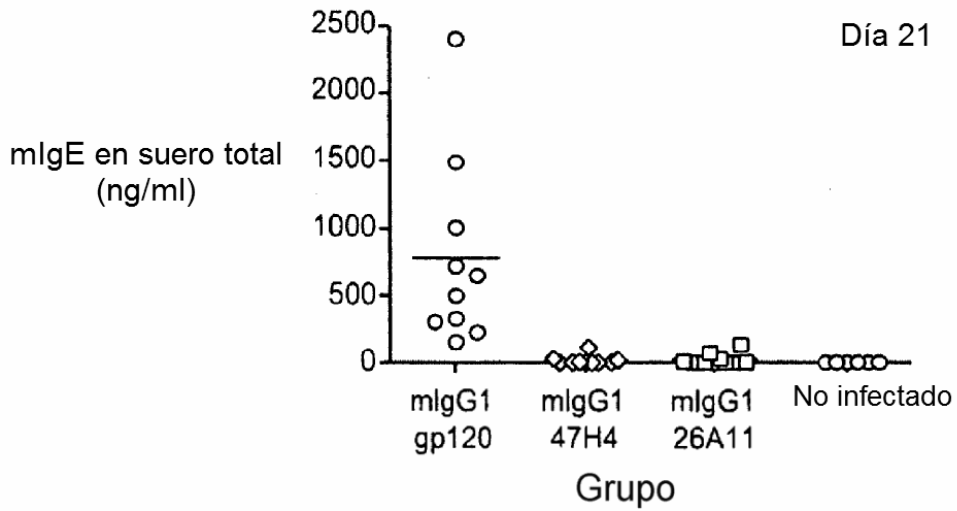


FIG. 18C

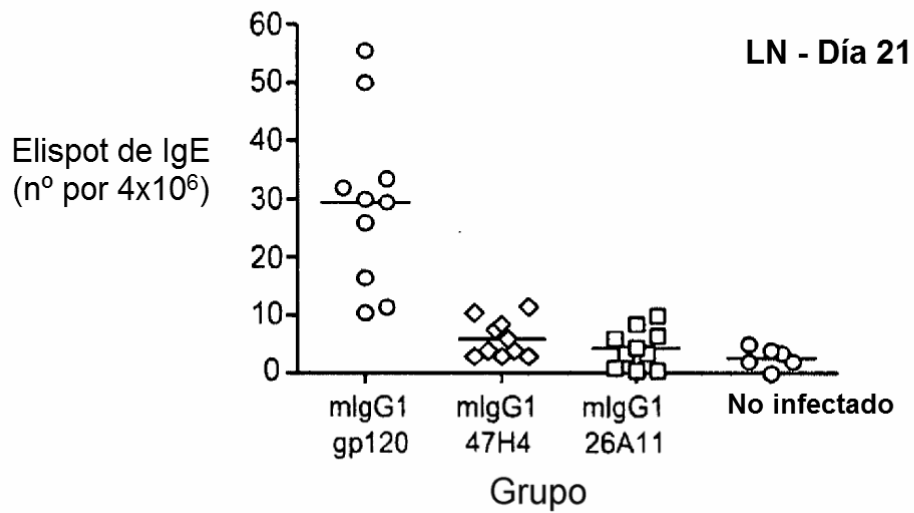
**Efecto de anti-IgE/M1' en los niveles de IgE y
células productoras de IgE**



Grupo	mgE total (ng/ml)			
	Media	D.T.	% de cambio	p-valor
mlgG1 gp120	784,5	701	nd	nd
mlgG1 47H4	21,4	35,4	-97,9%	0,0002*
mlgG1 26A11	30,3	44,8	-96,8%	0,0002*
No inmunizado	5	0,0	-100%	0,0009*

FIG. 18E

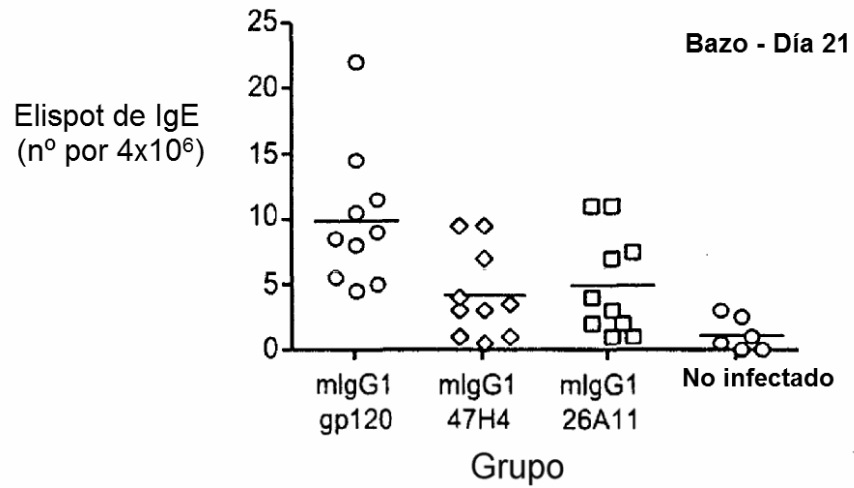
**Efecto de anti-IgE/M1' en los niveles de IgE y
células productoras de IgE**



Grupo	Frecuencia de Elispot de IgE LN			
	Media	D.T.	% de cambio	p-valor
mlgG1 gp120	29,5	14,9	nd	nd
mlgG1 47H4	6,1	3,2	-87,6%	<0,0001*
mlgG1 26A11	4,5	3,3	-93,8%	<0,0001*
No inmunizado	2,8	1,8	-100	<0,0001*

FIG. 18F

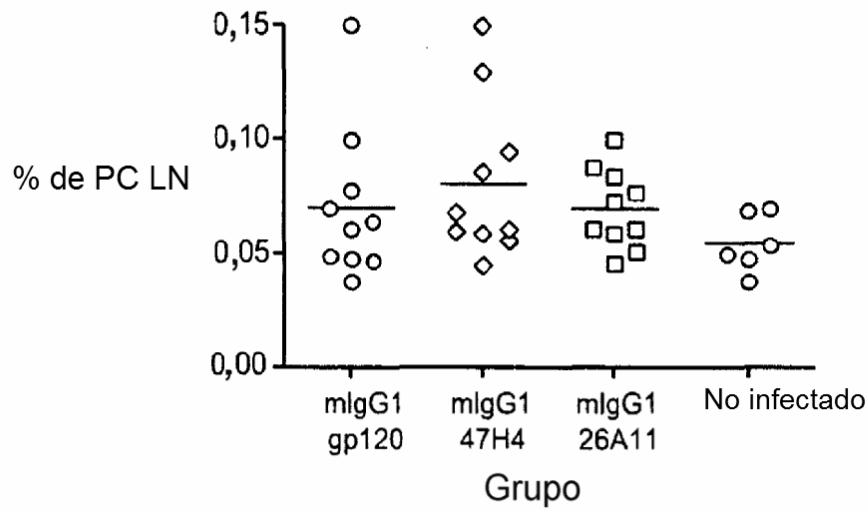
**Efecto de anti-IgE/M1' en los niveles de IgE y
células productoras de IgE**



Grupo	Frecuencia de Elispot de IgE de bazo			
	Media	D.T.	% de cambio	p-valor
mlgG1 gp120	9,9	5,3	nd	nd
mlgG1 47H4	4,2	3,4	-65,5%	0,0079*
mlgG1 26A11	4,95	3,9	-56,9%	0,0229*
No inmunizado	1,2	1,3	-100%	0,0004*

FIG. 18G

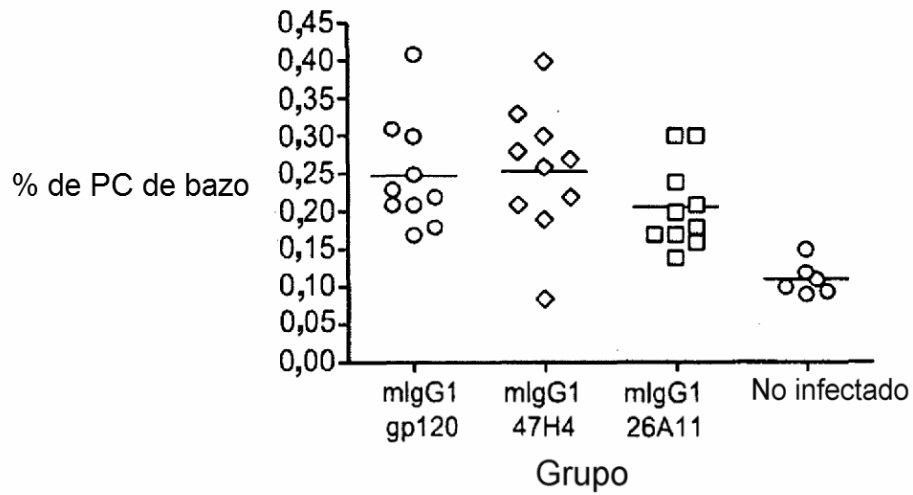
Efecto de anti-IgE/M1' en IgG1



Grupo	Frecuencia de PC totales LN			
	Media (%)	D.T.	% de cambio	p-valor
mlgG1 gp120	0,07	0,03	nd	nd
mlgG1 47H4	0,08	0,03	+50%	0,7377
mlgG1 26A11	0,07	0,02	0	1,0
No inmunizado	0,05	0,01	-100%	0,5596

FIG. 18H

Efecto de anti-IgE/M1' en IgG1



Grupo	Frecuencia de PC totales de bazo			
	Media	D.T.	% de cambio	p-valor
mlgG1 gp120	0,25	0,07	nd	nd
mlgG1 47H4	0,25	0,09	0	0,9959
mlgG1 26A11	0,21	0,06	-28,6%	0,3839
No inmunizado	0,11	0,02	-100%	0,0010

FIG. 18I

Efecto terapéutico en la producción de IgE tardía de los anticuerpos anti-IgE/M1'

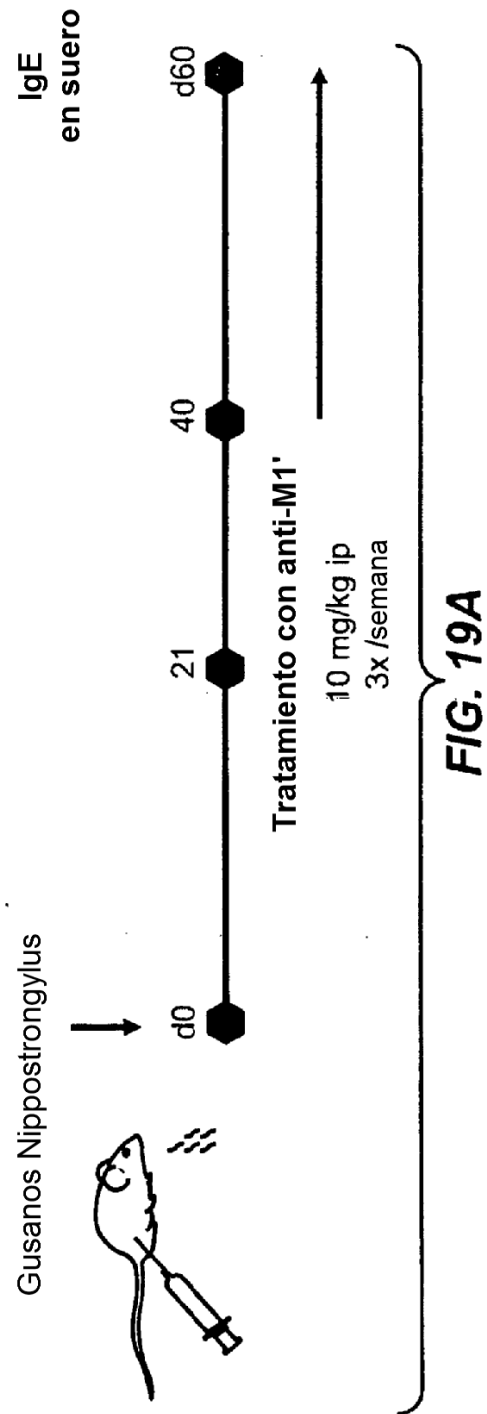


FIG. 19A

Efecto terapéutico en la producción de IgE tardía de anticuerpos anti-IgE/M1'

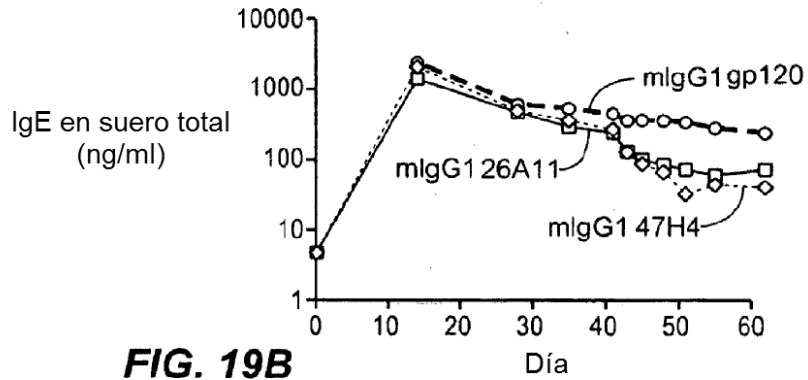


FIG. 19B

Efecto terapéutico en la producción de IgE tardía de anticuerpos anti-IgE/M1'

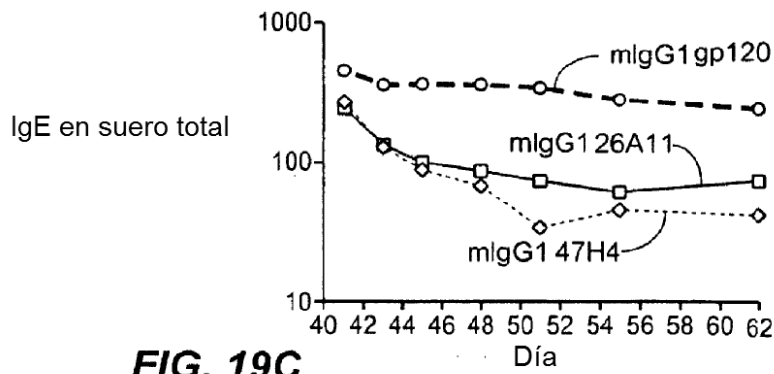


FIG. 19C

Efecto terapéutico en la producción de IgE tardía de anticuerpos anti-IgE/M1'

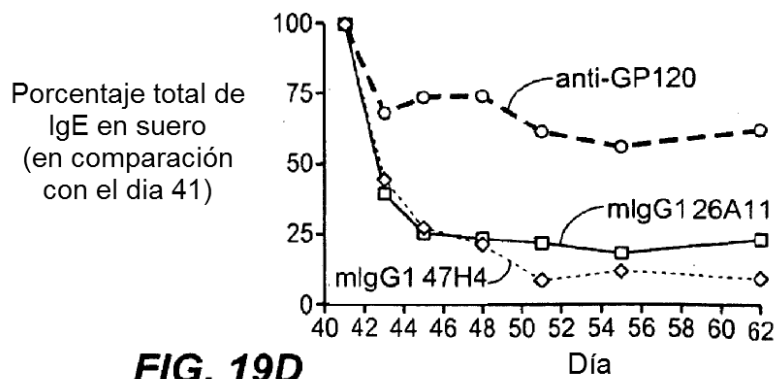
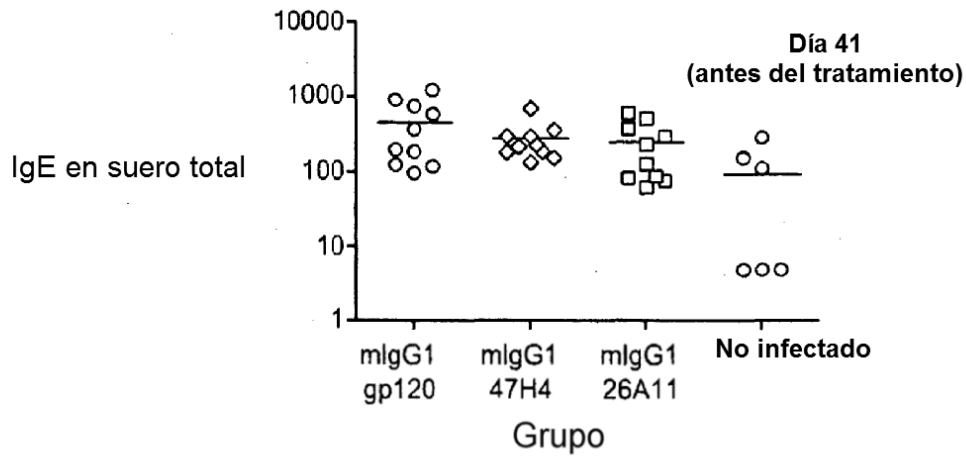


FIG. 19D

**Efecto terapéutico en la producción de IgE tardía
de anticuerpos anti-IgE/M1'**

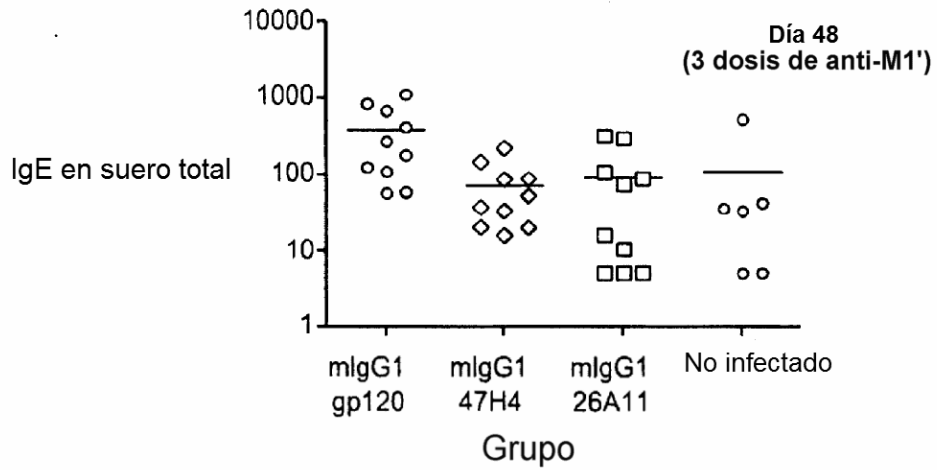


Grupo	IgE en suero total			
	Media	D.T.	% de cambio (d41)	p-valor (d41)
mlgG1 gp120	467,2	407,8	0	nd
mlgG1 47H4	280,0	168,6	0	0,2738
mlgG1 26A11	252,3	201,8	0	0,1843
No infectado	97,6	116,9	0	0,0267*

* Estadísticamente significativo con corrección de Bonferroni para comparaciones por pares

FIG. 19E

**Efecto terapéutico en la producción de IgE tardía
de anticuerpos anti-IgE/M1'**

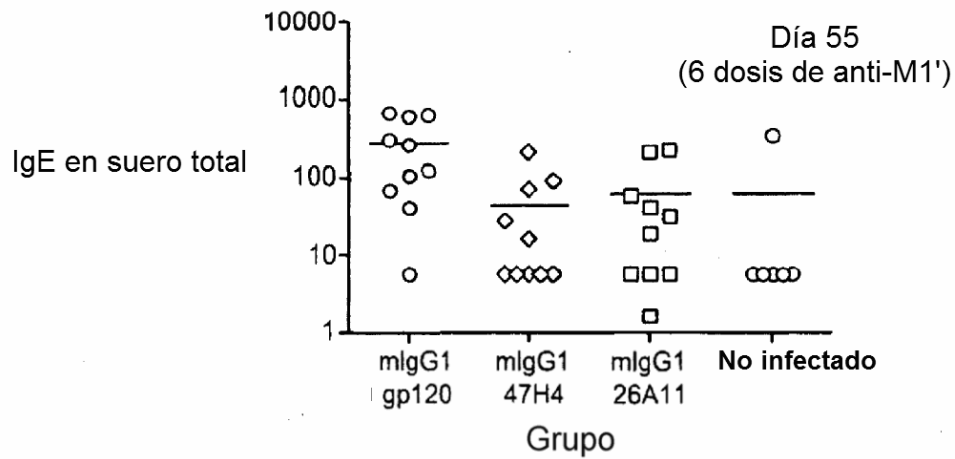


Grupo	IgE en suero total			
	Media	D.T.	% de cambio (d41)	p-valor (d41)
mlgG1 gp120	372,3	359,4	-20,3%	0,7715
mlgG1 47H4	69,8	64,2	-75,1%	0,0005*
mlgG1 26A11	89,7	115,5	-64,4%	0,0326*
No infectado	105,0	199,9	+7,6%	0,9938

* Estadísticamente significativo con corrección de Bonferroni para comparaciones por pares

FIG. 19F

Efecto terapéutico en la producción de IgE tardía de anticuerpos anti-IgE/M1'



Grupo	IgE en suero total			
	Media	D.T.	% de cambio (d41)	p-valor (d41)
mlgG1 gp120	292,4	271,0	-37,4%	0,4401
mlgG1 47H4	46,3	68,4	-83,5%	0,0001*
mlgG1 26A11	63,3	89,3	-74,9%	0,0126*
No infectado	64,9	144,2	-33,5%	0,9158

* Estadísticamente significativo con corrección de Bonferroni para comparaciones por pares

FIG. 19G