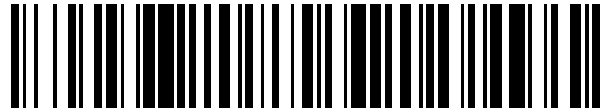


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 507 542**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2008 E 10164673 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.08.2014 EP 2236518**

54 Título: **Anticuerpo anti-factor B humanizado**

30 Prioridad:

14.03.2007 US 906816 P

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

15.10.2014

73 Titular/es:

**ALEXION CAMBRIDGE CORPORATION (100.0%)
352 Knotter Drive
Cheshire, CT 06410, US**

72 Inventor/es:

**EMLLEN, WOODRUFF;
HOLERS, V. MICHAEL y
FLYNN, PETER**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 507 542 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpo anti-factor B humanizado

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a nuevas formas modificadas de un anticuerpo monoclonal y a los fragmentos de unión al antígeno del mismo que se unen a la proteína del complemento factor B y que inhiben de manera selectiva la ruta alternativa del complemento. La invención también se refiere en general al uso de tales anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos para tratar enfermedades en las que desempeña un papel la ruta alternativa del complemento. En particular, la invención se refiere al uso de tales anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos para inhibir la activación de la ruta alternativa del complemento, y para tratar enfermedades en las que está implicada la activación de la ruta alternativa del complemento. Tales trastornos incluyen, pero sin limitación, hipersensibilidad de las vías respiratorias e inflamación de las vías respiratorias, lesión por isquemia-reperusión, y trastornos relacionados en animales, que incluyen seres humanos.

Antecedentes de la invención

15 Ciertas células del sistema inmunitario producen proteínas denominadas anticuerpos o inmunoglobulinas ("Ig") en respuesta a la presencia de proteínas exógenas en el cuerpo, tales como proteínas bacterianas o virales. Los anticuerpos se unen y neutralizan las proteínas exógenas en el cuerpo.

20 Los anticuerpos se unen en general firmemente y de manera específica a sus antígenos proteicos objetivo, lo que los hace agentes terapéuticos potencialmente útiles para tratar una amplia diversidad de enfermedades caracterizadas por la expresión alterada de proteínas. Se han identificado muchos objetivos proteicos adecuados para la terapia de enfermedades mediada por anticuerpos mediante el uso de moléculas de anticuerpos no humanos. Para muchas aplicaciones terapéuticas, sin embargo, la eficacia y la seguridad de los anticuerpos no humanos está comprometida, debido a que las moléculas Ig no humanas son inmunógenas por sí mismas (es decir, capaces de inducir una respuesta inmunitaria). Así, antes de que se puedan aprobar los anticuerpos para el uso terapéutico, normalmente se deben modificar para reducir o eliminar su inmunogenicidad. El procedimiento Humaneering™ de anticuerpos produce anticuerpos modificados para reducir la inmunogenicidad a la vez que se conserva la capacidad de unirse de manera específica a su antígeno objetivo.

30 La presente solicitud describe la "humanización" de un anticuerpo monoclonal murino que se une al factor B y bloquea de manera selectiva la ruta alternativa del complemento. La ruta alternativa del complemento se activa normalmente por bacterias, parásitos, virus u hongos, aunque también se ha informado que los anticuerpos IgA y ciertas cadenas ligeras de Ig activan la ruta. La activación de la ruta alternativa se inicia cuando el factor B circulante se une a C3 activado (C3b o C3H₂O). Este complejo se escinde después mediante el factor circulante D para producir un fragmento enzimáticamente activo, C3bBb o C3(H₂O)Bb. Estas dos enzimas pueden escindir el C3 circulante y generar C3b, que controla la inflamación y también amplifica adicionalmente el proceso de activación, por lo que se genera un bucle de retroactivación. El factor B es necesario para posibilitar la activación de la ruta alternativa.

40 Los estudios recientes han demostrado que la ruta alternativa del complemento desempeña un papel importante en la patogénesis de varios modelos animales de enfermedad. La activación del complemento en el riñón tras la lesión por isquemia/reperusión está mediada casi exclusivamente por la ruta alternativa, y la ruta alternativa desempeña un papel crucial en el desarrollo de la artritis. Quizás muy sorprendentemente, se ha demostrado que los ratones deficientes de la ruta alternativa están protegidos de nefritis en el modelo MRL/lpr de nefritis lúpica y de muerte fetal mediada por anti-fosfolípido, modelos de enfermedades que tradicionalmente se habría supuesto que estuvieran mediadas por la ruta clásica del complemento.

45 El anticuerpo murino anti-factor B del cual derivaron las variantes humanizadas descritas en la presente memoria se produjo inyectando en ratones deficientes de factor B ("fB^{-/-}") una proteína de fusión que comprende el segundo y tercer dominios de repeticiones consenso cortas ("SCR") del factor B fusionados con una inmunoglobulina. Los ratones se criaron después en busca de anticuerpos hacia el factor B. Las células de bazo de un ratón sometido a inyección que produjo anticuerpos anti-factor B se fusionaron con células de mieloma según los procedimientos habituales conocidos en la técnica. Una de las células de hibridoma resultantes, número 1379, produjo un anticuerpo IgG₁ ("mAb 1379") que inhibe completamente la activación de la ruta alternativa del complemento *in vitro* e *in vivo*. Los fragmentos Fab' de unión al antígeno del mAb 1379 también inhiben completamente la activación de la ruta alternativa del complemento. La línea celular de hibridoma que produce mAb 1379 se ha depositado en la American Type Culture Collection ("ATCC") con el N° de depósito PTA-6230.

55 La cartografía de epítomos demostró que el mAb 1379 se une al factor B en el tercer dominio de SCR. Los experimentos posteriores demostraron que el mAb 1379 inhibe la activación alternativa del complemento impidiendo la formación del complejo C3bBb. Finalmente, el mAb 1379 se une a un epítomo conservado en múltiples especies de mamíferos, tal como se demuestra por su capacidad de inhibir la activación alternativa del complemento en el suero de varias especies diferentes, que incluyen ratones, ratas, seres humanos, babuinos, monos rhesus, monos cinomolgos, cerdos, conejos, y caballos. La producción y caracterización del anticuerpo anti-factor B mAb 1379 se

describe con más detalle en la publicación de patente de EE.UU. N° US 2005/0260198 A1.

Compendio breve de la invención

- 5 En un aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-factor B humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo según la reivindicación 1 que se une de manera selectiva al factor B en el tercer dominio de repeticiones consenso cortas ("SCR") e impide la formación del complejo C3bBb, en el que el anticuerpo humanizado o el fragmento de unión al antígeno del mismo tiene una constante de disociación en equilibrio (" K_D ") entre $3,0 \times 10^{-9}$ M y $7,0 \times 10^{-9}$ M. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-factor B humanizado o el fragmento de unión al antígeno del mismo tiene una K_D de alrededor de $3,7 \times 10^{-9}$ M o menos, alrededor de $4,5 \times 10^{-9}$ M o menos, alrededor de $5,4 \times 10^{-9}$ M o menos, o alrededor de $6,5 \times 10^{-9}$ M o menos.
- 10 En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-factor B humanizado o los fragmentos de unión al antígeno del mismo comprenden un polipéptido de la región V_k seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID N°: 14 (anticuerpo de referencia TA10), SEQ ID N°: 16 (Fab' de TA101-1), SEQ ID N°: 18 (Fab' de TA102-4), y SEQ ID N°: 20 (Fab' de TA103-2), y un polipéptido de la región V_H seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID N°: 15 (anticuerpo de referencia TA10), SEQ ID N°: 17 (Fab' de TA101-1), SEQ ID N°: 19 (Fab' de TA102-4), y SEQ ID N°: 21 (Fab' de TA103-2).
- 15 En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-factor B humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende un polipéptido de la región V_k que comprende SEQ ID N°: 14 (anticuerpo de referencia TA10) y un polipéptido de la región V_H que comprende SEQ ID N°: 15 (anticuerpo de referencia TA10), y tiene una K_D de $6,55 \times 10^{-9}$ M o menos. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-factor B humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende un polipéptido de la región V_k que comprende SEQ ID N°: 16 (Fab' de TA101-1) y un polipéptido de la región V_H que comprende SEQ ID N°: 17 (Fab' de TA101-1), y tiene una K_D de $4,53 \times 10^{-9}$ M o menos. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-factor B humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende un polipéptido de la región V_k que comprende SEQ ID N°: 18 (Fab' de TA102-4) y un polipéptido de la región V_H que comprende SEQ ID N°: 19 (Fab' de TA102-4), y tiene una K_D de $5,40 \times 10^{-9}$ M o menos. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-factor B humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende un polipéptido de la región V_k que comprende SEQ ID N°: 20 (Fab' de TA103-2) y un polipéptido de la región V_H que comprende SEQ ID N°: 21 (Fab' de TA103-2), y tiene una K_D de $3,73 \times 10^{-9}$ M o menos. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-factor B humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende un fragmento de unión al antígeno seleccionado del grupo que consiste en Fab', (Fab')₂, Fv, scFv, y diacuerpos. En ciertas realizaciones, el fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo anti-factor B humanizado es un Fab'.
- 20 En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-factor B humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo tiene una K_D de alrededor de $3,7 \times 10^{-9}$ M o menos, alrededor de $4,5 \times 10^{-9}$ M o menos, alrededor de $5,4 \times 10^{-9}$ M o menos, o alrededor de $6,5 \times 10^{-9}$ M o menos.
- 25 En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-factor B humanizado o los fragmentos de unión al antígeno del mismo comprenden un polipéptido de la región V_k seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID N°: 16 (Fab' de TA101-1), SEQ ID N°: 18 (Fab' de TA102-4), y SEQ ID N°: 20 (Fab' de TA103-2), y un polipéptido de la región V_H seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID N°: 35 (Fab' de TA101-1), SEQ ID N°: 36 (Fab' de TA102-4), y SEQ ID N°: 37 (Fab' de TA103-2). En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-factor B humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende un polipéptido de la región V_k que comprende SEQ ID N°: 16 (Fab' de TA101-1) y un polipéptido de la región V_H que comprende SEQ ID N°: 35 (Fab' de TA101-1). En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-factor B humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende un polipéptido de la región V_k que comprende SEQ ID N°: 18 (Fab' de TA102-4) y un polipéptido de la región V_H que comprende SEQ ID N°: 36 (Fab' de TA102-4). En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-factor B humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende un polipéptido de la región V_k que comprende SEQ ID N°: 20 (Fab' de TA103-2) y un polipéptido de la región V_H que comprende SEQ ID N°: 37 (Fab' de TA103-2).
- 30 También se describe en la presente memoria un anticuerpo anti-factor B humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo que comprende un polipéptido de la región V_k seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID N°: 14 (anticuerpo de referencia TA10), SEQ ID N°: 16 (Fab' de TA101-1), SEQ ID N°: 18 (Fab' de TA102-4), y SEQ ID N°: 20 (Fab' de TA103-2), en el que la secuencia de aminoácidos del polipéptido de la región V_k es alrededor de un 80% idéntica al polipéptido de la región V_k de la línea germinal humana más cercana, alrededor de un 85% idéntica al polipéptido de la región V_k de la línea germinal humana más cercana, alrededor de un 90% idéntica al polipéptido de la región V_k de la línea germinal humana más cercana, o alrededor de un 95% idéntica al polipéptido de la región V_k de la línea germinal humana más cercana. El anticuerpo anti-factor B humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo puede comprender un polipéptido de la región V_H seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID N°: 15 (anticuerpo de referencia TA10), SEQ ID N°: 17 (Fab' de TA101-1), SEQ ID N°: 19 (Fab' de TA102-4), y SEQ ID N°: 21 (Fab' de TA103-2), en el que la secuencia de aminoácidos del polipéptido de la región V_H es alrededor de un 80% idéntica al polipéptido de la región V_H de la línea germinal humana más cercana, alrededor de un 85% idéntica al polipéptido de la región V_H de la línea germinal humana más cercana, alrededor de un 90% idéntica al polipéptido de la región V_H de la línea germinal humana más cercana, o alrededor de un 95% idéntica al polipéptido de la región V_H de la línea germinal humana más cercana. El anticuerpo anti-factor B humanizado o los fragmentos de unión al antígeno del mismo pueden comprender un polipéptido de la región V_k seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID N°: 14 (anticuerpo de referencia TA10), SEQ ID N°: 16 (Fab' de TA101-1), SEQ ID N°: 18 (Fab' de TA102-4), y SEQ ID N°: 20 (Fab' de TA103-2), y un polipéptido de la región V_H seleccionado del grupo

que consiste en SEQ ID N°: 15 (anticuerpo de referencia TA10), SEQ ID N°: 17 (Fab' de TA101-1), SEQ ID N°: 19 (Fab' de TA102-4), y SEQ ID N°: 21 (Fab' de TA103-2), en el que la secuencia de aminoácidos del polipéptido de la región V_k y la secuencia de aminoácidos del polipéptido de la región V_H son alrededor de un 80% idénticas al polipéptido de la región V_k de la línea germinal humana más cercana y el polipéptido de la región V_H de la línea germinal humana más cercana, alrededor de un 85% idénticas al polipéptido de la región V_k de la línea germinal humana más cercana y el polipéptido de la región V_H de la línea germinal humana más cercana, alrededor de un 90% idénticas al polipéptido de la región V_k de la línea germinal humana más cercana y el polipéptido de la región V_H de la línea germinal humana más cercana, o alrededor de un 95% idénticas al polipéptido de la región V_k de la línea germinal humana más cercana y el polipéptido de la región V_H de la línea germinal humana más cercana.

En un aspecto relacionado, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-factor B humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo según la reivindicación 1 que se une de manera selectiva al factor B en el tercer dominio de repeticiones consenso cortas ("SCR") e impide la formación del complejo C3bBb, en el que el anticuerpo humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo tiene una K_D entre $3,0 \times 10^{-9}$ M y $7,0 \times 10^{-9}$ M. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-factor B humanizado o los fragmentos de unión al antígeno del mismo comprenden una región V_k que comprende un determinante de la especificidad de unión ("BSD") derivado de la tercera región determinante de la complementariedad ("CDR3") y la cuarta región estructural ("FR4") seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID N°: 22 (anticuerpo de referencia TA10), SEQ ID N°: 24 (Fab' de TA101-1), SEQ ID N°: 26 (Fab' de TA102-4), y SEQ ID N°: 28 (Fab' de TA103-2), y la región V_H del anticuerpo anti-factor B humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende un BSD derivado de la región CDR3-FR4 seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID N°: 23 (anticuerpo de referencia TA10), SEQ ID N°: 25 (Fab' de TA101-1), SEQ ID N°: 27 (Fab' de TA102-4), y SEQ ID N°: 29 (Fab' de TA103-2). En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-factor B humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende un polipéptido BSD de la región V_k que comprende SEQ ID N°: 22 (anticuerpo de referencia TA10) y un polipéptido BSD de la región V_H que comprende SEQ ID N°: 23 (anticuerpo de referencia TA10), y tiene una K_D de $6,55 \times 10^{-9}$ M. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-factor B humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende un polipéptido BSD de la región V_k que comprende SEQ ID N°: 24 (Fab' de TA101-1) y un polipéptido BSD de la región V_H que comprende SEQ ID N°: 25 (Fab' de TA101-1), y tiene una K_D de $4,53 \times 10^{-9}$ M. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-factor B humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende un polipéptido BSD de la región V_k que comprende SEQ ID N°: 26 (Fab' de TA102-4) y un polipéptido BSD de la región V_H que comprende SEQ ID N°: 27 (Fab' de TA102-4), y tiene una K_D de $5,40 \times 10^{-9}$ M. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-factor B humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende un polipéptido BSD de la región V_k que comprende SEQ ID N°: 28 (Fab' de TA103-2) y un polipéptido BSD de la región V_H que comprende SEQ ID N°: 29 (Fab' de TA103-2), y tiene una K_D de $3,73 \times 10^{-9}$ M. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-factor B humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende un fragmento de unión al antígeno seleccionado del grupo que consiste en Fab', (Fab')₂, Fv, scFv, y diacuerpos. En ciertas realizaciones, el fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo anti-factor B humanizado es un Fab'.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-factor B humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo según la reivindicación 1 que se une de manera selectiva al factor B en el tercer dominio de repeticiones consenso cortas ("SCR") e impide la formación del complejo C3bBb que comprende un polipéptido de la región V_k seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID N°: 14 (anticuerpo de referencia TA10), SEQ ID N°: 16 (Fab' de TA101-1), SEQ ID N°: 18 (Fab' de TA102-4), y SEQ ID N°: 20 (Fab' de TA103-2), y un polipéptido de la región V_H seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID N°: 15 (anticuerpo de referencia TA10), SEQ ID N°: 17 (Fab' de TA101-1), SEQ ID N°: 19 (Fab' de TA102-4), y SEQ ID N°: 21 (Fab' de TA103-2). En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-factor B humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende un polipéptido de la región V_k que comprende SEQ ID N°: 14 (anticuerpo de referencia TA10) y un polipéptido de la región V_H que comprende SEQ ID N°: 15 (anticuerpo de referencia TA10). En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-factor B humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende un polipéptido de la región V_k que comprende SEQ ID N°: 16 (Fab' de TA101-1) y un polipéptido de la región V_H que comprende SEQ ID N°: 17 (Fab' de TA101-1). En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-factor B humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende un polipéptido de la región V_k que comprende SEQ ID N°: 18 (Fab' de TA102-4) y un polipéptido de la región V_H que comprende SEQ ID N°: 19 (Fab' de TA102-4). En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-factor B humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende un polipéptido de la región V_k que comprende SEQ ID N°: 20 (Fab' de TA103-2) y un polipéptido de la región V_H que comprende SEQ ID N°: 21 (Fab' de TA103-2). En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-factor B humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende un polipéptido de la región V_k seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID N°: 14 (anticuerpo de referencia TA10), SEQ ID N°: 16 (Fab' de TA101-1), SEQ ID N°: 18 (Fab' de TA102-4), y SEQ ID N°: 20 (Fab' de TA103-2). En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-factor B humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende un polipéptido de la región V_H seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID N°: 15 (anticuerpo de referencia TA10), SEQ ID N°: 17 (Fab' de TA101-1), SEQ ID N°: 19 (Fab' de TA102-4), y SEQ ID N°: 21 (Fab' de TA103-2). En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-factor B humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende un fragmento de unión al antígeno seleccionado del grupo que consiste en Fab', (Fab')₂, Fv, scFv, y diacuerpos. En ciertas realizaciones, el fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo anti-factor B humanizado es un Fab'.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-factor B humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo según la reivindicación 1 que se une de manera selectiva al factor B en el tercer dominio de repeticiones consenso cortas ("SCR") e impide la formación del complejo C3bBb, en el que la región V_k del anticuerpo anti-factor B humanizado o el fragmento de unión al antígeno del mismo comprende un determinante de la especificidad de unión ("BSD") derivado de la tercera región determinante de la complementariedad ("CDR3") y la cuarta región estructural ("FR4") seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID N°: 22 (anticuerpo de referencia TA10), SEQ ID N°: 24 (Fab' de TA101-1), SEQ ID N°: 26 (Fab' de TA102-4), y SEQ ID N°: 28 (Fab' de TA103-2), y la región V_H del anticuerpo anti-factor B humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende un BSD derivado de la región CDR3-FR4 seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID N°: 23 (anticuerpo de referencia TA10), SEQ ID N°: 25 (Fab' de TA101-1), SEQ ID N°: 27 (Fab' de TA102-4), y SEQ ID N°: 29 (Fab' de TA103-2). En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-factor B humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende un polipéptido BSD de la región V_k que comprende SEQ ID N°: 22 (anticuerpo de referencia TA10) y un polipéptido BSD de la región V_H que comprende SEQ ID N°: 23 (anticuerpo de referencia TA10). En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-factor B humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende un polipéptido BSD de la región V_k que comprende SEQ ID N°: 24 (Fab' de TA101-1) y un polipéptido BSD de la región V_H que comprende SEQ ID N°: 25 (Fab' de TA101-1). En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-factor B humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende un polipéptido BSD de la región V_k que comprende SEQ ID N°: 26 (Fab' de TA102-4) y un polipéptido BSD de la región V_H que comprende SEQ ID N°: 27 (Fab' de TA102-4). En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-factor B humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende un polipéptido BSD de la región V_k que comprende SEQ ID N°: 28 (Fab' de TA103-2) y un polipéptido BSD de la región V_H que comprende SEQ ID N°: 29 (Fab' de TA103-2). En ciertas realizaciones, la región V_k del anticuerpo anti-factor B humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende un determinante de la especificidad de unión ("BSD") derivado de la tercera región determinante de la complementariedad ("CDR3") y la cuarta región estructural ("FR4") seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID N°: 22 (anticuerpo de referencia TA10), SEQ ID N°: 24 (Fab' de TA101-1), SEQ ID N°: 26 (Fab' de TA102-4), y SEQ ID N°: 28 (Fab' de TA103-2). En ciertas realizaciones, la región V_H del anticuerpo anti-factor B humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende un BSD derivado de la región CDR3-FR4 seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID N°: 23 (anticuerpo de referencia TA10), SEQ ID N°: 25 (Fab' de TA101-1), SEQ ID N°: 27 (Fab' de TA102-4), y SEQ ID N°: 29 (Fab' de TA103-2). En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-factor B humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende un fragmento de unión al antígeno seleccionado del grupo que consiste en Fab', (Fab')₂, Fv, scFv, y diacuerpos. En ciertas realizaciones, el fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo anti-factor B humanizado es un Fab'.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-factor B humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo según la reivindicación 1 para el uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno en el que desempeña un papel la activación de la ruta alternativa del complemento, según la reivindicación 5. En ciertas realizaciones, la enfermedad o trastorno es la hipersensibilidad de las vías respiratorias ("AHR") o la inflamación de las vías respiratorias. En ciertas realizaciones, se administra cualquiera de los anticuerpos anti-factor B humanizados o los fragmentos de unión al antígeno de los mismos al individuo en una cantidad eficaz para reducir de manera medible la AHR en el animal en comparación con antes de la administración del anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno del mismo. En ciertas realizaciones, la AHR o la inflamación de las vías respiratorias está asociada a una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), aspergilosis broncopulmonar alérgica, neumonía por hipersensibilidad, neumonía eosinofílica, enfisema, bronquitis, bronquitis alérgica, bronquiectasia, fibrosis quística, tuberculosis, neumonitis por hipersensibilidad, asma ocupacional, sarcoidosis, síndrome de la enfermedad reactiva de las vías respiratorias, enfermedad pulmonar intersticial, síndrome hiper-eosinofílico, rinitis, sinusitis, asma inducida por el ejercicio, asma inducida por la contaminación, asma de variante tusiva, parasitosis pulmonar, infección por virus sincitial respiratorio ("RSV"), infección por virus paragripal ("PIV"), infección por rinovirus ("RV"), e infección por adenovirus. En ciertas realizaciones, la AHR o la inflamación de las vías respiratorias está asociada a inflamación alérgica, asma, o EPOC.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-factor B humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo según la reivindicación 1 para el uso según la reivindicación 8 en la inhibición de la activación de la ruta alternativa del complemento en un individuo que tiene, o corre el riesgo de desarrollar, una afección o enfermedad en la que la activación de la ruta alternativa del complemento contribuye a la afección o enfermedad, exacerba al menos un síntoma de la afección o enfermedad, o provoca la afección o enfermedad.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende una cantidad eficaz del anticuerpo anti-factor B humanizado o los fragmentos de unión al antígeno del mismo según la reivindicación 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones, el vehículo farmacéuticamente aceptable se selecciona del grupo que consiste en: un polvo seco, dispersable; etanol anhidro; cápsulas pequeñas; liposomas; un aerosol nebulizado; y un excipiente inyectable.

Descripción breve de los dibujos

La FIG. 1 es un gel de agarosa que muestra los productos de cADN bicatenarios generados con grupos de cebadores específicos de la región V degenerados mediante el uso de un molde de una primera cadena de cADN preparada a partir de mARN aislado del hibridoma que produce el mAb 1379.

La FIG. 2 es una comparación de las secuencias de aminoácidos derivadas de las secuencias de cADN de V_H y V_K clonadas a partir de la línea celular de hibridoma que produce mAb 1379.

La FIG. 3 es una comparación de las secuencias de aminoácidos amino-terminales derivadas de las secuencias de cADN de V_H y V_K clonadas respecto de las secuencias de aminoácidos amino-terminales determinadas a partir del mAb 1379.

La FIG. 4 es una comparación de la unión del factor B entre el Fab' clonado TA003 y un Fab' derivado del mAb 1379 mediante digestión con papaína.

La FIG. 5 muestra la cinética de unión del fragmento Fab' a factor B humano recombinante analizada con el sistema de FortéBio Octet mediante interferometría de bio-capa.

La FIG. 6 es una comparación de secuencias de aminoácidos derivadas de la secuencia de los aislamientos de anticuerpos humanizados TA101-1, TA102-4, y TA103-2 a las secuencias correspondientes del anticuerpo de referencia TA10 y de genes de los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras de la línea germinal humana más cercanas ("gen V_L " y "gen V_H ") y segmentos de unión ("segmento J") (V_H1-02/J_H4 y V_K1V-B3/J_K2 humanos).

Descripción detallada de la invención

Los anticuerpos anti-factor B humanizados o los fragmentos de unión al antígeno de los mismos que se unen de manera selectiva al factor B del complemento e inhiben de manera selectiva la activación de la ruta alternativa del complemento se pueden usar para tratar cualquier enfermedad o trastorno que implica la ruta alternativa del complemento en animales, lo que incluye seres humanos. En particular, tales anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos se pueden usar para tratar cualquier enfermedad o trastorno en animales, lo que incluye seres humanos, en el que desempeña un papel la activación de la ruta alternativa del complemento. Tales enfermedades o trastornos incluyen, por ejemplo, asma alérgica y la inflamación de las vías respiratorias e hipersensibilidad de las vías respiratorias ("AHR") asociada, enfermedad pulmonar obstructiva crónica ("EPOC"), aspergilosis broncopulmonar alérgica, neumonía por hipersensibilidad, neumonía eosinofílica, enfisema, bronquitis, bronquitis alérgica, bronquiectasia, fibrosis quística, tuberculosis, neumonitis por hipersensibilidad, asma ocupacional, sarcoidosis, síndrome de enfermedad reactiva de las vías respiratorias, enfermedad pulmonar intersticial, síndrome hiper-eosinofílico, rinitis, sinusitis, asma inducida por el ejercicio, asma inducida por la contaminación, asma de variante tusiva, parasitosis pulmonar, infección por virus sincitial respiratorio ("RSV"), infección por virus paragripal ("PIV"), infección por rinovirus ("RV") e infección por adenovirus, y lesión por isquemia-reperfusión. Véase, p.ej., la publicación de patente de EE.UU. N° US 2005/0260198 A1.

El asma alérgica es un síndrome habitual asociado a la inflamación de las vías respiratorias y AHR. En los pacientes con asma alérgica, la exposición a un alérgeno inhalado conduce a un incremento de AHR y de la inflamación de las vías respiratorias. Los estudios han mostrado niveles incrementados de fragmentos biológicamente activos derivados de la familia de proteínas C3, C4 y C5 del complemento, especialmente C3a y C5a en líquido de lavado broncoalveolar ("BAL"). Esto sugiere que, en estos pacientes, la activación de la ruta del complemento por medio de un mecanismo inducido por alérgenos se da en el pulmón tras la exposición al alérgeno. Los modelos animales han proporcionado una percepción adicional sobre el papel del complemento para el desarrollo de la enfermedad alérgica de las vías respiratorias. Los animales deficientes de receptor de C3 o C3a parecen estar protegidos contra el desarrollo de la enfermedad de las vías respiratorias inducida por alérgenos. Véase, p.ej., la publicación de patente de EE.UU. N° US 2005/0260198 A1.

Definiciones

Tal como se usa en la presente memoria, el término "anticuerpo" o "inmunoglobulina" se refiere a las glicoproteínas de la superfamilia de proteínas inmunoglobulinas ("Ig"). Un anticuerpo o molécula de inmunoglobulina ("Ig") es tetramérica, y comprende dos polipéptidos de cadenas ligeras idénticas y dos polipéptidos de cadenas pesadas idénticas (los términos "polipéptido de cadena ligera" y "cadena ligera" o "polipéptido de cadena pesada" y "cadena pesada" se usan de manera intercambiable en la presente memoria para describir los polipéptidos de una molécula de Ig). Las dos cadenas pesadas están unidas entre sí mediante enlaces disulfuro, y cada cadena pesada está unida a una cadena ligera mediante un enlace disulfuro. Cada molécula de Ig de longitud completa contiene al menos dos sitios de unión para un objetivo o antígeno específico.

El sistema inmunitario produce varias clases diferentes de moléculas Ig ("isotipos"), que incluyen IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, y cada una se distingue por la clase particular de polipéptido de cadena pesada presente: alfa ("α") hallada en IgA, delta ("δ") hallada en IgD, epsilon ("ε") hallada en IgE, gamma ("γ") hallada en IgG, y mu ("μ") hallada en IgM. Existen al menos cinco polipéptidos de cadenas pesadas y diferentes ("isotipos") hallados en IgG. En contraste, existen solamente dos isotipos de polipéptidos de cadenas ligeras, denominados cadenas kappa ("κ") y lambda ("λ"). Las características distintivas de los isotipos de anticuerpos se definen por las secuencias de los dominios constantes de la cadena pesada.

Una molécula de IgG comprende dos cadenas ligeras (forma κ o λ) y dos cadenas pesadas (forma γ) unidas entre sí mediante enlaces disulfuro. Las formas κ y λ de la cadena ligera de IgG contienen ambas un dominio de secuencias

de aminoácidos relativamente variables, denominado región variable (denominada de manera variada "región V_L", "región V_K", o "región V_λ") y un dominio de secuencias de aminoácidos relativamente conservadas, denominado región constante ("región C_L"). De forma similar, cada cadena pesada de IgG contiene una región variable ("región V_H") y una o más regiones conservadas: una cadena pesada de IgG completa contiene tres dominios constantes (regiones "C_{H1}", "C_{H2}" y "C_{H3}") y una región bisagra. Dentro de cada región V_L- o V_H, hay intercaladas regiones hipervariables, también conocidas como regiones determinantes de la complementariedad ("CDR"), entre regiones estructurales relativamente conservadas ("FR"). En general, la región variable de un polipéptido de cadena ligera o pesada contiene cuatro FR y tres CDR dispuestas en el siguiente orden a lo largo del polipéptido: NH₂-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-COOH. En conjunto, la CDR y FR determinan la estructura tridimensional del sitio de unión de IgG y, así, la proteína o antígeno objetivo específico al que se une esa molécula de IgG. Cada molécula de IgG es dimérica, capaz de unirse a dos moléculas de antígeno. La escisión de una IgG dimérica con la proteasa papaína produce dos fragmentos de unión al antígeno idénticos ("Fab") y un fragmento "Fc", denominado así porque cristaliza fácilmente.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "fragmento de unión al antígeno" se refiere a un fragmento de un anticuerpo o molécula de inmunoglobulina que conserva la capacidad de unirse de manera específica a su antígeno afín. Los fragmentos de unión al antígeno carecen en general de parte o la totalidad de uno o más dominios funcionales presentes en el anticuerpo de longitud completa o las moléculas Ig, tales como los que confieren la capacidad de fijar el complemento y estimular la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos ("ADCC"). Se pueden preparar fragmentos de unión al antígeno a partir de aislamientos de anticuerpos de longitud completa, por ejemplo, mediante digestión con proteasas tales como papaína (que produce dos fragmentos de unión al antígeno monovalentes idénticos ("Fab")) que comprenden las regiones variable y constante de una cadena ligera de anticuerpo y la región variable y la primera región constante de una cadena pesada de anticuerpo) o pepsina (que produce un único fragmento de unión al antígeno bivalente "(Fab')₂" que comprende un par de fragmentos Fab' unidos de manera covalente cerca de sus extremos carboxilo).

Se pueden producir otros fragmentos de unión al antígeno mediante el uso de la metodología habitual de ADN recombinante, tales como fragmentos "Fv", anticuerpos Fv de cadena simple ("scFv"), anticuerpos bi-específicos, diacuerpos, anticuerpos humanizados, y similares. Un fragmento "Fv" es un fragmento de anticuerpo que contiene un sitio completo de reconocimiento y unión al antígeno, que comprende un dímero de una región V_H y una región V_L. Un fragmento de anticuerpo "scFv" comprende la región V_H y una región V_L de un anticuerpo en una única cadena polipeptídica. Un "diacuerpo" es un fragmento de anticuerpo pequeño con dos sitios de unión al antígeno, que comprende un dominio variable de la cadena pesada conectado a un dominio variable de la cadena ligera en el mismo polipéptido. Mediante el uso de un ligador demasiado corto para permitir que se emparejen las regiones V_H y V_L del mismo polipéptido, se fuerza a los dominios a emparejarse con los dominios complementarios de un segundo polipéptido, lo que crea dos sitios de unión al antígeno.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "determinante de la especificidad de unión" o "BSD" se refiere a la totalidad o una porción de la secuencia de aminoácidos de la tercera región determinante de la complementariedad ("CDR3") y la cuarta región estructural ("FR4") de un polipéptido V_L o V_H de IgG que media en la especificidad de unión al antígeno de una molécula de Ig particular. Los BSDs funcionan en pares de cadena pesada y cadena ligera, de forma que un BSD particular comprende la secuencia de aminoácidos de CDR3-FR4 de una región V_L emparejada con la secuencia de aminoácidos de CDR3-FR4 de una región V_H afín.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "epítipo" se refiere a un sitio en una molécula más grande, tal como una proteína, polipéptido, o antígeno determinado (es decir, factor B), al que se unirá un anticuerpo, inmunoglobulina, o fragmento de unión al antígeno de los mismos, y contra el que se producirá un anticuerpo. El término "epítipo" se puede usar de manera intercambiable con las expresiones "determinante antigénico", "sitio de unión del anticuerpo", o "superficie de unión conservada" de una proteína, polipéptido, o antígeno determinado. De manera más específica, un epítipo se puede definir tanto por los residuos de aminoácidos implicados en la unión al anticuerpo como también por su conformación en el espacio tridimensional (p.ej., un epítipo conformacional o la superficie de unión conservada). Un epítipo puede estar incluido en péptidos pequeños de solamente alrededor de 4-6 residuos de aminoácidos, o puede estar incluido en segmentos mayores de una proteína, y no es necesario que esté compuesto de residuos de aminoácidos contiguos cuando se hace referencia a una estructura tridimensional de un epítipo, en particular con respecto a un epítipo que se une a un anticuerpo. Los epítipos que se unen a anticuerpos son con frecuencia epítipos conformacionales en vez de un epítipo secuencial o lineal, o, en otras palabras, un epítipo definido por residuos de aminoácidos dispuestos tridimensionalmente en la superficie de una proteína o polipéptido al que se une un anticuerpo. Como se mencionó anteriormente, el epítipo conformacional no está compuesto por una secuencia contigua de residuos de aminoácidos, sino que quizás los residuos están muy separados en la secuencia primaria de la proteína, y se juntan para formar una superficie de unión por la manera en la que se pliega la proteína en su conformación nativa en tres dimensiones.

El epítipo reconocido por el mAb 1379, y compartido por las variantes humanizadas descritas en la presente memoria, es un epítipo conformacional que no es un epítipo lineal localizado en la estructura tridimensional de una porción del tercer dominio de SCR del factor B. Véase, p.ej., el documento US 2005/0260198 A1. El factor B humano se expresa en forma de una preproteína de 764 aminoácidos que contiene un péptido señal de veinticinco (25) aminoácidos que abarca los aminoácidos 1-25 de su extremo amino-terminal. La secuencia de aminoácidos para la

preproteína del factor B humano se halla en la base de datos del NCBI con el N° de acceso P00751. El factor B humano maduro comprende la secuencia de aminoácidos de N° de acceso P00751 que carece del péptido señal de veinticinco (25) aminoácidos (es decir, SEQ ID N°: 30). El tercer dominio de SCR del factor B humano maduro se extiende desde alrededor de la posición 137 hasta alrededor de la posición 195 de SEQ ID N°: 30. La porción que contiene el epítipo es la estructura tridimensional del factor B que está definida sustancialmente por la totalidad (p.ej., al menos alrededor del 90%) de las posiciones de aminoácidos Ala137-Ser192 de SEQ ID N°: 30, o las posiciones equivalentes en una secuencia de factor B no humano, cuando tal secuencia se dispone conformacionalmente como se da en la secuencia del factor B de longitud completa natural.

El mAb murino 1379 y las variantes humanizadas descritas en la presente memoria se unen a un epítipo o superficie de unión conservada en o que contiene una parte del tercer dominio de SCR que comprende un epítipo del factor B humano que incluye al menos una porción de la secuencia que comprende desde alrededor de la posición Tyr139 hasta alrededor de la posición Ser185 de la proteína de factor B humano maduro (SEQ ID N°: 30), a un epítipo del factor B humano que incluye al menos una porción de la secuencia que comprende desde alrededor de la posición Tyr139 hasta alrededor de la posición Ser141 de la proteína de factor B humano maduro (SEQ ID N°: 30), a un epítipo del factor B humano que incluye al menos una porción de la secuencia que comprende desde alrededor de la posición Glu182 hasta alrededor de la posición Ser185 con respecto a la proteína de factor B humano maduro (SEQ ID N°: 30), a un epítipo del factor B que incluye al menos una porción del factor B humano (SEQ ID N°: 30) que comprende cualquiera o más de las posiciones siguientes o sus posiciones equivalentes en una secuencia de factor B no humano: Ala137, Tyr139, Cys 140, Ser141, Glu182, Gly184, o Ser185, o a un epítipo del factor B que incluye al menos una porción de las posiciones equivalentes con respecto a una especie animal no humana. En otro aspecto, el epítipo está dentro o contiene una parte o porción del tercer dominio de SCR del factor B que incluye la totalidad o sustancialmente la totalidad (al menos cinco, seis, o siete) de las posiciones de aminoácidos siguientes de SEQ ID N°: 30, o sus posiciones equivalentes en una secuencia de factor B no humano: Ala137, Tyr139, Ser141, Glu182, Ser185, Thr189, Glu190, y Ser192.

Un experto en la técnica puede alinear fácilmente la secuencia del factor B humano con la secuencia de un factor B de otra especie animal y determinar las posiciones de las regiones de SCR y las porciones específicas de las terceras regiones de SCR correspondientes a las posiciones de aminoácidos anteriores. Por ejemplo, se pueden alinear dos secuencias específicas entre sí mediante el uso de BLAST 2 Sequence como se describió en Tatusova y Madden, (1999), "Blast 2 Sequence--a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", *FEMS Microbiol. Lett.* 174:247-250.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "se une de manera selectiva a" se refiere a la unión específica de una proteína a otra (p.ej., un anticuerpo, fragmento de unión al antígeno del mismo, o molécula de unión a un antígeno), en la que el nivel de unión, tal como se mide mediante cualquier ensayo habitual (p.ej., un inmunoensayo), es significativamente mayor estadísticamente que el control de fondo para el ensayo. Por ejemplo, cuando se lleva a cabo un inmunoensayo, los controles incluyen en general un pocillo o tubo de reacción que contiene anticuerpo o fragmento de unión al antígeno solo (es decir, sin antígeno), en el que cierta cantidad de reactividad (p.ej., unión inespecífica al pocillo o tubo) por parte del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo sin el antígeno se considera que es una señal de fondo. La unión se puede medir mediante el uso de una diversidad de métodos habituales en la técnica, que incluyen, pero sin limitación, transferencia de Western, inmunotransferencia, ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas ("ELISA"), radioinmunoensayo ("RIA"), inmunoprecipitación, resonancia de plasmones superficiales, quimioluminiscencia, polarización de fluorescencia, fosforescencia, análisis inmunohistoquímico, desorción/ionización láser asistida por matriz-tiempo de vuelo ("MALDI-TOF") espectrometría de masas, microcitometría, micromatriz, microscopía, clasificación de células activada por fluorescencia ("FACS"), y citometría de flujo.

Tal como se usa en la presente memoria, "tratamiento" o "tratar" una enfermedad se define como administrar una variante humanizada del mAb 1379 como se describió anteriormente, tal como TA101-1, TA102-4, y TA103-2, o los fragmentos de unión al antígeno de los mismos, con o sin otros agentes terapéuticos, para paliar, mejorar, estabilizar, invertir, ralentizar, retrasar, prevenir, reducir, o eliminar la enfermedad o un síntoma de una enfermedad, o para retrasar o detener la progresión de una enfermedad o un síntoma de una enfermedad. Una "cantidad eficaz" de una composición es una cantidad suficiente para tratar una enfermedad.

Tal como se usa en la presente memoria, "inhibir" la ruta alternativa del complemento en un individuo se refiere a inhibir la expresión y/o la actividad biológica de al menos una proteína que es parte de la ruta alternativa del complemento. Tales proteínas incluyen, pero sin limitación, factor B, factor D o properdina. Inhibir "de manera selectiva" la ruta alternativa del complemento significa que el método inhibe preferentemente o exclusivamente la ruta alternativa del complemento, pero no inhibe o al menos no inhibe sustancialmente otras rutas para la activación del complemento, lo que incluye la ruta clásica del complemento o la ruta de lectina. Por ejemplo, los anticuerpos de factor B humanizados y los fragmentos de unión al antígeno de los mismos de la presente invención son un ejemplo de un reactivo que inhibe de manera selectiva la ruta alternativa del complemento. Esta definición es aplicable a otros métodos descritos en la presente memoria en los que se inhibe de manera selectiva la ruta alternativa del complemento.

Un "individuo" es un vertebrado, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un ser humano. Los mamíferos

incluyen, pero sin limitación, animales de granja, animales deportivos, mascotas, primates, ratones y ratas. En ciertas realizaciones, el individuo es un ser humano. En ciertas realizaciones, el individuo es un individuo distinto de un ser humano. En ciertas realizaciones, el individuo es un modelo animal para el estudio de una enfermedad en la que está implicada la ruta alternativa del complemento. Los individuos susceptibles al tratamiento incluyen aquellos que en la actualidad están asintomáticos, pero que corren el riesgo de desarrollar un trastorno sintomático en el que desempeña un papel la ruta alternativa del complemento, o en el que desempeña un papel la activación de la ruta alternativa del complemento.

La referencia general a "la composición" o "composiciones" incluye y es aplicable a las composiciones de la invención.

Tal como se usa en la presente memoria, las formas singulares "un", "uno/una", y "el/la" incluyen las referencias plurales a menos que se indique claramente de otra manera. Por ejemplo, la expresión "una región V_H " incluye una o más regiones V_H .

La referencia a "alrededor de" un valor o parámetro en la presente memoria incluye y describe las realizaciones que se dirigen a ese valor o parámetro *per se*. Por ejemplo, la descripción que se refiere a "alrededor de X" incluye la descripción de "X".

Se entiende que los aspectos y realizaciones de la invención descritos en la presente memoria incluyen los "que consisten" y/o "que consisten básicamente en" los aspectos y realizaciones.

1. Introducción

El procedimiento Humaneering™ de anticuerpos genera anticuerpos humanos modificados con secuencias de la región variable ("región V") cercanas a las secuencias de la línea germinal humana a la vez que conservan la especificidad de unión y la afinidad de un anticuerpo de referencia. Véase, p.ej., la publicación de patente de EE.UU. N° US 2005/0255552 A1; y la publicación de patente de EE.UU. N° US 2006/0134098 A1. El proceso identifica la información de secuencia mínima necesaria para determinar la especificidad de unión al antígeno a partir de la región V de un anticuerpo de referencia y transfiere esa información a una biblioteca de secuencias de genes de regiones V humanas parciales para generar una biblioteca enfocada en el epítipo de regiones V de anticuerpos humanos. Los miembros de la biblioteca se expresan en forma de fragmentos Fab' de anticuerpo mediante el uso de un sistema de secreción basado en microbios. La biblioteca se criba después en busca de fragmentos Fab' de unión al antígeno mediante el uso de un ensayo de unión con transferencia de colonias. Los clones positivos se caracterizan posteriormente para identificar aquellos con la afinidad de unión más alta por el antígeno objetivo. Los fragmentos Fab' humanos modificados resultantes conservan la especificidad de unión del anticuerpo murino original, y preferiblemente tienen una afinidad de unión equivalente o superior hacia el antígeno que el anticuerpo original. Preferiblemente, los fragmentos Fab' modificados también tienen regiones V de la cadena ligera y pesada con un grado elevado de identidad de secuencias de aminoácidos en comparación con los genes de anticuerpos de la línea germinal humana más cercanos.

El determinante de la especificidad de unión ("BSD") mínimo necesario para generar la biblioteca enfocada en el epítipo se representa en general mediante una secuencia de CDR3 de la cadena pesada del anticuerpo ("CDR_H3") y una secuencia de CDR3 de la cadena ligera del anticuerpo ("CDR_L3"). En ciertos casos, la biblioteca enfocada en el epítipo se construye a partir de secuencias de segmentos V humanos (el "segmento V" contiene FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3) unidas a la región única en la unión de CDR3 y FR4 que contiene el BSD y secuencias del segmento de unión ("segmento J") de la línea germinal humana. Véase la publicación de patente de EE.UU. N° US 2005/0255552 A1. De manera alternativa, las bibliotecas de segmentos V humanos se pueden generar mediante sustitución secuencial de casetes, en la que inicialmente se sustituye solamente parte del segmento V murino por una biblioteca de secuencias humanas. Los "casetes" humanos identificados que mantienen la unión al antígeno en el contexto de las secuencias murinas residuales se recombinan después en un segundo cribado de bibliotecas para generar segmentos V completamente humanos. Véase la publicación de patente de EE.UU. N° US 2006/0134098 A1. En cada caso, los segmentos CDR3-FR4 de las cadenas pesada y ligera emparejados que contienen los determinantes de la especificidad del anticuerpo de referencia se usan para limitar la especificidad de unión, de forma que los fragmentos Fab' de unión al antígeno obtenidos de la biblioteca conservan la especificidad por el epítipo del anticuerpo de partida (es decir, mAb 1379).

Se pueden introducir cambios de maduración adicionales en las regiones CDR3 de cada cadena durante la construcción de la biblioteca para identificar los anticuerpos con una cinética de unión óptima.

Los anticuerpos humanizados resultantes tienen secuencias de segmentos V derivadas de las bibliotecas de secuencias humanas, conservan la secuencia BSD corta del interior de las regiones CDR3 de las cadenas V_L y V_H , y tienen regiones FR4 de la línea germinal humana.

La sustitución de casetes se usó de manera satisfactoria para la humanización del mAb 1379. Se identificaron varios fragmentos Fab' con una afinidad elevada por el factor B mediante esta aproximación. Se identificaron tres fragmentos Fab' humanizados con una afinidad superior hacia el factor B que el anticuerpo murino de referencia (es decir, mAb 1379).

2. Métodos

2.1 Clonación de regiones V murinas a partir del hibridoma que produce mAb 1379

Las regiones V murinas se clonaron a partir del hibridoma que produce mAb 1379 como sigue. En primer lugar, se cultivaron células de hibridoma según los procedimientos establecidos. Las células se recogieron después y se extrajo el ARN mensajero ("mARN") a partir del sedimento celular mediante procedimientos habituales conocidos para un experto en la técnica. Se generó una primera cadena de ADN complementario ("cADN") a partir del mARN purificado mediante prolongación de cebadores con la prolongación de un cebador de poli-desoxitimidina ("poli-dT") mediante el uso de transcriptasa inversa, según los métodos habituales conocidos para el experto en la técnica. La primera cadena de cADN se usó después como molde para la amplificación de las secuencias de las regiones V del anticuerpo mediante el uso de cebadores degenerados según procedimientos habituales descritos con detalle por Chardès, T., et al., "Efficient amplification and direct sequencing of mouse variable regions from any immunoglobulin gene family," *FEBS Lett.* 452(3):386-394 (1999). Se secuenció el cADN de la región variable de la cadena pesada ("V_H") y la región variable de la cadena ligera V-kappa (región "V_K"), y se comprobó su identidad respecto de los datos de secuencias de péptidos amino-terminales generados por Taligen. Las regiones V se clonaron en forma de fragmentos Fab' y se expresaron en *Escherichia coli* ("*E. coli*") a partir de vectores de expresión patentados de KaloBios. Se demostró que la proteína Fab' purificada se unía a la proteína purificada factor B en un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas ("ELISA") llevado a cabo según los métodos habituales.

2.2 Purificación de Fab'

Los fragmentos Fab' se expresaron en *E. coli* mediante el uso de vectores de expresión de proteínas patentados de KaloBios. Las bacterias se cultivaron a 37 °C en medio YT 2X (16 g de Bacto-triptona, 10 g de extracto Bacto-levadura, y 5 g de NaCl por litro de agua destilada, desionizada ("ddH₂O")) hasta una densidad óptica de 0,6 unidades de absorbancia medida a una longitud de onda de 600 nm. Se indujo la expresión de proteínas mediante el uso de isopropil-β-tiogalactopiranosido ("IPTG") durante 3 horas a 33 °C. La concentración adecuada de IPTG para obtener una expresión óptima de la proteína deseada se determina empíricamente mediante el uso de métodos conocidos para un experto en la técnica, y en general varía de 0,01 mM a 5,0 mM. Los fragmentos Fab' ensamblados se obtuvieron a partir de las fracciones periplásmicas, y se purificaron mediante cromatografía de afinidad en columnas de Proteína G estreptocócica (columnas HiTrap™ Protein G HP; adquiridas de GE Healthcare, Piscataway, NJ) según los métodos habituales conocidos para un experto en la técnica. Los fragmentos Fab' se unieron a la columna en fosfato sódico 20 mM, pH=7,0, se eluyeron en glicina 0,1 M a ~pH=2,0, y se ajustaron inmediatamente a pH neutro (~7,0) con un volumen adecuado de Tris-HCl 1 M a pH=9,0, todo según las instrucciones del fabricante. Los fragmentos Fab' purificados se dializaron después con solución salina tamponada con fosfato ("PBS") a pH=7,4 (PBS 1X = NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, y KH₂PO₄ 2 mM; obsérvese que PBS carece de Ca²⁺ y Mg²⁺).

2.3 Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas ("ELISA")

Taligen proporcionó 3 mg de factor B humano recombinante purificado. En general, se adsorbieron 50 ng de factor B recombinante purificado en los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos durante la noche a 4 °C. La placa se bloqueó con una disolución de un 5% (p/v) de leche descremada en polvo en PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM, y 0,1% (v/v) de Tween-20™). Los fragmentos Fab' humanizados purificados o el Fab' de referencia ("TA10") se diluyeron en PBS 1X. Se añadieron cincuenta microlitros de fragmento de anticuerpo a cada pocillo de la placa de microtitulación. Después de una hora a 33 °C, los pocillos de la placa de microtitulación se lavaron tres veces con PBST. A continuación, se añadieron cincuenta microlitros de anticuerpo anti-cadena κ humana conjugado a peroxidasa de rábano ("HRP") (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) diluido hasta 0,1 ng/ml en PBST a cada pocillo, y la placa se incubó cuarenta minutos a 33 °C. Los pocillos de la placa de microtitulación se lavaron después tres veces con PBST, una vez con PBS 1X. Después, se añadieron 100 µl de sustrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina) (Sigma) a cada pocillo, y la placa se incubó durante aproximadamente 5 minutos a temperatura ambiente (~25 °C). Finalmente, las reacciones se pararon mediante la adición de 100 µl de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 0,2 N a cada pocillo. La placa se leyó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 450 nm.

2.4 Ensayo de unión con transferencia de colonias

Las bibliotecas de fragmentos Fab' humanizados se cribaron mediante el uso de filtros de nitrocelulosa revestidos con factor B humano recombinante, básicamente como se describió en el Ejemplo 5 de la publicación de patente de EE.UU. N° US 2005/0255552 A1. Véase también la publicación de patente de EE.UU. N° US 2006/0134098 A1.

Brevemente, las bibliotecas de anticuerpos se transformaron en un hospedador bacteriano adecuado, tal como la cepa TOP10 de *E. coli*. Las células bacterianas transformadas se colocan en placas que contienen agar YT 2X (16 g de digestión pancreática de caseína, 10 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl, y 15 g de agar por litro) (Difco™, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) y un agente de selección adecuado (es decir, un antibiótico seleccionado basándose en el vector de expresión de proteínas particular usado para construir la biblioteca). La eficacia de la colocación en placas se puede ajustar para producir colonias bacterianas discretas a la vez que se maximiza el

número de colonias por placa. A la densidad óptima, una placa de 10 cm de diámetro contendría ~4000 colonias, una placa de 15 cm de diámetro contendría ~10.000 colonias, y una placa de 25 cm de diámetro contendría ~50.000 colonias.

5 Se pre-revistieron filtros de nitrocelulosa de 8,2 cm de diámetro, 13,2 cm de diámetro, o 20 cm de diámetro (filtros de nitrocelulosa Whatman® Schleicher & Schuell® Protran® BA85) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) con antígeno (es decir, factor B humano) en PBS a una concentración determinada empíricamente (en general entre 0,5 µg/ml y 20 µg/ml). El volumen de disolución de revestimiento varió dependiendo del tamaño del filtro, con 4 ml usados para los filtros de 8,2 cm de diámetro, 8 ml usados para los filtros de 13,2 cm de diámetro, y 20 ml usados para los filtros de 20 cm de diámetro. Los filtros se colocaron hacia abajo en la disolución de antígeno-PBS durante 2-3 horas a 33 °C, con agitación ocasional. Los filtros se lavaron después una vez con PBS en exceso y se bloquearon con una disolución del 5% (p/v) de leche descremada en polvo en PBS durante 2 horas a 25 °C con agitación. Después se drenaron los filtros, se lavaron una vez en PBS + 0,1% de Tween-20™ ("TBST") y dos veces en medio líquido YT 2X complementado con agente de selección (es decir, un antibiótico adecuado) y un inductor de la transcripción (es decir, IPTG). Después se drenaron los filtros y se colocaron en placas de agar YT 2X complementadas con el antibiótico adecuado e IPTG (las "placas de expresión").

20 Los filtros de nitrocelulosa secos sin revestir del tamaño adecuado se colocaron hacia abajo sobre las placas que contenían la biblioteca de *E. coli* que expresaba la población deseada de fragmentos de anticuerpo. Una vez que los filtros estuvieron visiblemente húmedos (~20-30 segundos), los filtros se levantaron rápidamente y se colocaron con las colonias hacia arriba sobre un filtro revestido en una placa de expresión. Los filtros se marcan para indicar la placa y orientación adecuadas para facilitar la identificación posterior.

25 Las placas de expresión cubiertas con "sándwiches" de filtros de nitrocelulosa se colocaron a 33 °C durante 12-16 horas. Durante ese tiempo, las colonias bacterianas expresaron y secretaron los fragmentos de anticuerpo, que después difundieron a través del primer filtro de nitrocelulosa que contenía las transferencias de colonias sobre el filtro revestido con antígeno debajo. Los fragmentos de anticuerpo capaces de unirse al antígeno objetivo (es decir, factor B humano) se retuvieron en el filtro de antígenos.

30 Los fragmentos de anticuerpo unidos al antígeno se detectaron con métodos inmunológicos. Brevemente, los filtros que contenían fragmentos de anticuerpo unidos al antígeno se retiraron de las placas de expresión, se lavaron 3 veces durante 5 minutos cada vez en PBST, y se bloquearon durante 1,5 horas a 25 °C en una disolución de un 5% (p/v) de leche descremada en polvo en PBST. Los complejos antígeno-fragmento de anticuerpo retenidos en los filtros se incubaron después con un anticuerpo primario adecuado (p.ej., anticuerpo anti-κ de cabra conjugado a HRP, y similares), seguido, si es necesario, por un anticuerpo secundario adecuado. Se pueden usar otros métodos de detección inmunológicos habituales, que incluyen biotina/estreptavidina, así como otros métodos de detección, que incluyen diversos marcadores fluorescentes. Los filtros se lavaron después 4 veces durante 10 minutos cada vez en PBST, se incubaron en disolución de sustrato de peroxidasa, y se expusieron a una película fotográfica sensible a la luz. De manera alternativa, se pueden usar diversos sistemas de formación de imágenes para visualizar las colonias positivas, tales como el Typhoon (Amersham Biosciences, GE Healthcare, Piscataway, NJ) o el FX-Pro PhosphorImager (Biorad, Hercules, CA). Las imágenes de la película se alinean después con la placa adecuada, las colonias positivas (es decir, las que producen fragmentos de anticuerpo capaces de unirse al antígeno deseado (p.ej., factor B humano)) se recogieron, se inocularon en medio YT 2X más agente de selección, y se analizaron adicionalmente por medio de rondas posteriores de CLBA mediante el uso de básicamente los mismos procedimientos.

2.5 Medidas de afinidad

45 Se analizó la cinética de unión de los fragmentos Fab' mediante el uso de un biosensor FortéBio Octet (FortéBio, Inc., Menlo Park, CA). El factor B humano recombinante se biotiniló con el sistema de biotinylación EZ-link (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) según las instrucciones del fabricante. El antígeno se acopló después a sensores revestidos de neutravidina (FortéBio, Inc., Menlo Park, CA) según las instrucciones del fabricante. La unión de Fab' se monitorizó después en tiempo real mediante el uso de un análisis de interferometría de bio-capa y un programa informático proporcionado por el fabricante. Las afinidades de unión al antígeno se calcularon para los fragmentos Fab' ensayados basándose en las constantes de asociación (" K_{asoc} ") y disociación (" K_{disoc} ") medidas. Preferiblemente, los anticuerpos humanizados o los fragmentos de anticuerpo tienen constantes de disociación en equilibrio iguales o mayores que el anticuerpo de referencia (es decir, mAb 1379) o fragmento de anticuerpo (es decir, TA10).

3. Resultados

3.1 Clonación y expresión de regiones V a partir del hibridoma que produce mAb 1379

55 3.1.1. Amplificación de cadenas V_H y V_K a partir de una primera cadena de cADN

Se amplificaron las regiones variables a partir de la cadena ligera (isoforma κ) y la cadena pesada del anticuerpo a partir de una primera cadena de cADN mediante el uso de quince grupos de cebadores de V_H y dieciocho grupos de cebadores de V_K . Cada grupo de cebadores de V_H contuvo uno de quince cebadores directos degenerados

específicos para las familias de cadenas pesadas murinas conocidas emparejados con un cebador inverso adecuado específico para un dominio constante de una de las cuatro isoformas murinas comunes de la cadena pesada γ (es decir, la isoforma γ_1 murina). Véase, p.ej., Chardès et al., *FEBS Lett.* 452(3):386-394 (1999). Cada grupo de cebadores V_k contuvo uno de dieciocho cebadores directos degenerados específicos para las familias k murinas conocidas emparejados con un cebador inverso específico para un dominio constante de la isoforma k de la cadena ligera murina. Véase, p.ej., Chardès et al., *FEBS Lett.* 452(3):386-394 (1999).

Dos grupos de cebadores produjeron productos de PCR para la cadena pesada, y dos grupos de cebadores produjeron productos de PCR para la cadena ligera. Aunque los cebadores directos degenerados se diseñaron para que hibridasen con las secuencias señal relativamente conservadas de cada familia de cadenas pesadas y ligeras murinas, no todos los pares de cebadores amplifican el producto esperado, porque las secuencias señal de la línea germinal varían. Además, los loci de las inmunoglobulinas contienen con frecuencia pseudogenes que pueden producir un producto del tamaño esperado aunque no codifiquen el marco de lectura abierto predicho, como fue el caso con el producto producido por el par de cebadores V_k10 (véase el párrafo [0065] más adelante). La Figura 1 es un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio para mostrar los productos de cADN bicatenarios amplificados a partir de una primera cadena de cADN preparada a partir de mRNA aislado del hibridoma que produce mAb 1379. Los pares de cebadores V_k4 (SEQ ID N°: 1 (cebador directo) y SEQ ID N°: 2 (cebador inverso)) y V_k10 (SEQ ID N°: 3 (cebador directo) y SEQ ID N°: 4 (cebador inverso)) produjeron productos del tamaño esperado a partir de la cadena ligera del anticuerpo. Los pares de cebadores V_H6 (SEQ ID N°: 5 (cebador directo) y SEQ ID N°: 6 (cebador inverso)) y V_H7 (SEQ ID N°: 7 (cebador directo) y SEQ ID N°: 8 (cebador inverso)) produjeron productos del tamaño esperado a partir de la cadena pesada del anticuerpo.

3.1.2. Secuencias de aminoácidos de regiones V murinas

Los clones de cADN de V_H y V_k obtenidos como se describió en los párrafos [0063] y [0064] anteriores se secuenciaron mediante métodos habituales para verificar que se obtuvieron los productos correctos. Las secuencias de las regiones V obtenidas se muestran en la Figura 2. Las secuencias de las CDR están subrayadas. Dos residuos de glutamina que difieren de la secuencia de la línea germinal murina que corresponde al anticuerpo original mAb 1379 se muestran sombreados en gris. Los productos obtenidos con los grupos de cebadores de V_H6 (SEQ ID N°: 10) y V_H7 (SEQ ID N°: 11) tuvieron una secuencia de aminoácidos idéntica. El producto de V_k10 se amplificó a partir de un cADN que contenía un reordenamiento o desplazamiento del marco de lectura que alteró el marco de lectura abierto de la proteína, y por tanto no se muestra. El producto de V_k4 (SEQ ID N°: 9) contuvo el marco de lectura abierto esperado. Uno de los clones de V_H murinos seleccionados se unió después a una región C_H1 de IgG₁ humana, y el clon de V_k4 murino se unió a una región C_k humana para producir el Fab' de referencia (es decir, TA10). Las variantes humanizadas de Fab' también comprendieron secuencias de regiones constantes humanas.

3.1.3. Comparación de las regiones V clonadas y las secuencias de aminoácidos amino-terminales proporcionadas por Taligen

Las secuencias de aminoácidos amino-terminales del mAb 1379 se compararon después con la misma porción de las secuencias de V_H y V_k clonadas. La Figura 3 muestra las porciones alineadas de las secuencias, primero de la cadena V_H (parte superior, compárese "1379H" (SEQ ID N°: 31) con "TA- V_H6 " (SEQ ID N°: 33)), y después de la cadena V_H y V_k (parte inferior, compárese "1379L" (SEQ ID N°: 32) con "TA- V_k4 " (SEQ ID N°: 34)). Las secuencias amino-terminales del mAb 1379 y las secuencias clonadas fueron idénticas excepto por cuatro residuos (mostrados sombreados en gris). Esas diferencias fueron el resultado de errores introducidos durante la reacción de degradación de Edman usada para obtener las secuencias de los péptidos amino-terminales del mAb 1379.

3.1.4. Confirmación de la actividad de unión del factor B de las regiones V clonadas mediante ELISA

A continuación, se ensayó la capacidad de las secuencias de V_H y V_k clonadas de unirse al factor B. Las regiones V_H y V_k clonadas se expresaron en bacterias en forma de fragmentos Fab', se purificaron, y se ensayó la unión al factor B en un ELISA con dilución. La Figura 4 compara la unión del factor B del Fab' clonado TA003 a la de un Fab' derivado del mAb 1379. Como se esperaba, tanto el Fab' clonado como el Fab murino produjeron curvas de unión que dependieron de la concentración del anticuerpo y del antígeno.

3.2 Humanización de regiones V del mAb 1379

3.2.1. Construcción de bibliotecas y casetes de la región V

Se construyeron bibliotecas enfocadas en el epítipo uniendo secuencias de una biblioteca de segmentos V humanos (aislados de bazo) a la región CDR3-FR4 única que contiene el BSD y secuencias de segmentos J de la línea germinal humana. Estas bibliotecas de "longitud completa" se usaron como base para la construcción de bibliotecas de "casetes" en las que solamente parte del segmento V murino se sustituye inicialmente por una biblioteca de secuencias humanas. Los casetes para las cadenas V_H y V_k se hicieron mediante PCR en fase sólida con secuencias comunes solapantes en la región FR2. De esta manera, se construyeron bibliotecas de casetes humanos de la parte "delantera" y "media" para los isotipos humanos V_H1 , V_H3 , y V_kIV . En general, se criban aproximadamente 10.000 clones de Fab' únicos entre las bibliotecas de casetes humanos "delanteros" y "medios" para identificar una mezcla de fragmentos de anticuerpos candidatos que se unen al antígeno deseado (es decir, el

factor B humano) con una afinidad de unión al menos igual o mayor que la afinidad de unión de un anticuerpo de referencia o un fragmento de anticuerpo (es decir, mAb 1379 o TA10).

Los casetes "delanteros" y "medios" que mantuvieron la unión al factor B se identificaron mediante ensayo de unión con transferencia de colonias y se clasificaron según la afinidad en análisis de ELISA y FortéBio. Los ensayos de unión con transferencia de colonias se llevaron a cabo como se describió anteriormente, básicamente como en el Ejemplo 5 de la publicación de patente de EE.UU. N° US 2005/025552 A1. Las mezclas de "casetes" con la afinidad más alta (con una afinidad de unión al antígeno preferiblemente igual o mayor que TA10, el Fab' de referencia derivado del mAb 1379) se recombinaron después por medio de las secuencias FR2 comunes en un segundo cribado de bibliotecas para generar segmentos V completamente humanos.

Después de la identificación de una mezcla de fragmentos Fab' de afinidad elevada, completamente humanizados, se construyeron las bibliotecas de maduración de la afinidad. Las secuencias de BSD comunes de un panel de clones de Fab' humanizados se mutaron aleatoriamente mediante el uso de cebadores de PCR degenerados para generar las bibliotecas. Estas bibliotecas mutagénicas se cribaron mediante ensayo de unión con transferencia de colonias. Los fragmentos Fab' seleccionados se clasificaron por afinidad de unión con análisis de ELISA y FortéBio. Se identificaron las mutaciones que mantuvieron una afinidad de unión igual o mejorada por el antígeno comparado con el fragmento Fab' de referencia TA10.

En ciertos casos, el proceso de humanización da como resultado el aislamiento de una mezcla de fragmentos Fab' completamente humanizados con afinidades de unión iguales o muy similares por el antígeno objetivo. En tales casos, la mezcla de fragmentos Fab' se secuencian y se comparan con las secuencias de las regiones V_H y V_L (es decir, V_K) de la línea germinal humana más cercanas, y los fragmentos de anticuerpos humanizados con el grado más alto de identidad de secuencias de aminoácidos respecto de la línea germinal humana se seleccionan para un análisis adicional. Cuanto mayor sea el grado de identidad de secuencias de aminoácidos respecto de la secuencia de la línea germinal humana, menos inmunógeno será un anticuerpo humanizado o un fragmento de anticuerpo, y así, será menos probable que provoque una respuesta inmunitaria o inflamatoria, o que se incremente una respuesta inmunitaria o inflamatoria existente. Debido a que las variantes humanizadas del mAb 1379 se pueden usar para tratar afecciones en las que ya se ha desencadenado una respuesta inmunitaria o inflamatoria (es decir, afecciones en las que desempeña un papel la activación de la ruta alternativa del complemento, tales como hipersensibilidad de las vías respiratorias y similares), es esencial que la inmunogenicidad de las variantes humanizadas se reduzca tanto como sea posible. Además, debido a que la administración de proteínas en el pulmón (es decir, mediante inhalación, como se contempla en la presente memoria) es más probable que induzca una respuesta inmunitaria que otras vías de administración, es aún más importante que las variantes anti-factor B humanizadas sean mínimamente inmunógenas.

Así, es deseable aislar las variantes humanizadas con el grado más alto posible de identidad de secuencias de aminoácidos respecto de las secuencias de la línea germinal humana más cercana (para las variantes derivadas del mAb 1379, las secuencias de la línea germinal humana más cercanas son V_{KIV-B3/J_2} (SEQ ID N°: 12) y $V_{H1-02/J_{H4}}$ (SEQ ID N°: 13)). Preferiblemente, las variantes humanizadas tienen secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y V_K al menos un 80% idénticas respecto de las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y V_K de la línea germinal humana más cercanas, más preferiblemente al menos un 85% idénticas respecto de las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y V_K de la línea germinal humana más cercanas, aún más preferiblemente al menos un 90% idénticas respecto de las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y V_K de la línea germinal humana más cercanas, y aún más preferiblemente al menos un 95% idénticas respecto de las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y V_K de la línea germinal humana más cercanas.

Preferiblemente, una variante humanizada de anticuerpo tendrá una afinidad de unión igual o mayor que el anticuerpo de referencia o el fragmento de anticuerpo, y además comprenderá regiones V_H y V_K que tendrían secuencias de aminoácidos un 80% idénticas respecto de la secuencia de la línea germinal humana más cercana, 85% idéntica respecto de la secuencia de la línea germinal humana más cercana, 90% idéntica respecto de la secuencia de la línea germinal humana más cercana, o 95% idéntica respecto de la secuencia de la línea germinal humana más cercana. Sin embargo, no siempre es posible humanizar variantes de anticuerpos o de fragmentos de anticuerpos que compartan esas características.

3.2.2. Afinidad de unión de fragmentos Fab' hacia el factor B humano mediante el uso del análisis FortéBio Octet

Se aislaron fragmentos Fab' completamente humanizados mediante ensayos de unión con transferencia de colonias y se confirmaron como aglutinantes del factor B mediante ELISA. Los fragmentos Fab' humanizados que mostraron señales positivas intensas mediante ELISA se purificaron y se caracterizaron adicionalmente en comparación con el fragmento Fab' de referencia TA10, que tiene secuencias de las regiones V murinas del mAb 1379. Se analizó la cinética de la unión del fragmento Fab' al factor B humano recombinante con el sistema FortéBio Octet mediante interferometría de bio-capa, que proporciona una monitorización en tiempo real sin marcadores de las interacciones proteína-proteína. Los análisis cinéticos representativos se muestran en la Figura 5. Las constantes de asociación (K_{asoc}) y de disociación (K_{disoc}) medidas, y las constantes de disociación en equilibrio calculadas ($K_D = K_{disoc}/K_{asoc}$) (es decir, la afinidad de unión), se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Análisis cinético de los anticuerpos humanizados comparados con un anticuerpo de referencia.

ID de seguimiento	TA102-4	TA103-2	TA10 (Referencia)	TA101-1
Concentración (M)	1×10^{-7}	1×10^{-7}	1×10^{-7}	1×10^{-7}
K_{disoc} (1/seg)	$4,37 \times 10^{-3}$	$2,80 \times 10^{-3}$	$2,96 \times 10^{-3}$	$2,33 \times 10^{-3}$
K_{disoc} (error)	$1,03 \times 10^{-4}$	$1,29 \times 10^{-4}$	$1,07 \times 10^{-4}$	$1,27 \times 10^{-4}$
K_{asoc} (1/(M·seg))	$8,10 \times 10^{-5}$	$7,50 \times 10^{-5}$	$4,52 \times 10^{-5}$	$5,14 \times 10^{-5}$
K_D (M)	$5,40 \times 10^{-9}$	$3,73 \times 10^{-9}$	$6,55 \times 10^{-9}$	$4,53 \times 10^{-9}$

Evidentemente, los tres fragmentos de anticuerpos humanizados tienen constantes de disociación en equilibrio iguales o mejores que el fragmento de anticuerpo de referencia TA10.

5 3.3 Análisis de la secuencia de fragmentos Fab' humanizados

3.3.1. Alineación de secuencias de aminoácidos de Fab' de referencia y humanizados

Tras la caracterización cinética, se secuenciaron los tres aislamientos de anticuerpos humanizados. Las secuencias de aminoácidos derivadas de las secuencias de las regiones V_K y V_H de los aislamientos de los anticuerpos TA101-1 (SEQ ID N°S: 16 y 17), TA102-4 (SEQ ID N°S: 18 y 19), y TA103-2 (SEQ ID N°S: 20 y 21) se compararon con las secuencias correspondientes del anticuerpo de referencia TA10 (SEQ ID N°S: 14 y 15) y de los genes de los dominios variables de las cadenas ligera y pesada ("gen V_K " y "gen V_H ") de la línea germinal humana más cercana y los segmentos de unión ("segmento J") (V_{KIV} -B3/ J_{K2} humano (SEQ ID N°: 12) y V_{H1} -02/ J_{H4} (SEQ ID N°: 13)). Las secuencias alineadas se muestran en la Figura 6. Las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 están recuadradas y marcadas como corresponde. Los residuos de aminoácidos que difieren de la posición de la línea germinal correspondiente (exceptuando la secuencia BSD CDR3) están sombreados en gris. Los cambios de maduración de la afinidad en las secuencias de aminoácidos de CDR3 de las variantes humanizadas TA101-1, TA102-4, y TA103-2 están sombreados en gris y se muestran en negrita.

En ciertas realizaciones, las secuencias de la región V_H de TA101-1 (SEQ ID N°: 35), TA102-4 (SEQ ID N°: 36), y TA103-2 (SEQ ID N°: 37) están modificadas para sustituir el residuo de glutamina (Q) amino-terminal de las variantes anti-factor B humanizadas con un residuo de ácido glutámico (E) tal como se halla en el anticuerpo de referencia (TA10) y el mAb original 1379. Este cambio impide la ciclación del residuo de glutamina (Q) y favorece un producto final más uniforme cuando se fabrican las variantes humanizadas. Aunque el gen de la línea germinal humana más cercana (V_{H1} -02/ J_{H4} (SEQ ID N°: 13)) también tiene un residuo de glutamina (Q) en su extremo amino-terminal, esta sustitución conservativa de aminoácidos probablemente tiene un impacto mínimo sobre la inmunogenicidad de las variantes.

3.3.2. Porcentaje de identidad respecto de las secuencias de la línea germinal humana

Finalmente, las secuencias de aminoácidos de la región V_H y la región V_K derivadas de los aislamientos de TA101-1, TA102-4, y TA103-2 y el anticuerpo de referencia TA10 se compararon con una única secuencia de anticuerpo de la línea germinal humana a lo largo de la región V, exceptuando las secuencias BSD CDR3. La Tabla 2 muestra el porcentaje de identidad de aminoácidos respecto de la secuencia de la línea germinal para cada uno.

Clon	% de identidad de V_K (alineado con V_{KIV})	% de identidad de V_H (alineado con V_{H1} -02)	% de identidad total a lo largo de la región V (exceptuando CDR3)
Referencia TA10	70,4%	84,9%	77,7%
TA101-1	96,2%	96,3%	96,25%
TA102-4	97,1%	96,3%	96,7%
TA103-2	95,3%	96,3%	95,8%

Evidentemente, las regiones V_K y V_H de los tres fragmentos Fab' humanizados comparten una identidad de secuencias de aminoácidos elevada respecto de la secuencia de la línea germinal humana, con identidades en porcentaje de alrededor de un 96% comparado con alrededor de un 78% para el fragmento Fab' de referencia, TA10.

4. Discusión

La sustitución de casetes se usó de manera satisfactoria para la humanización del mAb 1379. Los casetes de regiones V parciales aislados de una biblioteca humana se recombinaron para formar las regiones V humanas modificadas finales para cada una de las cadenas pesadas y ligeras.

- 5 Las secuencias de aminoácidos de las regiones V de los clones de fragmentos Fab' se proporcionaron anteriormente. Las secuencias de los segmentos V se aislaron mediante recombinación de dos casetes V_H y dos casetes V_K para cada fragmento Fab' (un casete "delantero" y un casete "medio" para cada uno de los polipéptidos V_H y V_K). El análisis cinético mediante el uso del biosensor FortéBio Octet identificó tres fragmentos Fab' (TA101-1, TA102-4, y TA103-2) con afinidades de unión mayores que el fragmento Fab' de referencia. Esta afinidad de unión incrementada dio como resultado una velocidad de disociación mejorada en las tres variantes humanizadas (es decir, TA101-1, TA102-4, y TA103-2) en comparación con la molécula de referencia. Así, también puede ser deseable cribar en busca de variantes basándose en las velocidades de disociación incrementadas (K_{disoc}) y/o afinidades de unión incrementadas, así como un % de identidad de secuencias de aminoácidos entre los polipéptidos V_H y V_K humanizados y las secuencias V_H y V_K de la línea germinal humana más cercanas.
- 10
- 15 Cada uno de los tres clones de fragmentos Fab' tiene una región variable de la cadena pesada (V_H) con un grado elevado de identidad de secuencias de aminoácidos respecto del gen V_H1-02 de la línea germinal humana. El segmento FR_{H4} se proporciona mediante la secuencia J_{H4} de la línea germinal humana.

Los segmentos V de la cadena ligera son más cercanos al gen de la línea germinal V_{KIV-B3} . El FR_{L4} es proporcionado por el segmento J_{K2} de la línea germinal humana. Las regiones V_H y V_L del fragmento Fab' humanizado muestran más de un 96% de identidad de secuencias de aminoácidos respecto de los casetes de secuencias de la línea germinal humana correspondientes más cercanas fuera de las regiones CDR3 únicas.

- 20
5. Formulaciones y composiciones relacionadas con ciertas realizaciones de la invención

Un aspecto de la presente invención se refiere en general a composiciones para inhibir de manera selectiva la activación de la ruta alternativa del complemento en un animal que tiene, o corre el riesgo de desarrollar, una afección o enfermedad en la que la activación de la ruta alternativa del complemento contribuye a la afección o enfermedad, exacerba al menos un síntoma de la afección o enfermedad, o provoca la afección o enfermedad.

5.1 Métodos

- En la presente memoria se describen métodos para tratar enfermedades o trastornos en los que desempeña un papel la activación de la ruta alternativa del complemento. Tales métodos implican administrar una variante humanizada del mAb 1379 como se describió anteriormente, tal como TA101-1, TA102-4, y TA103-2, o fragmentos de unión al antígeno del mismo, a un individuo que tiene, o corre el riesgo de desarrollar, una enfermedad en la que desempeña un papel la activación de la ruta alternativa del complemento. Las variantes humanizadas del anticuerpo y los fragmentos de unión al antígeno se pueden administrar mediante una vía seleccionada del grupo que consiste en las vías oral, nasal, tópica, inhalada, intratraqueal, transdérmica, rectal y parenteral. Las variantes humanizadas del anticuerpo y los fragmentos de unión al antígeno de las mismas se pueden administrar con un vehículo farmacéuticamente aceptable seleccionado del grupo que consiste en: un polvo seco, dispersable; etanol anhidro; cápsulas pequeñas; liposomas; un aerosol nebulizado; y un excipiente inyectable. Las variantes humanizadas y los fragmentos de unión al antígeno de las mismas se pueden administrar en un vehículo o dispositivo seleccionado del grupo que consiste en: etanol anhidro; un sistema de inhalación de polvo seco; sistema de inhalación ultrasónica; un inhalador de dosis medida presurizado; y un dispositivo de disolución medida. Las variantes humanizadas del anticuerpo y los fragmentos de unión al antígeno de las mismas se pueden administrar en una cantidad eficaz para tratar la enfermedad o trastorno en el que desempeña un papel la activación de la ruta alternativa del complemento. Las variantes humanizadas del anticuerpo y los fragmentos de unión al antígeno de las mismas se pueden administrar solos, o en combinación con otro agente seleccionado del grupo que consiste en: corticosteroides, β -agonistas (de acción prolongada o corta), modificadores de leucotrienos, antihistaminas, inhibidores de fosfodiesterasas, cromoglicato sódico, Nedocromil, teofilina, antagonistas de citocinas, antagonistas de receptores de citocinas, anti-IgE, e inhibidores de la función de células T.

- También se describe en la presente memoria un método para reducir o prevenir la hipersensibilidad de las vías respiratorias (AHR) o la inflamación de las vías respiratorias en un individuo. El método incluye la etapa de administrar una variante humanizada del mAb 1379 como se describió anteriormente, tal como TA101-1, TA102-4, y TA103-2, o los fragmentos de unión al antígeno del mismo, a un individuo que tiene, o corre el riesgo de desarrollar, hipersensibilidad de las vías respiratorias asociada a inflamación o inflamación de las vías respiratorias. La variante humanizada del mAb 1379 o el fragmento de unión al antígeno del mismo se puede administrar mediante una vía seleccionada del grupo que consiste en las vías oral, nasal, tópica, inhalada, intratraqueal, transdérmica, rectal y parenteral. La variante humanizada del mAb 1379 o el fragmento de unión al antígeno del mismo se puede administrar al animal en una cantidad eficaz para reducir de manera medible la hipersensibilidad de las vías respiratorias en el individuo en comparación con antes de la administración del anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno. La variante humanizada del mAb 1379 o un fragmento de unión al antígeno del mismo se puede

administrar al individuo en una cantidad eficaz para reducir de manera medible la hipersensibilidad de las vías respiratorias en el individuo en comparación con un nivel de hipersensibilidad de las vías respiratorias en una población de individuos que tienen inflamación, en la que no se administró el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno. La variante humanizada del mAb 1379 o un fragmento de unión al antígeno del mismo se puede administrar con un vehículo farmacéuticamente aceptable seleccionado del grupo que consiste en: un polvo seco, dispersable; etanol anhidro; cápsulas pequeñas; liposomas; un aerosol nebulizado; y un excipiente inyectable. La variante humanizada del mAb 1379 o un fragmento de unión al antígeno de la misma se puede administrar en un vehículo o dispositivo seleccionado del grupo que consiste en: etanol anhidro; un sistema de inhalación de polvo seco; sistema de inhalación ultrasónica; un inhalador de dosis medida presurizado; y un dispositivo de disolución medida.

La variante humanizada del mAb 1379 o un fragmento de unión al antígeno de la misma se puede administrar a un individuo junto con un agente seleccionado del grupo que consiste en: corticosteroides, β -agonistas (de acción prolongada o corta), modificadores de leucotrienos, antihistaminas, inhibidores de fosfodiesterasas, cromoglicato sódico, Nedocromil, teofilina, antagonistas de citocinas, antagonistas de receptores de citocinas, anti-IgE, e inhibidores de la función de células T. La hipersensibilidad de las vías respiratorias o la inflamación de las vías respiratorias puede estar asociada a una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), aspergilosis broncopulmonar alérgica, neumonía por hipersensibilidad, neumonía eosinofílica, enfisema, bronquitis, bronquitis alérgica, bronquiectasia, fibrosis quística, tuberculosis, neumonitis por hipersensibilidad, asma ocupacional, sarcoidosis, síndrome de la enfermedad reactiva de las vías respiratorias, enfermedad pulmonar intersticial, síndrome hiper-eosinofílico, rinitis, sinusitis, asma inducida por el ejercicio, asma inducida por la contaminación, asma de variante tusiva, parasitosis pulmonar, infección por virus sincitial respiratorio ("RSV"), infección por virus paragripal ("PIV"), infección por rinovirus ("RV"), e infección por adenovirus. La hipersensibilidad de las vías respiratorias puede estar asociada a inflamación alérgica. El método se puede administrar a mamíferos, y, más preferiblemente, a seres humanos.

También se describe en la presente memoria un método para reducir o prevenir la hipersensibilidad de las vías respiratorias (AHR) o la inflamación de las vías respiratorias en un individuo. El método incluye la etapa de administrar un reactivo que inhibe de manera selectiva la ruta alternativa del complemento a un individuo que tiene, o corre el riesgo de desarrollar, hipersensibilidad de las vías respiratorias asociada a inflamación o inflamación de las vías respiratorias. Ese reactivo puede ser una variante humanizada del mAb 1379, tal como TA101-1, TA102-4, y TA103-2, o los fragmentos de unión al antígeno de los mismos.

5.2 Formulaciones o composiciones relacionadas con ciertas realizaciones de la invención

Ciertas realizaciones de las variantes de anticuerpo anti-factor B humanizado de la presente invención incluyen una formulación o composición que comprende un inhibidor de la ruta alternativa del complemento y, en particular, un inhibidor selectivo de la ruta alternativa del complemento como se describe en la presente memoria. Las formulaciones o composiciones se pueden usar en cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria y con cualquiera de los reactivos descritos en la presente memoria (p.ej., las variantes humanizadas de anticuerpos hacia el factor B TA101-1, TA102-4, y TA103-2 o los fragmentos de unión al antígeno de los mismos como se describen en la presente memoria). En una realización, la composición es útil para reducir o prevenir la hipersensibilidad de las vías respiratorias en un animal. En otra realización, la composición es útil para reducir o prevenir la lesión por isquemia-reperfusión en un animal. En otra realización, la composición es útil para tratar o prevenir una afección o enfermedad mediante la inhibición selectiva de la ruta alternativa del complemento. La formulación comprende: (a) un inhibidor de la ruta alternativa del complemento como se describe en la presente memoria; y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En una realización, la formulación o composición puede incluir uno o más agentes adicionales, tales como un agente anti-inflamatorio adecuado para reducir la inflamación en un animal que tiene, o corre el riesgo de desarrollar, hipersensibilidad de las vías respiratorias, y en particular, hipersensibilidad de las vías respiratorias asociada a inflamación. El agente anti-inflamatorio puede ser cualquier agente anti-inflamatorio adecuado para el uso en la reducción de la inflamación en un paciente que tiene una afección inflamatoria asociada a hipersensibilidad de las vías respiratorias, que incluye, pero sin limitación: corticosteroides, (orales, inhalados e inyectados), β -agonistas (de acción prolongada o corta), modificadores de leucotrienos (inhibidores o antagonistas de receptores), antagonistas de citocinas o de receptores de citocinas, anticuerpos anti-IgE, inhibidores de fosfodiesterasas, cromoglicato sódico, nedocromil, teofilina, e inhibidores de la función de células T. Los agentes anti-inflamatorios especialmente preferidos para el uso en la presente formulación incluyen corticosteroides, modificadores de leucotrienos, y antagonistas de citocinas o de receptores de citocinas.

En otra realización, la formulación o composición puede incluir uno o más agentes adicionales, tales como un agente adicional adecuado para prevenir o reducir la lesión por isquemia-reperfusión en un animal. Tales agentes incluyen, pero sin limitación, agentes anti-inflamatorios; o inhibidores de la oxidación y el daño por radicales libres.

En otra realización, la formulación o composición puede incluir uno o más agentes adicionales, tales como un agente adicional adecuado para el tratamiento de otra enfermedad o afección asociada a la activación de la ruta alternativa del complemento.

Según la presente invención, un "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye excipientes farmacéuticamente aceptables y/o vehículos de administración farmacéuticamente aceptables, que son adecuados para el uso en la administración de una formulación o composición en un sitio adecuado *in vivo*. Un sitio adecuado *in vivo* es preferiblemente cualquier sitio en el que se puede inhibir la ruta alternativa del complemento. En una realización preferida, cuando el paciente tiene o corre el riesgo de desarrollar hipersensibilidad de las vías respiratorias y/o inflamación de las vías respiratorias, un sitio adecuado *in vivo* es preferiblemente el tejido pulmonar o las vías respiratorias. Otros sitios preferidos *in vivo* incluyen otros tejidos u órganos en los que se pueden centrar las afecciones asociadas a la ruta alternativa del complemento. En otra realización preferida, un sitio adecuado *in vivo* es cualquier sitio en el que se da una lesión por isquemia-reperusión, tal como en el corazón o el sistema respiratorio, sistema nervioso central, extremidades o dedos, órganos internos (p.ej., pulmón, hígado o intestino), o en cualquier órgano o tejido transplantado. Los vehículos farmacéuticamente aceptables preferidos son capaces de mantener un agente usado en una formulación de la invención en una forma que, tras la llegada del agente al sitio objetivo en un paciente, el agente es capaz de actuar sobre su objetivo (p.ej., una proteína que es un componente de la ruta alternativa del complemento), lo que da como resultado preferiblemente un beneficio terapéutico para el paciente.

Los excipientes adecuados para el uso en la presente invención incluyen excipientes o formularios que transportan o ayudan a transportar, pero no dirigen de manera específica una composición hacia una célula o tejido (también denominados en la presente memoria vehículos no selectivos). Los ejemplos de excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación, agua, solución salina tamponada con fosfato ("PBS"), solución de Ringer, solución de dextrosa, soluciones que contienen suero, solución salina equilibrada de Hank ("HBSS"), y otras soluciones acuosas equilibradas fisiológicamente, aceites, ésteres y glicoles. Los vehículos acuosos pueden contener sustancias auxiliares adecuadas necesarias para aproximarse a las condiciones fisiológicas del receptor, por ejemplo, aumentando la estabilidad química y la isotonicidad. Las sustancias auxiliares adecuadas incluyen, por ejemplo, acetato sódico, cloruro sódico, lactato sódico, cloruro potásico, cloruro cálcico, y otras sustancias usadas para producir tampón fosfato, tampón Tris, y tampón bicarbonato. Las sustancias auxiliares pueden incluir también conservantes, tales como timerosal, *m*- u *o*-cresol, formalina y alcohol bencílico. Las formulaciones de la presente invención se pueden esterilizar mediante métodos convencionales y/o liofilizar.

Un tipo de vehículo farmacéuticamente aceptable incluye una formulación de liberación controlada que es capaz de liberar lentamente una composición de la presente invención en un animal. Tal como se usa en la presente memoria, una formulación de liberación controlada comprende un agente de la presente invención en un vehículo de liberación controlada. Los vehículos de liberación controlada adecuados incluyen, pero sin limitación, polímeros biocompatibles, otras matrices poliméricas, cápsulas, microcápsulas, micropartículas, preparaciones para inyección rápida, bombas osmóticas, dispositivos de difusión, liposomas, lipoesferas, y sistemas de administración transdérmica. Otros vehículos adecuados incluyen cualquier vehículo que se puede unir o incorporar con el agente que prolonga esa semivida del agente a administrar. Tal vehículo puede incluir cualquier vehículo de proteínas adecuado o incluso un segmento de fusión que prolonga la semivida de una proteína cuando se administra *in vivo*. Los vehículos de administración adecuados se han descrito previamente en la presente memoria, e incluyen, pero sin limitación, liposomas, vectores virales u otros vehículos de administración, que incluyen ribozimas. Los vehículos de administración que contienen lípidos naturales incluyen células y membranas celulares. Los vehículos de administración que contienen lípidos artificiales incluyen liposomas y micelas. Como se discutió anteriormente, un vehículo de administración para el uso con la presente invención se puede modificar para seleccionar como objetivo un sitio particular en un paciente, por lo que se selecciona como objetivo y se hace uso de un agente inhibitorio en ese sitio. Las modificaciones adecuadas incluyen manipular la fórmula química de la porción lipídica del vehículo de administración y/o introducir en el vehículo un agente de selección del objetivo capaz de seleccionar como objetivo de manera específica un vehículo de administración a un sitio preferido, por ejemplo, un tipo preferido de célula. Otros vehículos de administración adecuados incluyen partículas de oro, conjugados de poli-L-lisina/ADN molecular, y cromosomas artificiales.

Un agente útil en los presentes métodos se puede administrar en una formulación adecuada para administración pulmonar o nasal, y, en particular, administración en aerosol, también mencionada en la presente memoria como una formulación de aerosol. Tal vía de administración es especialmente útil en el método para prevenir o inhibir la AHR y/o inflamación de las vías respiratorias en un paciente, pero se puede usar en otras afecciones cuando se desea la administración al pulmón o las vías respiratorias. Además, estas formulaciones son especialmente útiles para la administración de anticuerpos. Tal formulación incluye en general un vehículo, y preferiblemente, un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos que son especialmente útiles para la administración en aerosol para el uso con la presente invención incluyen, pero sin limitación: etanol anhidro; polvos secos, dispersables; cápsulas pequeñas (p.ej., microcápsulas o micropartículas); liposomas; excipientes inyectables; y aerosoles nebulizados. El etanol anhidro para la administración de proteínas y péptidos se describe, por ejemplo, en Choi et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 98(20):11103-11107 (2001). Los polvos secos, dispersables adecuados para la administración en aerosol de los agentes se describen con detalle, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n° 6.165.463 (véanse también los productos de Inhale Therapeutic Systems, Inc., ahora Nektar, y Quadrant Technology). Los liposomas adecuados para el uso en aerosoles incluyen cualquier liposoma, y especialmente, cualquier liposoma que sea lo suficientemente pequeño como para administrarse en aerosol en el método descrito en la presente memoria. Las microcápsulas y micropartículas se conocen en la técnica. Por ejemplo, Alliance Pharmaceutical Corporation tiene

una tecnología de modificación de partículas denominada PulmoSphere, en la que se preparan micropartículas mediante un proceso patentado de secado por pulverización y que están diseñadas para ser huecas y porosas. Un producto de Ventolin consiste en partículas micronizadas de albuterol (base libre) suspendidas en una mezcla de propelentes basados en CFC. Proventil HFA contiene sulfato de albuterol micronizado y un pequeño porcentaje de un co-disolvente de etanol para solubilizar el tensioactivo estabilizante de ácido oleico. La incorporación de fármacos en liposomas tiene varias ventajas para la administración de aerosoles. Debido a que los liposomas son relativamente insolubles, se puede prolongar el tiempo de retención de ciertos fármacos en el pulmón para obtener una eficacia incrementada. Los liposomas también son absorbidos principalmente por las células fagocíticas, lo que los hace especialmente adecuados para la administración de ciertos fármacos. Los dispositivos para la administración de formulaciones en aerosol incluyen, pero sin limitación, inhaladores de dosis medidas ("MDI") presurizados, inhaladores de polvo seco ("DPI"), dispositivos de disolución medida ("MSI"), e inhaladores ultrasónicos, e incluyen dispositivos que son nebulizadores e inhaladores. Se pueden usar diversos agentes en las formulaciones administradas mediante tales dispositivos, tales como agentes auxiliares de suspensión y agentes solubilizantes que son especialmente útiles para la administración de proteínas (p.ej., ácido oligoláctico, ácidos de acil-amida, y M-PEGS mono-funcionalizado; véase, p.ej., McKenzie y Oliver; 2000, Formulating Therapeutic Proteins and Peptides in Pressurized Metered Dose Inhalers For Pulmonary Delivery, 3M Health Care Ltd., Morley Street, Loughborough, Leicestershire LE11 1EP, R.U.).

Un vehículo farmacéuticamente aceptable que es capaz de seleccionar el objetivo se denomina en la presente memoria "vehículo de administración con selección del objetivo". Los vehículos de administración con selección del objetivo descritos en la presente memoria son capaces de administrar una formulación, que incluye un agente inhibitorio, en un sitio objetivo en un paciente. Un "sitio objetivo" se refiere a un sitio en un paciente al que se desea administrar una formulación terapéutica. Por ejemplo, un sitio objetivo puede ser cualquier célula o tejido que se seleccione como objetivo mediante un anticuerpo de la presente invención, o mediante inyección directa o administración con el uso de liposomas, vectores virales u otros vehículos de administración, que incluyen ribozimas. Un vehículo de administración o anticuerpo descrito en la presente memoria se puede modificar para seleccionar como objetivo un sitio particular en un animal, por lo que se selecciona como objetivo y se hace uso de un compuesto particular, anticuerpo, proteína, o molécula de ácido nucleico en ese sitio. Las modificaciones adecuadas incluyen manipular la fórmula química de la porción lipídica de un vehículo de administración y/o introducir en el vehículo un compuesto capaz de seleccionar como objetivo de manera específica un vehículo de administración a un sitio preferido, por ejemplo, un tipo preferido de célula o tejido. De manera específica, la selección del objetivo se refiere a provocar que un vehículo de administración se una a una célula particular mediante la interacción del compuesto del vehículo con una molécula en la superficie de la célula. Los compuestos de selección del objetivo adecuados incluyen ligandos capaces de unirse de manera selectiva (es decir, de manera específica) a otra molécula en un sitio particular. Los ejemplos de tales ligandos incluyen anticuerpos, antígenos, receptores y ligandos de receptores. Los ejemplos especialmente útiles incluyen cualquier ligando asociado a la ruta del complemento (p.ej., CR2, C3, C3d, C3dg, iC3b, C3b) o cualquier ligando asociado al tipo de célula, tipo de tejido, o sitio en el animal a tratar. La manipulación de la fórmula química de la porción lipídica del vehículo de administración puede modular la selección del objetivo extracelular o intracelular del vehículo de administración. Por ejemplo, se puede añadir un producto químico a la fórmula de lípidos de un liposoma que altere la carga de la bicapa lipídica del liposoma de forma que el liposoma se fusione con células que tienen características de carga particulares.

Un vehículo de administración útil para una diversidad de agentes y vías de administración es un liposoma. Un liposoma es capaz de permanecer estable en un animal durante una cantidad suficiente de tiempo para administrar una molécula de ácido nucleico, o incluso una proteína o anticuerpo como se describe en la presente invención, en un sitio preferido en el animal. Como se describe en la presente memoria, un liposoma comprende una composición de lípidos que es capaz de administrar una molécula de ácido nucleico, proteína, o anticuerpo como se describe en la presente invención en un sitio particular, o seleccionado, en un animal. Un liposoma para el uso con la presente invención comprende una composición de lípidos que es capaz de fusionarse con la membrana plasmática de la célula objetivo para administrar su contenido en una célula. Los liposomas adecuados para el uso con la presente invención incluyen cualquier liposoma. Los liposomas preferidos para el uso con la presente invención incluyen aquellos liposomas usados en general, por ejemplo, en los métodos de administración de genes conocidos para los expertos en la técnica. Los liposomas más preferidos comprenden los liposomas que tienen una composición de lípidos policatiónicos y/o los liposomas que tienen un esqueleto de colesterol conjugado a polietilén glicol. La complejación de un liposoma con una molécula de ácido nucleico, proteína o anticuerpo de la presente invención se puede conseguir mediante el uso de los métodos habituales en la técnica.

De acuerdo con la presente invención, los expertos en la técnica pueden llevar a cabo la determinación de los protocolos aceptables para administrar un agente, composición o formulación, que incluyen la vía de administración y la cantidad eficaz de un agente a administrar a un animal. Se puede administrar un agente de la presente invención *in vivo* o *ex vivo*. Las vías de administración adecuadas *in vivo* pueden incluir, pero sin limitación, las vías oral, nasal, inhalada, tópica, intratraqueal, transdérmica, rectal, y parenteral. Las vías parenterales preferidas pueden incluir, pero sin limitación, las vías subcutánea, intradérmica, intravenosa, intramuscular, e intraperitoneal. Las vías tópicas preferidas incluyen la inhalación mediante aerosol (es decir, en spray) o la administración superficial tópica en la piel de un animal. Preferiblemente, se administra un agente mediante las vías nasal, inhalada, intratraqueal, tópica, o sistémica (p.ej., intraperitoneal, intravenosa). La expresión "*ex vivo*" se refiere a llevar a cabo parte de la

etapa de administración fuera del paciente. Las vías preferidas de administración para los anticuerpos incluyen las vías parenterales y las vías en aerosol/nasal/inhalada.

Las administraciones intravenosa, intraperitoneal, e intramuscular se pueden llevar a cabo mediante el uso de métodos habituales en la técnica. La administración en aerosol (inhalación) se puede llevar a cabo mediante el uso de métodos habituales en la técnica (véase, p.ej., Stribling et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 189:11277-11281 (1992)). Los vehículos adecuados para la administración en aerosol se describieron anteriormente. Los dispositivos para la administración de formulaciones en aerosol incluyen, pero sin limitación, inhaladores de dosis medidas ("MDI") presurizados, inhaladores de polvo seco ("DPI"), y dispositivos de disolución medida ("MSI"), e incluyen dispositivos que son nebulizadores e inhaladores. La administración oral se puede llevar a cabo complejando una composición terapéutica de la presente invención con un vehículo capaz de resistir la degradación por las enzimas digestivas del intestino de un animal. Los ejemplos de tales vehículos incluyen cápsulas plásticas o comprimidos, tales como los conocidos en la técnica. Las técnicas de inyección directa son especialmente útiles para administrar una molécula de ácido nucleico recombinante a una célula o tejido que es accesible mediante cirugía, y especialmente, en o cerca de la superficie del cuerpo. La administración de una composición de manera local en el área de una célula objetivo se refiere a inyectar la composición a centímetros y, preferiblemente, milímetros de la célula o tejido objetivo.

Una dosis única preferida de un agente, que incluye proteínas, moléculas pequeñas y anticuerpos, para el uso en cualquier método descrito en la presente memoria, comprende entre alrededor de 0,01 µg/kg y alrededor de 10 mg/kg de peso corporal de un animal. Una dosis única más preferida de un agente comprende entre alrededor de 1 µg/kg y alrededor de 10 mg/kg de peso corporal de un animal. Una dosis única aún más preferida de un agente comprende entre alrededor de 5 µg/kg y alrededor de 7 mg/kg de peso corporal de un animal. Una dosis única aún más preferida de un agente comprende entre alrededor de 10 µg/kg y alrededor de 5 mg/kg de peso corporal de un animal. Una dosis única especialmente preferida de un agente comprende entre alrededor de 0,01 mg/kg y alrededor de 1 mg/kg de peso corporal de un animal, si el agente se administra mediante aerosol. Otra dosis única especialmente preferida de un agente comprende entre alrededor de 1 mg/kg y alrededor de 10 mg/kg de peso corporal de un animal, si el agente se administra de manera parenteral.

En una realización, una dosis adecuada de un agente de la presente invención para el uso en cualquier método descrito en la presente memoria es una dosis eficaz para inhibir la expresión o la actividad de al menos una proteína en la ruta alternativa del complemento como se describe en la presente memoria (p.ej., factor B, factor D o properdina), en comparación con la ausencia de la administración del agente. Los métodos para medir la expresión o la actividad biológica de una proteína se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, transferencia de Northern, transferencia de Western, RT-PCR en tiempo real, y similares. En otra realización, una dosis adecuada de un agente de la presente invención es una dosis que inhibe de manera medible la ruta alternativa del complemento descrita en la presente memoria. La activación del complemento y la inhibición del mismo se pueden medir mediante el uso de técnicas/ensayos que se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, se puede llevar a cabo un análisis *in vitro* del depósito de C3 en partículas de zimosano A como se describió en los ejemplos de la publicación de patente de EE.UU. pendiente junto con la presente N° US-2005/0260198 A1. También se puede ensayar la capacidad del agente de inhibir la lisis de eritrocitos sin sensibilizar con suero humano. La extrapolación de los resultados *in vitro* a dosis *in vivo* basada en estos ensayos está dentro de la capacidad de los expertos en la técnica.

En seres humanos, se sabe en la técnica que, mediante el uso de los métodos convencionales de administración en aerosol, solamente alrededor de un 10% de la disolución administrada entra generalmente en las vías respiratorias profundas, incluso mediante el uso de un inhalador. Si la administración en aerosol es mediante inhalación directa, se puede suponer una dosis de alrededor del 10% de la administrada mediante los métodos de nebulización. Finalmente, un experto en la técnica será capaz de convertir fácilmente una dosis de ratón en una dosis humana mediante el uso de escalas alométricas. Básicamente, una escala de la dosis de ratón a ser humano se basa en la velocidad de aclaramiento de un compuesto y la superficie corporal del ratón. La conversión para mg/kg es un doceavo del "nivel de sucesos adversos no observados" ("NOEL") para obtener la concentración para la dosis humana. Este cálculo supone que la eliminación entre ratón y ser humano es la misma, lo cual se cree que es el caso para los anticuerpos.

Por lo tanto, una dosis única preferida de un anticuerpo comprende entre alrededor de 1 ng/kg y alrededor de menos de 1 mg/kg de peso corporal de un animal. Una dosis única más preferida de un anticuerpo comprende entre alrededor de 20 ng/kg y alrededor de 600 µg/kg de peso corporal del animal. Una dosis única aún más preferida de un anticuerpo, en particular cuando la formulación de anticuerpo se administra mediante nebulización, comprende entre alrededor de 20 ng/kg y alrededor de 600 µg/kg de peso corporal del animal, y más preferiblemente entre alrededor de 20 ng/kg y alrededor de 500 µg/kg, y más preferiblemente entre alrededor de 20 ng/kg y alrededor de 400 µg/kg, y más preferiblemente entre alrededor de 20 ng/kg y alrededor de 300 µg/kg, y más preferiblemente entre alrededor de 20 ng/kg y alrededor de 200 µg/kg, y más preferiblemente entre alrededor de 20 ng/kg y alrededor de 100 µg/kg, y más preferiblemente entre alrededor de 20 ng/kg y alrededor de 50 µg/kg de peso corporal del animal.

Otra dosis única preferida de un anticuerpo, en particular cuando la formulación de anticuerpo se administra mediante nebulización, comprende entre alrededor de 200 ng/kg y alrededor de 600 µg/kg de peso corporal del animal, y más preferiblemente entre alrededor de 200 ng/kg y alrededor de 500 µg/kg, y más preferiblemente entre

alrededor de 200 ng/kg y alrededor de 400 µg/kg, y más preferiblemente entre alrededor de 200 ng/kg y alrededor de 300 µg/kg, y más preferiblemente entre alrededor de 200 ng/kg y alrededor de 200 µg/kg, y más preferiblemente entre alrededor de 200 ng/kg y alrededor de 100 µg/kg, y más preferiblemente entre alrededor de 200 ng/kg y alrededor de 50 µg/kg de peso corporal del animal.

- 5 Otra dosis única preferida de un anticuerpo, en particular cuando la formulación de anticuerpo se administra mediante inhalación directa desde un inhalador, comprende entre alrededor de 2 ng/kg y alrededor de 100 µg/kg de peso corporal del animal, y más preferiblemente entre alrededor de 2 ng/kg y alrededor de 50 µg/kg, y más preferiblemente entre alrededor de 2 ng/kg y alrededor de 10 µg/kg, y más preferiblemente entre alrededor de 2 ng/kg y alrededor de 5 µg/kg, y más preferiblemente entre alrededor de 2 ng/kg y alrededor de 1 µg/kg, y más preferiblemente entre alrededor de 2 ng/kg y alrededor de 0,5 µg/kg, y más preferiblemente entre alrededor de 2 ng/kg y alrededor de 0,25 µg/kg, y más preferiblemente entre alrededor de 2 ng/kg y alrededor de 0,1 µg/kg de peso corporal del animal.

- 15 En otra realización, el anticuerpo se administra a una dosis de menos de alrededor de 500 µg de anticuerpo por mililitro de formulación, y preferiblemente menos de alrededor de 250 µg de anticuerpo por mililitro de formulación, y más preferiblemente menos de alrededor de 100 µg de anticuerpo por mililitro de formulación, y más preferiblemente menos de alrededor de 50 µg de anticuerpo por mililitro de formulación, y más preferiblemente menos de alrededor de 40 µg de anticuerpo por mililitro de formulación, y más preferiblemente menos de alrededor de 30 µg de anticuerpo por mililitro de formulación, y más preferiblemente menos de alrededor de 20 µg de anticuerpo por mililitro de formulación, y más preferiblemente menos de alrededor de 10 µg de anticuerpo por mililitro de formulación, y aún más preferiblemente entre alrededor de 5 µg de anticuerpo y alrededor de 10 µg de anticuerpo por mililitro de formulación.

- 20 Con respecto más especialmente al método para reducir o prevenir la hipersensibilidad de las vías respiratorias y/o la inflamación de las vías respiratorias o una afección o enfermedad relacionada con ellas, una dosis única adecuada de un agente inhibitorio a administrar a un animal es una dosis que es capaz de reducir o prevenir la hipersensibilidad de las vías respiratorias y/o la inflamación de las vías respiratorias, o de reducir al menos otro síntoma de una enfermedad a tratar (p.ej., asma), en un animal cuando se administra una o más veces a lo largo de un periodo de tiempo adecuado. Cuando el paciente tiene o corre el riesgo de desarrollar AHR, una dosis única adecuada de un agente comprende una dosis que mejora AHR por una dosis doble de un agente irritante, o que mejora la función respiratoria estática de un animal.

- 30 Según el método descrito en la presente memoria, una cantidad eficaz de un agente que inhibe la AHR para administrarlo a un animal comprende una cantidad que es capaz de reducir la hipersensibilidad de las vías respiratorias (AHR) o la inflamación de las vías respiratorias sin ser tóxica para el animal. Una cantidad que es tóxica para un animal comprende cualquier cantidad que provoca un daño a la estructura o la función de un animal (es decir, cantidad tóxica).

- 35 Tal como se describe en la presente memoria, en un animal que tiene AHR, una cantidad eficaz de un agente a administrar a un animal puede ser una cantidad que reduce de manera medible la AHR en el animal en comparación con antes de la administración del agente. Tal como se describe en la presente memoria, una cantidad eficaz de un agente a administrar a un animal puede ser una cantidad que reduce de manera medible la AHR en el animal en comparación con un nivel de AHR en las vías respiratorias en una población de animales con inflamación que está asociada a AHR en la que no se administró el agente. El agente preferiblemente es capaz de reducir la AHR en un animal, incluso cuando el agente se administra después del inicio de los síntomas físicos de AHR (es decir, después del inicio de AHR aguda). Lo más preferiblemente, una cantidad eficaz del agente es una cantidad que reduce los síntomas de AHR hasta el punto en el que la AHR ya no se detecta en el paciente. Una cantidad eficaz del agente puede ser además una cantidad que previene, o sustancialmente inhibe, el inicio de AHR cuando el agente se administra antes de la exposición del paciente a un estímulo que provoca AHR, tal como un alérgeno, de manera suficiente para inducir la AHR en ausencia del agente.

- 50 Un experto en la técnica podrá determinar que el número de dosis de un agente a administrar a un animal depende del grado de hipersensibilidad de las vías respiratorias y la afección subyacente de la que AHR es un síntoma, y la respuesta de un paciente individual al tratamiento. Además, el médico podrá determinar el momento adecuado para la administración del agente de una manera eficaz para reducir la AHR en el animal. Preferiblemente, el agente se administra 48 horas antes de la exposición del paciente a una cantidad de un estímulo que provoca AHR eficaz para inducir AHR, y más preferiblemente, 36 horas, y más preferiblemente 24 horas, y más preferiblemente 12 horas, y más preferiblemente 6 horas, 5 horas, 4 horas, 3 horas, 2 horas, o 1 hora antes de la exposición del paciente a una cantidad de un estímulo que provoca AHR eficaz para inducir AHR. El agente se puede administrar tan pronto como el paciente o el médico reconozcan (es decir, inmediatamente) que el paciente se ha expuesto o está a punto de exponerse a un estímulo que provoca AHR, y especialmente un estímulo que provoca AHR al cual el paciente está sensibilizado (es decir, un alérgeno). El agente se puede administrar tras el primer signo de desarrollo de AHR (es decir, AHR de inicio agudo), y preferiblemente, en al menos 2 horas del desarrollo de los síntomas de AHR, y más preferiblemente, en al menos 1 hora, y más preferiblemente en al menos 30 minutos, y más preferiblemente en al menos 10 minutos, y más preferiblemente en al menos 5 minutos del desarrollo de los síntomas de AHR. Los síntomas de AHR y los métodos para medir o detectar tales síntomas se han descrito con detalle anteriormente.

Preferiblemente, tales administraciones se proporcionan hasta que aparecen signos de reducción de la AHR, y después según sea necesario hasta que desaparezcan los síntomas de AHR.

5 Con respecto especialmente al método para inhibir o prevenir la lesión por isquemia-reperfusión, una cantidad eficaz de un agente, y en particular un anticuerpo anti-factor B o fragmento de unión al antígeno del mismo (o polipéptido de unión al antígeno) a administrar a un animal es una cantidad que inhibe de manera medible el daño histológico, que incluye el daño oxidativo o la muerte celular, en el animal en comparación con la ausencia de administración del agente. En el caso de lesión por isquemia-reperfusión renal, una cantidad eficaz de un agente a administrar a un animal es una cantidad que inhibe de manera medible los incrementos del nitrógeno ureico en suero o que disminuye de manera medible la lesión histológica en los tejidos del riñón del animal en comparación con la ausencia de administración del agente. Una dosis única adecuada de un agente inhibitorio a administrar a un animal es una dosis que es capaz de reducir o prevenir al menos un síntoma, tipo de lesión, o daño resultante, de la lesión por isquemia-reperfusión en un animal cuando se administra una o más veces a lo largo de un periodo de tiempo adecuado. Anteriormente se describieron con detalle las dosis adecuadas de anticuerpos, que incluyen las diversas vías de administración. Una cantidad eficaz de un agente que inhibe la lesión por isquemia-reperfusión a administrar a un animal puede comprender una cantidad que es capaz de inhibir al menos un síntoma o daño provocado por la lesión por isquemia-reperfusión sin ser tóxica para el animal.

20 Se puede usar cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria en cualquier animal, y, en particular, en cualquier animal de la clase de vertebrados Mammalia (es decir, mamíferos), que incluyen, sin limitación, primates, roedores, ganado y mascotas domésticas. Los mamíferos preferidos a tratar con los métodos descritos en la presente memoria son seres humanos.

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> Taligen Therapeutics, Inc.
 Woodruff EMLLEN
 V. Michael HOLERS
 Peter FLYNN

<120> ANTICUERPO ANTI-FACTOR B HUMANIZADO

10 <130> 577712000840

<140> PCT/US2008/003381
 <141> 14-03-2008

15 <150> US 60/906.816
 <151> 14-03-2007

<160> 37

20 <170> FastSEQ para Windows versión 4.0

<210> 1
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

25 <220>
 <221> característica_misc
 <222> 9
 <223> t o c

30 <220>
 <223> cebador directo V-Kappa-4

35 <400> 1
 tcagcttctt gctaatacagt g 21

<210> 2
 <211> 32
 <212> ADN
 40 <213> Mus musculus

<220>
 <223> cebador inverso V-Kappa-4

45 <400> 2
 cgactagtcg actggtggga agatggatac ag 32

<210> 3
 <211> 21
 50 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> característica_misc
 55 <222> 13
 <223> g o a

<220>
 <223> cebador directo V-Kappa-10

60 <400> 3
 tgttttcaag gtrccagatg t 21

65 <210> 4
 <211> 32

<212> ADN
 <213> Mus musculus

 <220>
 5 <223> cebador inverso V-Kappa-10

 <400> 4
 cgactagtcg actggtggga agatggatac ag 32

 10 <210> 5
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

 15 <220>
 <221> característica_misc
 <222> 3
 <223> t o c

 20 <220>
 <221> característica_misc
 <222> 12
 <223> g o t

 25 <220>
 <221> característica_misc
 <222> 19
 <223> a o t

 30 <220>
 <223> cebador directo de V-Pesada-6

 <400> 5
 ctyttaaag gkggccagwg 20

 35 <210> 6
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

 40 <220>
 <223> cebador inverso de V-Pesada-6

 <400> 6
 45 cgacaagtcg actagccctt gaccaggcat cc 32

 <210> 7
 <211> 21
 <212> ADN
 50 <213> Mus musculus

 <220>
 <221> característica_misc
 <222> 7
 55 <223> a o c

 <220>
 <223> cebador directo de V-Pesada-7

 <400> 7
 60 cytttamatg gtatccagtg t 21

 <210> 8
 <211> 32
 65 <212> ADN

<213> Mus musculus

<220>

<223> cebador inverso de V-Pesada-7

5

<400> 8

cgacaagtcg actagccctt gaccaggcat cc

32

<210> 9

10

<211> 114

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

15

<223> PCR de V-Kappa-4

<400> 9

```

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

20

<210> 10

<211> 120

<212> PRT

<213> Mus musculus

25

<220>

<223> PCR de V-Pesada-6

<400> 10

```

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

30

<210> 11

<211> 120

<212> PRT

<213> Mus musculus

35

<220>

ES 2 507 542 T3

<223> PCR de V-Pesada-7

<400> 11

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

5

<210> 12

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<220>

<223> V-Kappa-IV-B3/J-Kappa-2 de la línea germinal

<400> 12

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

15

Lys

<210> 13

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<220>

<223> V-Pesada-1-02/J-Pesada-4 de la línea germinal

25

<400> 13

ES 2 507 542 T3

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

5 <210> 14
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

10 <220>
 <223> dominio V-Kappa del Ab de referencia TA10

<400> 14
 Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30
 Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln
 85 90 95
 Ser Tyr Asn Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110
 Lys

15 <210> 15
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

20 <220>
 <223> dominio V-Pesada del Ab de referencia TA10

<400> 15
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Pro Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Tyr Tyr Ser Asn Ser Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 16
 <211> 113
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> dominio V-Kappa de TA101-1

10 <400> 16
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30
 Ser Thr Ser Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln
 85 90 95
 Val Tyr Asn Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110
 Lys

15 <210> 17
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 20 <223> dominio V-Pesada de TA101-1

<400> 17
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Tyr Tyr Ala Asn Ser Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

25 <210> 18
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> dominio V-Kappa de TA102-4

<400> 18

ES 2 507 542 T3

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

5 <210> 19
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> dominio V-Pesada de TA102-4

<400> 19
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Tyr Tyr Ala Asn Ser Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

15 <210> 20
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> dominio V-Kappa de TA103-2

<400> 20

ES 2 507 542 T3

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

5 <210> 21
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> dominio V-Pesada de TA103-2

<400> 21
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Tyr Tyr Ala Asn Ser Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

15 <210> 22
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

20 <220>
 <223> dominio CDR3-FR4 de V-Kappa del Ab de referencia TA10

<400> 22
 Lys Gln Ser Tyr Asn Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu
 1 5 10 15
 Glu Ile Lys

25 <210> 23
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

30 <220>
 <223> dominio CDR3-FR4 de V-Pesada del Ab de referencia TA10

<400> 23

ES 2 507 542 T3

Gly Tyr Tyr Ser Asn Ser Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 1 5 10 15
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 20

5 <210> 24
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> dominio CDR3-FR4 de V-Kappa de TA101-1

<400> 24
 Lys Gln Val Tyr Asn Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu
 1 5 10 15
 Glu Ile Lys

15 <210> 25
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> dominio CDR3-FR4 de V-Kappa de TA101-1

<400> 25
 Gly Tyr Tyr Ala Asn Ser Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 1 5 10 15
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 20

25 <210> 26
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> dominio CDR3-FR4 de V-Kappa de TA102-4

<400> 26
 Lys Gln Val Tyr Asn Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu
 1 5 10 15
 Glu Ile Lys

35 <210> 27
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> dominio CDR3-FR4 de V-Pesada de TA102-4

<400> 27
 Gly Tyr Tyr Ala Asn Ser Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 1 5 10 15
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 20

45 <210> 28
 <211> 19
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> dominio CDR3-FR4 de V-Kappa de TA103-2

ES 2 507 542 T3

<400> 28

Lys Gln Val Tyr Asn Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu
1 5 10 15
Glu Ile Lys

5

<210> 29

<211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> dominio CDR3-FR4 de V-Pesada de TA103-2

<400> 29

Gly Tyr Tyr Ala Asn Ser Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
1 5 10 15
Leu Val Thr Val Ser Ser
20

15

<210> 30

<211> 739

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<220>

<223> factor B secretado

<400> 30

Thr Pro Trp Ser Leu Ala Arg Pro Gln Gly Ser Cys Ser Leu Glu Gly
 1 Val Glu Ile Lys Gly Gly Ser Phe Arg Leu Leu Gln Glu Gly Gln Ala
 20 Leu Glu Tyr Val Cys Pro Ser Gly Phe Tyr Pro Tyr Pro Val Gln Thr
 35 Arg Thr Cys Arg Ser Thr Gly Ser Trp Ser Thr Leu Lys Thr Gln Asp
 50 Gln Lys Thr Val Arg Lys Ala Glu Cys Arg Ala Ile His Cys Pro Arg
 65 Pro His Asp Phe Glu Asn Gly Glu Tyr Trp Pro Arg Ser Pro Tyr Tyr
 85 Asn Val Ser Asp Glu Ile Ser Phe His Cys Tyr Asp Gly Tyr Thr Leu
 100 Arg Gly Ser Ala Asn Arg Thr Cys Gln Val Asn Gly Arg Trp Ser Gly
 115 Gln Thr Ala Ile Cys Asp Asn Gly Ala Gly Tyr Cys Ser Asn Pro Gly
 130 Ile Pro Ile Gly Thr Arg Lys Val Gly Ser Gln Tyr Arg Leu Glu Asp
 145 Ser Val Thr Tyr His Cys Ser Arg Gly Leu Thr Leu Arg Gly Ser Gln
 165 Arg Arg Thr Cys Gln Glu Gly Gly Ser Trp Ser Gly Thr Glu Pro Ser
 180 Cys Gln Asp Ser Phe Met Tyr Asp Thr Pro Gln Glu Val Ala Glu Ala
 195 Phe Leu Ser Ser Leu Thr Glu Thr Ile Glu Gly Val Asp Ala Glu Asp
 210 Gly His Gly Pro Gly Glu Gln Gln Lys Arg Lys Ile Val Leu Asp Pro
 225 Ser Gly Ser Met Asn Ile Tyr Leu Val Leu Asp Gly Ser Asp Ser Ile
 245 Gly Ala Ser Asn Phe Thr Gly Ala Lys Lys Cys Leu Val Asn Leu Ile
 260 Glu Lys Val Ala Ser Tyr Gly Val Lys Pro Arg Tyr Gly Leu Val Thr
 275 Tyr Ala Thr Tyr Pro Lys Ile Trp Val Lys Val Ser Glu Ala Asp Ser
 290 Ser Asn Ala Asp Trp Val Thr Lys Gln Leu Asn Glu Ile Asn Tyr Glu
 305 Asp His Lys Leu Lys Ser Gly Thr Asn Thr Lys Lys Ala Leu Gln Ala
 325 Val Tyr Ser Met Met Ser Trp Pro Asp Asp Val Pro Pro Glu Gly Trp
 340 Asn Arg Thr Arg His Val Ile Ile Leu Met Thr Asp Gly Leu His Asn
 355 Met Gly Gly Asp Pro Ile Thr Val Ile Asp Glu Ile Arg Asp Leu Leu
 370 Tyr Ile Gly Lys Asp Arg Lys Asn Pro Arg Glu Asp Tyr Leu Asp Val
 385 Tyr Val Phe Gly Val Gly Pro Leu Val Asn Gln Val Asn Ile Asn Ala
 405 Leu Ala Ser Lys Lys Asp Asn Glu Gln His Val Phe Lys Val Lys Asp
 420 Met Glu Asn Leu Glu Asp Val Phe Tyr Gln Met Ile Asp Glu Ser Gln
 435 Ser Leu Ser Leu Cys Gly Met Val Trp Glu His Arg Lys Gly Thr Asp
 450 Tyr His Lys Gln Pro Trp Gln Ala Lys Ile Ser Val Ile Arg Pro Ser
 465 Lys Gly His Glu Ser Cys Met Gly Ala Val Val Ser Glu Tyr Phe Val
 485 Leu Thr Ala Ala His Cys Phe Thr Val Asp Asp Lys Glu His Ser Ile
 500 Lys Val Ser Val Gly Gly Glu Lys Arg Asp Leu Glu Ile Glu Val Val
 515 Leu Phe His Pro Asn Tyr Asn Ile Asn Gly Lys Lys Glu Ala Gly Ile
 530 Pro Glu Phe Tyr Asp Tyr Asp Val Ala Leu Ile Lys Leu Lys Asn Lys

<211> 25
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5 <220>
 <223> Secuencia amino-terminal del clon V-Kappa-4 (TA-V-Kappa-4)

<400> 34
 Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser
 20 25

10 <210> 35
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Dominio V-Pesada de TA101-1 con sustitución Q a E

<400> 35
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Tyr Tyr Ala Asn Ser Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

20 <210> 36
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Dominio V-Pesada de TA102-4 con sustitución Q a E

30 <400> 36
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Tyr Tyr Ala Asn Ser Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 37

<211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Dominio V-Pesada de TA103-2 con sustitución Q a E

<400> 37
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Tyr Tyr Ala Asn Ser Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

10

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-factor B humano modificado o un fragmento de unión al antígeno del mismo que se une de manera selectiva al factor B en el tercer dominio de repeticiones consenso cortas ("SCR") e impide la formación del complejo C3bBb, en el que el anticuerpo humano modificado o el fragmento de unión al antígeno del mismo tiene una constante de disociación en equilibrio (" K_D ") de entre $3,0 \times 10^{-9}$ M y $7,0 \times 10^{-9}$ M, y en el que:
- 5 (a) el anticuerpo anti-factor B humano modificado o el fragmento de unión al antígeno del mismo comprende un polipéptido de la región V_k seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID N°:14, SEQ 10 NO:16, SEQ ID N°:18, y SEQ ID N°:20, y un polipéptido de la región V_H seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID N°:15, SEQ ID N°:17, SEQ ID N°:35, SEQ ID N°:19, SEQ ID N°:36, SEQ ID N°:21 y SEQ ID N°:37; o
- 10 (b) el anticuerpo anti-factor B humano modificado o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende un polipéptido de la región V_k que comprende la región CDR3-FR4 seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID N°:22, SEQ ID N°:24, SEQ ID N°:26 y SEQ ID N°:28, y un polipéptido de la región V_H que comprende la región CDR3-FR4 seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID N°:23, SEQ ID N°:25, SEQ ID N°:27, y SEQ ID N°:29.
- 15 2. El anticuerpo anti-factor B humano modificado o un fragmento de unión al antígeno del mismo de la reivindicación 1, que comprende un polipéptido de la región V_k de SEQ ID N°:14 y un polipéptido de la región V_H de SEQ ID N°:15, un polipéptido de la región V_k de SEQ ID N°:16 y un polipéptido de la región V_H de SEQ ID N°:17, un polipéptido de la región V_k de SEQ ID N°:18 y un polipéptido de la región V_H de SEQ ID N°:19, un polipéptido de la región V_k de SEQ ID N°:20 y un polipéptido de la región V_H de SEQ ID N°:21, un polipéptido de la región V_k de SEQ ID N°:16 y un polipéptido de la región V_H de SEQ ID N°:35, un polipéptido de la región V_k de SEQ ID N°:18 y un polipéptido de la región V_H de SEQ ID N°:36, o un polipéptido de la región V_k de SEQ ID N°:20 y un polipéptido de la región V_H de SEQ ID N°:37.
- 20 3. El anticuerpo anti-factor B humano modificado o un fragmento de unión al antígeno del mismo de la reivindicación 1, que comprende un polipéptido de la región V_k que comprende una región CDR3-FR4 de SEQ ID N°:22 y un polipéptido de la región V_H que comprende una región CDR3-FR4 de SEQ ID N°:23, un polipéptido de la región V_k que comprende una región CDR3-FR4 de SEQ ID N°:24 y un polipéptido de la región V_H que comprende una región CDR3-FR4 de SEQ ID N°:25, un polipéptido de la región V_k que comprende una región CDR3-FR4 de SEQ ID N°:26 y un polipéptido de la región V_H que comprende una región CDR3-FR4 de SEQ ID N°:27, o un polipéptido de la región V_k que comprende una región CDR3-FR4 de SEQ ID N°:28 y un polipéptido de la región V_H que comprende una región CDR3-FR4 de SEQ ID N°:29.
- 25 4. El anticuerpo anti-factor B humano modificado o un fragmento de unión al antígeno del mismo de la reivindicación 1, en el que el fragmento de unión al antígeno se selecciona del grupo que consiste en Fab', (Fab')₂, Fv, scFv, y diacuerpos.
- 30 5. Un anticuerpo anti-factor B humano modificado o un fragmento de unión al antígeno del mismo según la reivindicación 1 para el uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno seleccionado de hipersensibilidad de las vías respiratorias ("AHR"), inflamación de las vías respiratorias y lesión por isquemia-reperfusión, en el que la activación de la ruta alternativa del complemento desempeña un papel en un individuo que tiene, o corre el riesgo de desarrollar, dicha enfermedad o trastorno.
- 35 6. El anticuerpo anti-factor B humano modificado o un fragmento de unión al antígeno del mismo para el uso según la reivindicación 5, en el que el anticuerpo anti-factor B humano modificado o el fragmento de unión al antígeno del mismo reduce la enfermedad o el trastorno en el individuo en comparación con antes de la administración del anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno del mismo.
- 40 7. El anticuerpo anti-factor B humano modificado o un fragmento de unión al antígeno del mismo para el uso según la reivindicación 6, en el que dicha AHR o inflamación de las vías respiratorias está asociada a una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica ("EPOC"), aspergilosis broncopulmonar alérgica, inflamación alérgica, neumonía por hipersensibilidad, neumonía eosinofílica, enfisema, bronquitis, bronquitis alérgica, bronquiectasia, fibrosis quística, tuberculosis, neumonitis por hipersensibilidad, asma ocupacional, sarcoidosis, síndrome de enfermedad reactiva de las vías respiratorias, enfermedad pulmonar intersticial, síndrome hipereosinofílico, rinitis, sinusitis, asma inducida por el ejercicio, asma inducida por la contaminación, asma de variante tusiva, parasitosis pulmonar, infección por virus sincitial respiratorio ("RSV"), infección por virus paragripal ("PIV"), infección por rinovirus ("RV"), e infección por adenovirus.
- 45 8. Un anticuerpo anti-factor B humano modificado o un fragmento de unión al antígeno del mismo según la reivindicación 1 para el uso en la inhibición selectiva de la activación de la ruta alternativa del complemento en un individuo que tiene, o corre el riesgo de desarrollar, una afección o enfermedad seleccionada de hipersensibilidad de las vías respiratorias ("AHR"), inflamación de las vías respiratorias y lesión por isquemia-reperfusión, en el que la activación de la ruta alternativa del complemento contribuye a la afección o enfermedad, exacerba al menos un síntoma de la afección o enfermedad, o provoca la afección o enfermedad, en el que dicha hipersensibilidad de las vías respiratorias ("AHR") o inflamación de las vías respiratorias está asociada a una enfermedad seleccionada del
- 50 55

- 5 grupo que consiste en asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica ("EPOC"), aspergilosis broncopulmonar alérgica, inflamación alérgica, neumonía por hipersensibilidad, neumonía eosinofílica, enfisema, bronquitis, bronquitis alérgica, bronquiectasia, fibrosis quística, tuberculosis, neumonitis por hipersensibilidad, asma ocupacional, sarcoidosis, síndrome de enfermedad reactiva de las vías respiratorias, enfermedad pulmonar intersticial, síndrome hipereosinofílico, rinitis, sinusitis, asma inducida por el ejercicio, asma inducida por la contaminación, asma de variante tusiva, parasitosis pulmonar, infección por virus sincitial respiratorio ("RSV"), infección por virus paragripal ("PIV"), infección por rinovirus ("RV"), e infección por adenovirus.
- 10 9. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz del anticuerpo anti-factor B humano modificado o un fragmento de unión al antígeno del mismo de la reivindicación 1, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

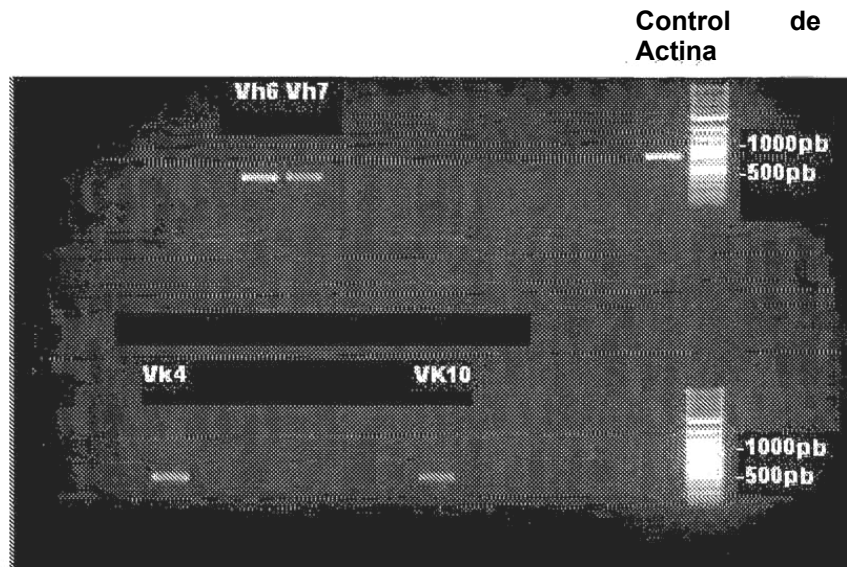


Figura 1.

Figura 2.

TA-V ₆	1	<u>EV</u> <u>QLQQSGPELVKPGASVKIPCKASGYTF</u> <u>TDYNNLWVKQSHPKSLEWIGD</u>	SEQ ID NO:10
TA-V ₇	1	<u>EV</u> <u>QLQQSGPELVKPGASVKIPCKASGYTF</u> <u>TDYNNLWVKQSHPKSLEWIGD</u>	SEQ ID NO:11
TA-V ₆	51	<u>INENNGGTIYNQKFKKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSED</u> <u>TAVYYCARGY</u>	SEQ ID NO:10
TA-V ₇	51	<u>INENNGGTIYNQKFKKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSED</u> <u>TAVYYCARGY</u>	SEQ ID NO:11
TA-V ₆	101	<u>YSEAWFAYWGQGGTLVTVSA</u>	SEQ ID NO:10
TA-V ₇	101	<u>YSEAWFAYWGQGGTLVTVSA</u>	SEQ ID NO:11

TA-V ₄	1	<u>DIVMSQSFSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLN</u> <u>SREKKNYLAWYQKPKQSP</u>	SEQ ID NO:9
TA-V ₄	51	<u>KLLIYWASTRESGVDPDPTGSGSGTDF</u> <u>TLTISVQAEADLAVYCKQSYNL</u>	
TA-V ₄	101	<u>PWIFGGGTILEIKR</u>	

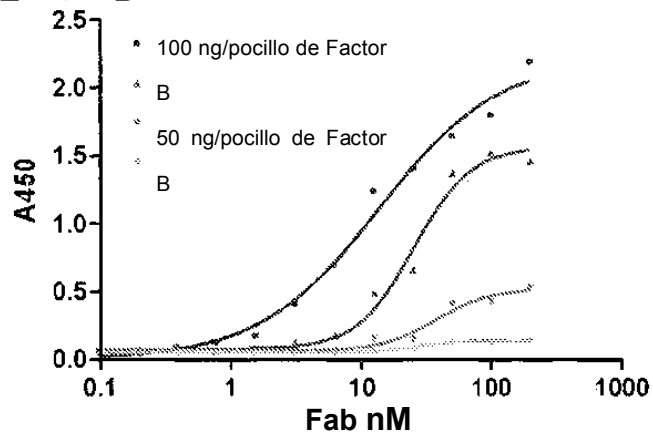
Figura 3.

1375H	E V Q - - Q S G F E L V K P G A S V K I E	SEQ ID NO:31
TA-V ₂ C	E V Q [X] [X] [X] Q S G F E L V K P G A S V K I E	SEQ ID NO:33

1379L	D I V M S Q S P S G L A V S A G E K V T M S S K K	SEQ ID NO:32
TA-V ₄	D I V M S Q S P S G L A V S A G E K V T M S [X] [X] [X]	SEQ ID NO:34

Figura 4.

ELISA: Unión de Fab' TA003 de referencia al



ELISA: Unión de Fab murino (1379) al Factor B

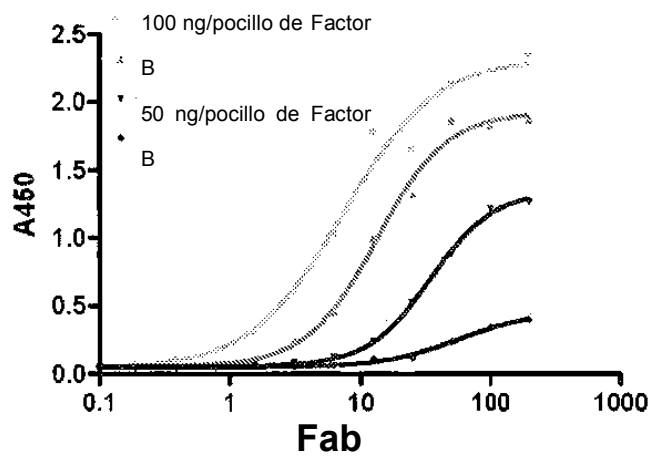
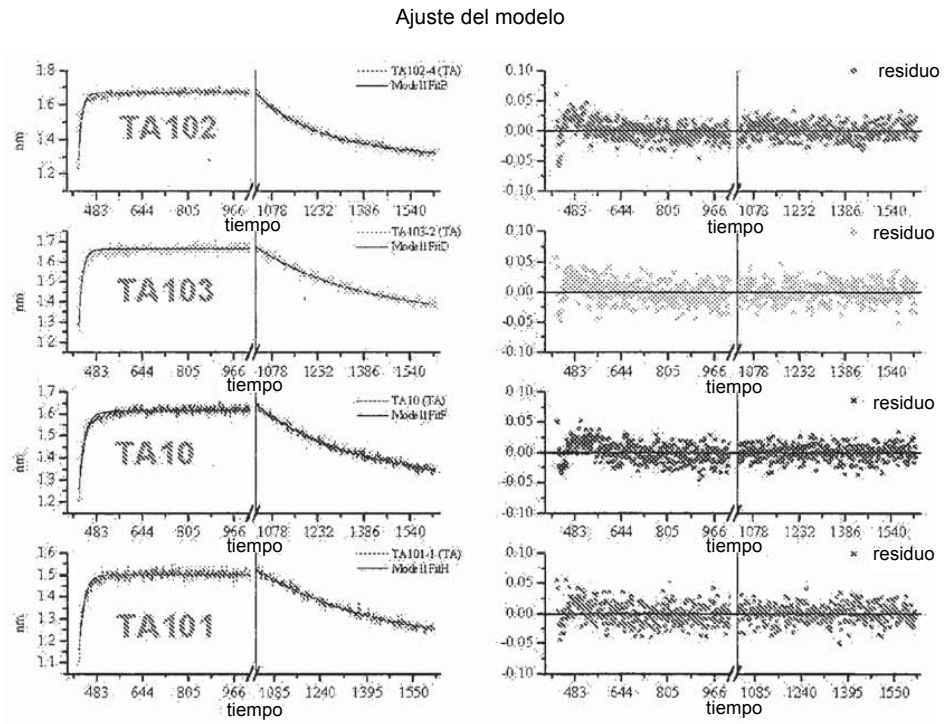


Figura 5.



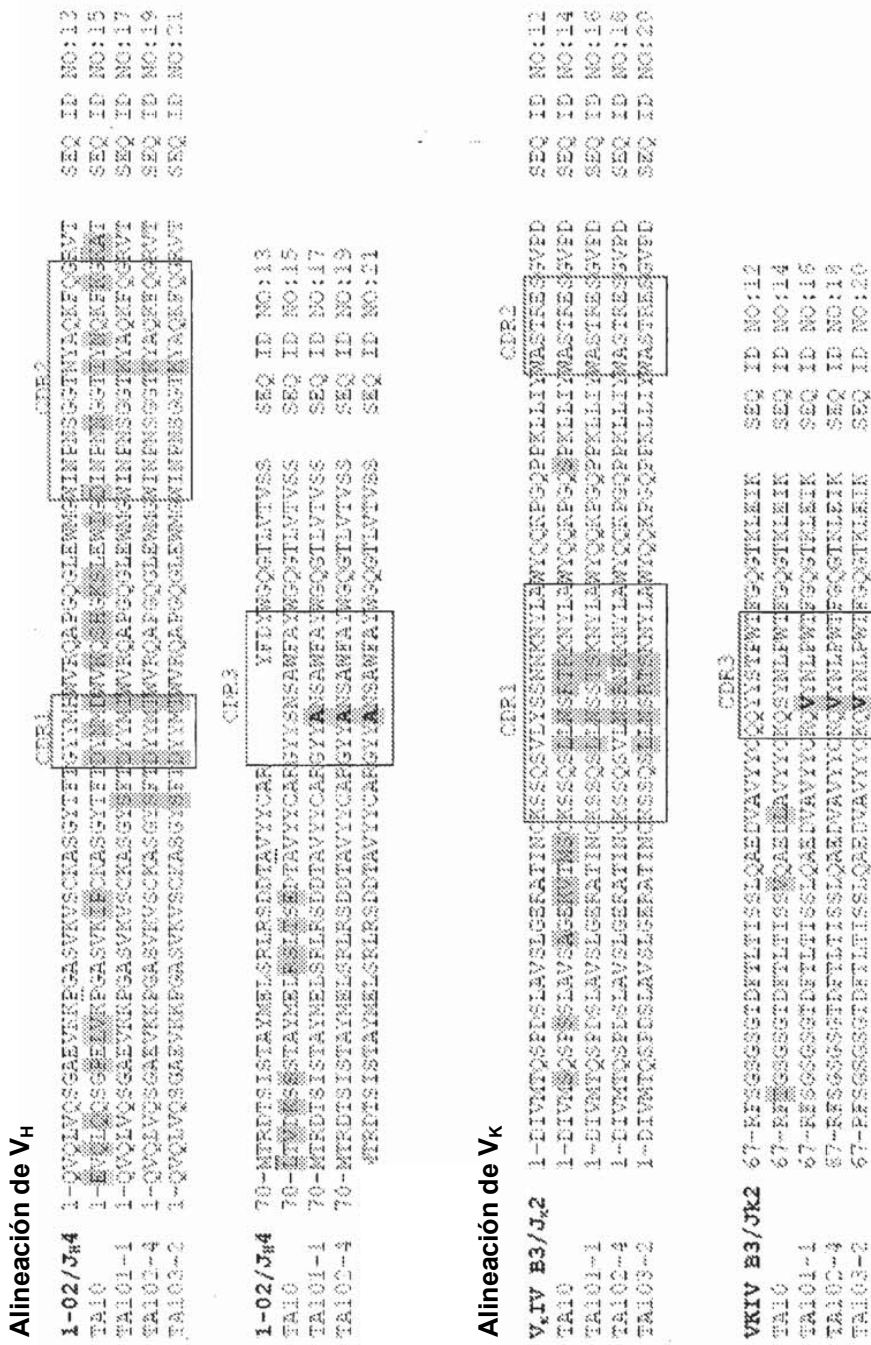


Figura 6.